

**UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER**  
**FACULTÉS DE MÉDECINE**

---

ANNÉE 2017

2017 TOU3 1514

**THÈSE**

**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**  
**MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE**

Présentée et soutenue publiquement

par

**Gwendoline DANIEL**

Le 17 Mars 2017

**ETUDE DES CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES,  
IMMUNOHISTOCHIMIQUES ET MOLÉCULAIRES DE CARCINOMES  
UROTHÉLIAUX INFILTRANT LE MUSCLE TRAITÉS PAR  
CHIMIOTHÉRAPIE NÉOADJUVANTE**

Directrice de thèse : Dr Marie-Laure QUINTYN-RANTY

**JURY**

Madame le Professeur	Monique COURTADE-SAIDI	Président
Monsieur le Professeur	Pierre BROUSSET	Assesseur
Monsieur le Professeur	Bernard MALAVAUD	Assesseur
Monsieur le Docteur	Damien POUESSEL	Assesseur
Madame le Docteur	Marie-Laure QUINTYN-RANTY	Suppléant
Madame le Docteur	Solène EVRARD	Membre invité

**UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER**  
**FACULTÉS DE MÉDECINE**

---

ANNÉE 2017

2017 TOU3 1514

**THÈSE**

**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**  
**MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE**

Présentée et soutenue publiquement

par

**Gwendoline DANIEL**

Le 17 Mars 2017

**ETUDE DES CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES,  
IMMUNOHISTOCHIMIQUES ET MOLÉCULAIRES DE CARCINOMES  
UROTHÉLIAUX INFILTRANT LE MUSCLE TRAITÉS PAR  
CHIMIOTHÉRAPIE NÉOADJUVANTE**

Directrice de thèse : Dr Marie-Laure QUINTYN-RANTY

**JURY**

Madame le Professeur	Monique COURTADE-SAIDI	Président
Monsieur le Professeur	Pierre BROUSSET	Assesseur
Monsieur le Professeur	Bernard MALAUDAUD	Assesseur
Monsieur le Docteur	Damien POUESSEL	Assesseur
Madame le Docteur	Marie-Laure QUINTYN-RANTY	Suppléant
Madame le Docteur	Solène EVRARD	Membre invité

**TABLEAU du PERSONNEL HU**  
**des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier**  
**au 1<sup>er</sup> septembre 2016**

**Professeurs Honoraires**

Doyen Honoraire	M ROUGE Daniel	Professeur Honoraire	M BAZEX Jacques
Doyen Honoraire	M LAZORTHES Yves	Professeur Honoraire	M VIRENQUE Christian
Doyen Honoraire	M CHAP Hugues	Professeur Honoraire	M CARLES Pierre
Doyen Honoraire	M GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur Honoraire	M BONAFE Jean-Louis
Doyen Honoraire	M PUEL Pierre	Professeur Honoraire	M VAYSSE Philippe
Professeur Honoraire	M ESCHAPASSE Henri	Professeur Honoraire	M ESQUERRE J.P.
Professeur Honoraire	M GEDEON André	Professeur Honoraire	M GUITARD Jacques
Professeur Honoraire	M PASQUIE M.	Professeur Honoraire	M LAZORTHES Franck
Professeur Honoraire	M RIBAUT Louis	Professeur Honoraire	M ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M ARLET Jacques	Professeur Honoraire	M CÉRENE Alain
Professeur Honoraire	M RIBET André	Professeur Honoraire	M FOURNIAL Gérard
Professeur Honoraire	M MONROZIES M.	Professeur Honoraire	M HOFF Jean
Professeur Honoraire	M DALOUS Antoine	Professeur Honoraire	M REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M DUPRE M.	Professeur Honoraire	M FAUVEL Jean-Marie
Professeur Honoraire	M FABRE Jean	Professeur Honoraire	M FREXINOS Jacques
Professeur Honoraire	M DUCOS Jean	Professeur Honoraire	M CARRIERE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M LACOMME Yves	Professeur Honoraire	M MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M COTONAT Jean	Professeur Honoraire	M BARRET André
Professeur Honoraire	M DAVID Jean-Frédéric	Professeur Honoraire	M ROLLAND
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline	Professeur Honoraire	M THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche	Professeur Honoraire	M CAHUZAC Jean-Philippe
Professeur Honoraire	M BERNADET	Professeur Honoraire	M DELSOL Georges
Professeur Honoraire	M REGNIER Claude	Professeur Honoraire	M ABBAL Michel
Professeur Honoraire	M COMBELLES	Professeur Honoraire	M DURAND Dominique
Professeur Honoraire	M REGIS Henri	Professeur Honoraire	M DALY-SCHVEITZER Nicolas
Professeur Honoraire	M ARBUS Louis	Professeur Honoraire	M RAILHAC
Professeur Honoraire	M PUJOL Michel	Professeur Honoraire	M POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M ROCHICCIOLI Pierre	Professeur Honoraire	M QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M RUMEAU Jean-Louis	Professeur Honoraire	M ARNE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M BESOMBES Jean-Paul	Professeur Honoraire	M ESCOURRÔU Jean
Professeur Honoraire	M SUC Jean-Michel	Professeur Honoraire	M FOURTANIER Gilles
Professeur Honoraire	M VALDIGUIE Pierre	Professeur Honoraire	M LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	M BOUNHOURE Jean-Paul	Professeur Honoraire	M PISSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M CARTON Michel	Professeur Honoraire	M CHAVOIN Jean-Pierre
Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline	Professeur Honoraire	M GERAUD Gilles
Professeur Honoraire	M GOUZI Jean-Louis	Professeur Honoraire	M PLANTE Pierre
Professeur Honoraire associé	M DUTAU Guy	Professeur Honoraire	M MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire	M PASCAL J.P.	Professeur Honoraire	M MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M SALVADOR Michel	Professeur Honoraire	M MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M BAYARD Francis	Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Professeur Honoraire	M LEOPHONTE Paul	Professeur Honoraire	M CHAMONTIN Bernard
Professeur Honoraire	M FABIÉ Michel	Professeur Honoraire	M SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M BARTHE Philippe	Professeur Honoraire	M FRAYSSE Bernard
Professeur Honoraire	M GABARROT Etienne	Professeur Honoraire	M BUGAT Roland
Professeur Honoraire	M DUFFAUT Michel	Professeur Honoraire	M PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M ESCAT Jean		
Professeur Honoraire	M ESCANDE Michel		
Professeur Honoraire	M PRIS Jacques		
Professeur Honoraire	M CATHALA Bernard		

**Professeurs Émérites**

Professeur ALBAREDE Jean-Louis	Professeur CHAMONTIN Bernard
Professeur CONTÉ Jean	Professeur SALVAYRE Bernard
Professeur MURAT	Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur MANELFE Claude	Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur LOUVET P.	Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur SARRAMON Jean-Pierre	Professeur Jacques LAGARRIGUE
Professeur CARATERO Claude	
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	
Professeur COSTAGLIOLA Michel	
Professeur ADER Jean-Louis	
Professeur LAZORTHES Yves	
Professeur LARENG Louis	
Professeur JOFFRE Francis	
Professeur BONEU Bernard	
Professeur DABERNAT Henri	
Professeur BOCCALON Henri	
Professeur MAZIERES Bernard	
Professeur ARLET-SUAU Elisabeth	
Professeur SIMON Jacques	
Professeur FRAYSSE Bernard	
Professeur ARBUS Louis	

## FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN

37 allées Jules Guesde - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : D. CARRIE

P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1ère classe		P.U. - P.H. 2ème classe	
M. ADOUE Daniel (C.E)	Médecine Interne, Gériatrie	Mme BEYNE-RAUZY Coile	Médecine Interne
M. AMAR Jacques	Thérapeutique	M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie	M. BUREAU Christophe	Hépatogastro-entéro
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion	M. CALVAS Patrick	Génétique
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie	M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)	Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. BONNEVILLE Paul	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie	M. CHAIX Yves	Pédiatrie
M. BOSSAVY Jean-Pierre	Chirurgie Vasculaire	Mme CHARPENTIER Sandrine	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. BRASSAT David	Neurologie	M. COGNARD Christophe	Neurologie
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique	M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt. Funct.
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie	M. FOURNIE Bernard	Rhumatologie
M. CHAP Hugues (C.E)	Biochimie	M. FOURNIE Pierre	Ophthalmologie
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie	M. GAME Xavier	Urologie
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie	M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
M. CLANET Michel (C.E)	Neurologie	M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque	M. LAUWERS Frédéric	Anatomie
M. DEGUINE Olivier	Oto-rhino-laryngologie	M. LÉOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie	M. LOPEZ Raphael	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
M. FERRIERES Jean	Epidémiologie, Santé Publique	M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie	M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie	M. OLVOT Jean-Marc	Neurologie
Mme LAMANT Laurence	Anatomie Pathologique	M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
M. LANG Thierry (C.E)	Biostatistiques et Informatique Médicale	M. PATHAK Atul	Pharmacologie
M. LANGIN Dominique	Nutrition	M. PAYRASTRE Bernard	Hématologie
M. LAUDUE Dominique (C.E)	Médecine Interne	M. PERON Jean-Marie	Hépatogastro-entérologie
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie	M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. MALAUAUD Bernard	Urologie	M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique	Mme SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
M. MARCHOU Bruno	Maladies Infectieuses	Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. MAZIERES Julien	Pneumologie	M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique		
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie		
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie		
Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie		
M. OLIVES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie		
M. OSWALD Eric	Bactériologie-Virologie		
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie		
M. PARINAUD Jean	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.		
M. PAUL Carle	Dermatologie		
M. PAYOUX Pierre	Biophysique		
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie		
M. RASCOL Olivier	Pharmacologie		
M. RECHER Christian	Hématologie		
M. RISCHMANN Pascal (C.E)	Urologie		
M. RIVIERE Daniel (C.E)	Physiologie		
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile		
M. SÁLES Jean-Pierre	Pédiatrie		
M. SANS Nicolas	Radiologie		
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire		
M. TELMON Norbert	Médecine Légale		
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépatogastro-entérologie		
<b>P.U. Médecine générale</b>		<b>P.U. Médecine générale</b>	
M. OUSTRIC Stéphane	Médecine Générale	M. MESTHÉ Pierre	Médecine Générale
		<b>P.A Médecine générale</b>	
		POUTRAIN Jean-Christophe	Médecine Générale

## FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : E. SERRANO

### P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ALRIC Laurent	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARLET Philippe (C.E)	Médecine Interne
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BOUTAULT Franck (C.E)	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie
M. BUJAN Louis (C.E)	Urologie-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BUSCAIL Louis	Hépatolo-Gastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Anaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE Eric	Hématologie
Mme DELISLE Marie-Bernadette (C.E)	Anatomie Pathologique
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel	Cardiologie
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie, Eco. de la Santé et Prévention
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie
M. KAMAR Nassim	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LAURENT Guy (C.E)	Hématologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophthalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MARTY Nicole	Bactériologie Virologie Hygiène
M. MASSIP Patrice (C.E)	Maladies Infectieuses
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick	Nutrition
M. ROCHE Henri (C.E)	Cancérologie
M. ROLLAND Yves	Gériatrie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel	Pharmacologie
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

### P.U. - P.H.

2ème classe

M. ACCADBLED Franck	Chirurgie Infantile
M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice	Thérapeutique
M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
M. GALINIER Philippe	Chirurgie Infantile
M. GARRIDO-STÓWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. HUYGHE Eric	Urologie
M. LAFFOSSE Jean-Michel	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
M. LEGUEVAQUE Pierre	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. OTAL Philippe	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugenia	Généralité et biologie du vieillissement
M. TACK Ivan	Physiologie
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. YSEBAERT Loïc	Hématologie

Professeur Associé de Médecine Générale  
Pr. STILLMUNKES André

Professeur Associé en O.R.L.  
Pr. WOISARD Virginie

**M.C.U. - P.H.**

M. APOIL Pol André	Immunologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie
M. BIETH Eric	Génétique
Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie
M. CAVAGNAC Elieema	Chirurgie orthopédique et traumatologie
Mme CONCINA Dominique	Anesthésie-Réanimation
M. CONGY Nicolas	Immunologie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie
Mme DE MAS Véronique	Hématologie
Mme DELMAS Catherine	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUPUI Philippe	Physiologie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie
M. GANTET Pierre	Biophysique
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDJ Safouane	Biochimie
Mme HITZEL Anne	Biophysique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition
M. MONTÓYA Richard	Physiologie
Mme MOREAU Marion	Physiologie
Mme NOGUEIRA M L	Biologie Cellulaire
M. PILLARD Fabien	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY Frédéric	Biochimie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
M. SOLER Vincent	Ophthalmologie
M. TAFANI Jean-André	Biophysique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie
Mme TREMOLLIERES Florence	Biologie du développement
Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie

**M.C.U. Médecine générale**

M. BRILLAC Thierry

**M.C.U. - P.H.**

Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
M. CAMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CAUSSE Elizabeth	Biochimie
M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
M. CHASSAING Nicolas	Génétique
Mme CLAVE Danièle	Bactériologie Virologie
M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme COLLIN Laetitia	Cytologie
Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
M. CORRE Jill	Hématologie
M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. GASO David	Physiologie
Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme GUILBEAU-TRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LEPAGE Benoit	Biostatistiques et Informatique médicale
Mme MALPAS Françoise	Biochimie
M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme NASR Nathalie	Neurologie
Mme PERIQUET Brigitte	Nutrition
Mme PRADDAUDE Françoise	Physiologie
M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme VALLET Marion	Physiologie
M. VERGEZ François	Hématologie
Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie

**M.C.U. Médecine générale**

M. BISMUTH Michel	Médecine Générale
M. BISMUTH Serge	Médecine Générale
Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve	Médecine Générale
Mme ESCOURROU Brigitte	Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr ABITTEROU Yves	Dr ROYER Pierre
Dr CHICOULAA Bruno	Dr ANE Serge
Dr IRI-DELAHAYE Motoko	Dr BIREBENT Jordan
Dr FREYENS Anne	

A notre Présidente du jury,

**Madame le Professeur Monique COURTADE SAIDI**

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury de thèse et nous vous en sommes très reconnaissante. Nous admirons votre pédagogie et votre rigueur scientifique ainsi que votre disponibilité et votre gentillesse. Vous nous faites l'honneur de nous accueillir comme assistante hospitalo-universitaire dans quelques mois. Nous sommes très heureuse de pouvoir poursuivre notre formation à vos côtés. Nous vous en remercions et nous espérons nous montrer digne de la confiance que vous nous accordez. Nous vous prions de trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.

A notre jury de thèse,

**Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET**

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Vous nous faites l'honneur de siéger à ce jury et nous vous sommes très reconnaissante de juger notre travail. Nous avons eu le privilège de bénéficier de votre enseignement pendant notre internat. Votre expertise diagnostique et scientifique ainsi que vos qualités d'enseignant sont un modèle pour nous. Merci de nous permettre de pouvoir continuer à travailler dans votre service dans quelques mois. Nous espérons nous montrer digne de la confiance que vous nous accordez. Veuillez trouver ici l'expression de notre profond respect.

A notre jury de thèse,

**Monsieur le Professeur Bernard MALAVAUD**

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Chirurgie Urologique

Nous sommes heureuse et honorée de vous compter parmi les membres de ce jury. Nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail. Votre analyse sur le sujet est d'une grande importance du fait de vos compétences dans le domaine. Nous connaissons et admirons vos qualités professionnelles et votre rigueur scientifique. Soyez assuré de notre plus grand respect et de notre sincère gratitude.

A notre jury de thèse,

**Monsieur le Docteur Damien POUESSEL**

Praticien spécialiste de Centre de Lutte Contre le Cancer Oncologie médicale

Merci de nous faire l'honneur de juger ce travail. Votre expertise sur le sujet et votre sentiment en tant que clinicien nous sont indispensables. Soyez assuré de notre reconnaissance et de notre plus grand respect.

A notre jury de thèse,

**Madame le Docteur Solène EVRARD**

Maître de conférence des universités – Praticien hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Merci d’avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de juger ce travail.

Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité. Merci pour tes explications et tes conseils qui m’ont éclairé sur le monde du NGS. Merci pour ton investissement dans l’analyse des données du séquençage. Je suis heureuse de pouvoir poursuivre ma formation à tes côtés. Soit assurée de ma plus sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

A notre directrice de thèse,

**Madame le Docteur Marie-Laure QUINTYN-RANTY**

Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Merci d’avoir accepté de diriger ce travail de thèse qui disons-le s’est parfois avéré un peu plus difficile que ce que l’on pensait. Je te remercie pour ta disponibilité, pour nos longues séances de discussion sur le sujet, pour tes encouragements et tes conseils. J’espère être digne de ta confiance. J’admire tes qualités professionnelles, mais aussi tes qualités humaines. Sois assurée de ma sincère gratitude.

**Je souhaite remercier tout particulièrement les personnes qui m'ont aidé au cours de ce travail :**

**Alexandre Gryn** : Un grand merci pour ton aide dans ce travail. Tu nous as permis de constituer une base de données précieuse grâce à ton recueil. Maintenant que ma thèse est passée il ne nous reste plus qu'à publier ! J'espère que nous aurons à nouveau l'occasion de travailler ensemble.

**Léonor Chaltiel** : Merci pour ton aide précieuse, pour ta relecture attentive et ton éclairage sur le monde obscur des statistiques.

**Thomas Filleron** : Merci pour l'intérêt porté à ce travail et pour tes conseils avisés.

**A Toute l'équipe du CRB : Christelle, Sophie, Céline, Lisa** : merci pour votre aide et votre efficacité en particulier pour la réalisation des TMA et pour les multiples tentatives plus ou moins fructueuses d'extraction d'ADN !

**A toute l'équipe de biomol et à David Grand** : merci d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions et pour les cas passés en NGS.

**François-Xavier** : merci pour les lames scannées si rapidement.

**Aux médecins auprès desquels j'ai appris :**

Je tiens, en premier lieu, à exprimer mes hommages respectueux et toute ma reconnaissance envers le Dr Catherine Mazerolles. Ce fut un réel plaisir d'apprendre à ses côtés. Elle a su me guider et m'encourager comme personne et restera pour moi un exemple à suivre. Sa disparition laisse un vide immense parmi nous.

Au Professeur Marie-Bernadette DELISLE. Merci de nous avoir accueillie dans votre service d'anapath où nous avons eu le privilège de bénéficier de votre enseignement et de votre expérience. Vos compétences diagnostiques et scientifiques forcent le respect.

**A tous les médecins du service d'Anatomie Pathologique de l'IUCT :** Pour votre enseignement, votre disponibilité et votre patience depuis mon arrivée en anapath, en 2011.

Au Professeur Emmanuelle URO-COSTE : Merci de ta bienveillance, et de ton sens pédagogique indéniable. C'est une chance de pouvoir profiter de tes enseignements, ainsi que de ton humour légendaire. Soit assurée de ma plus sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Aux Professeurs Anne GOMEZ-BROUCHET, Laurence LAMANT, Janick SELVES.

Aux Docteurs Céline BASSET, Isabelle ROUQUETTE, Philippe ROCHAIX, Florence BREIBACH, Eliane MERY, Dominique DAURE, Marie DANJOUX, Raphaëlle DUPREZ-PAUMIER, Camille LAURENT, Sophie LEGUELLEC, Béatrice BARRES, Véronique MAISONGROSSE, Isabelle DUGA, Jacqueline AZIZA, Emilie TOURNIER, Martine DELSOL, Chantal MONDON, Nada MOUKARBEL  
Et à ceux qui ont quitté le service mais dont j'ai pu bénéficier de l'enseignement : Ghislaine ESCOURROU, Magali LACROIX-TRIKI, Céline GUILBEAU, Laetitia COLLIN, Fabrice PROJETTI.

**Aux différents services qui m'ont accueillie :**

L'équipe du service d'Anapath de Tarbes : Virginie SIANI, Anne-Marie BOUDAT, Helena FLAMME, et bien sûr Corinne, Marie, Audrey, Babe, Evelyne, j'ai passé un de mes meilleurs semestres à vos côtés. (Je reviens quand vous voulez pour une séance crêpes party niveau 2!)

L'équipe du service d'hématologie qui m'a vue débiter (et aussi finir !) mon internat côté clinique, et en particulier à Sarah G, à qui je dois ma survie à Joly.

L'équipe du service d'hématologie du Pr Sie où j'ai découvert la lecture du myélogramme et bien d'autres choses, entre deux parties de babyfoot.

L'équipe de recherche du Pr Brousset, et en particulier Marina qui m'a guidée lors mes premiers pas dans le monde de la recherche.

L'équipe de recherche du Dr Fons à EVOTEC : Gaëlle B, merci pour ton accueil au laboratoire lors de mon M2R, ta patience et ta disponibilité pour m'apprendre à « manipuler » et tes nombreux conseils. David S, merci pour tes conseils et ton aide précieuse.

**A toute l'équipe du laboratoire d'anapath de l'IUCT :** aux cadres, aux secrétaires et à tous les techniciens du service : merci pour votre travail, votre aide, et votre sympathie, et pour les bons moments de rigolade passés à la macro. C'est un plaisir de travailler ensemble.

## **A mes co-internes ou anciens co-internes devenus chefs en anapath :**

**Aux plus « anciens » :** Romain (C'est toi qui m'a appris mes premiers mots de vocabulaire en anapath mais aussi mes premiers mots en Toulousaing'), Audrey (Toujours zen, tu as un don pour adoucir toutes les situations. Je te souhaite un beau mariage dans quelques jours), Maxime (Merci pour ta participation à la relecture de mes lames de DES), Thibaut (Réf 145 ok ;) ...mais je ne suis pas sûre que ça apparaisse dans pubmed...), Camille (J'admire ton sérieux et ton engagement. Au passage : il va me falloir d'autres indices ... la littérature anglaise est trop vaste), Claire I (Toujours prête à rendre service. C'est une chance de travailler avec toi. J'apprécie ton calme et ta discrétion).

Je suis impatiente de rejoindre votre équipe, et j'espère que vous allez me coacher avec indulgence !

Julie (Vivement ton retour parmi nous qu'on le fasse ce karaoké IUCT), Aurore (Première co-interniste d'anapath, je me souviendrai longtemps de notre alliance maléfique qui a conduit au massacre de notre toute première pièce de macro !), Anne-Charlotte (Tiens-toi prête, on arrive bientôt perfectionner notre accent créole), Laure (La tornade triathlète montalbanaise ! Et dire qu'il n'y a pas si longtemps tu n'arrivais pas à me suivre quand on allait courir le long du canal...), Sarah (J'admire ta détermination et ton impressionnant débit verbal ! J'espère que tu t'éclates bien en M2 et que tu ne vas pas laisser Zika t'impressionner !)

**Et aux plus jeunes :** Alix (Calme et sérénité), Cécile (Tu fais rimer efficace et relax à la perfection), Claire R (Ta bonne humeur constante est toujours agréable), Charlotte (Tu es l'exemple parfait du remord réussi, tu feras une excellente anapath), Sébastien (Notre calimero préféré ! Je garde un très bon souvenir de notre semestre à Rangueil où tout le monde savait que tu ne savais pas qu'on savait tout ce que tu sais #tmtc ^^), Quentin (profites bien de ton voyage), Lisa, Gabrielle, Justine, Margot, Anna, Guillaume : vous formez une belle équipe.

### **A mes amis de toujours :**

**Margaux** (soon to be « Pr P »! Tu as laissé tes petits cœurs pour être là aujourd'hui, et ça me fait chaud au mien...de ptit cœur). **Yann** (ouf j'aurais quand même réussi à finir avant toi ! Il s'en est fallu de peu... !) **Mylène** (la vie a beaucoup plus d'imagination qu'on ne le pense. Je suis sûre qu'elle te réserve de belles choses.), **Solène** (tu sais que tout commence en finistère ! alors pas d'inquiétude, tu as fait le bon choix !) **Marc** (je vous souhaite le meilleur pour votre nouvelle vie australienne avec Fazeah)

La team Laboureurs PLB Muco des Vieilles : **Gwenvaël** (chef et animateur indétrônable !), **Romain** (j'ai l'impression que tes appels se font plus rares ... et que la Russie n'y est pas pour rien !), **Micka** (la légendaire « barik espagnole » !). J'espère pouvoir vivre encore de beaux festivals avec vous !

### **Aux sailors !!**

**Emilie** : on se suit depuis la petite section chez Madame C et à quelques jours près on sera Docteur en même temps ! Que de chemin parcouru ! Je te souhaite le meilleur sur les hauteurs d'Annecy avec tes deux petits garçons (désolée nounours ;) ) **Alice** : nos pauses thé au son de Céline m'ont bien manquées dans les dernières heures de rédaction de cette thèse !! Félicitations pour ta belle petite famille bientôt Perrosienne ! **Céline** : tu fais partie de ces belles rencontres brestoises avec qui la vie est plus pétillante. Le vent t'a poussée de Trévignon jusqu'à la Réunion. Fais attention je crois bien que les requins ne font pas la même taille ! **AnneSoWhat** :(P A P E comme ça se prononce) Tu as une bien belle petite famille avec Arthur et Yoann. En vous voyant, je ne peux m'empêcher de penser à un certain jour de « sans Valentin » ou tu as eu bien raison de lâcher les sailors !! **Lulu** : la plus jolie camionneuse de l'Ouest ! Quand est-ce que tu viens m'aider à libérer quelques T-shirts trop serrés à *Toull louz* ? **A vous cinq** : sans vous ces années Brestoises n'auraient sûrement pas eu la même saveur !!! Les avoir partagées avec vous, aura été un vrai bonheur, je vous remercie tout simplement. Vous êtes brillantes, ne changez pas !

### **Aux amis toulousains :**

Laureline (nouvelle grande prêtresse du laser), Julien (le meilleur pianiste « tout terrain » que je connaisse), Vincent (le vacancier quasi professionnel du groupe ^^), Falek (beaucoup de changements en vue, je suis très heureuse pour toi), Nath (actionnaire majoritaire du Carbet), Patricia (marathonienne impressionnante), Jérémy (sans vouloir te dénoncer, tu es le voleur parmi nous), Sarah H (à nos aventures de l'extrême ! qu'elles soient à vélo, en catamaran ou de simples randos « un peu aériennes » ! A quand la prochaine ?), Stéphanie (on ne s'ennuie jamais avec toi).

### **Aux colocs :**

Magaly « de stétiennne » (notre coloc toulousaine aux accents stéphanois (et aussi un peu allemand) restera pour moi un super souvenir. Courage à toi pour la suite, bientôt la fin !)  
Cédric (Tu m'as appris que pour courir il fallait respirer ! Élément fondateur de ma carrière de joggeuse, je ne l'oublierai pas)  
Sophie (Notre rencontre lors d'un certain weekend ski a marqué le début de notre amitié. Un laborieux semestre hivernal en coloc et quelques soirées « sushis chez laeti » plus tard nous voilà arrivées presque ex aequo à l'heure de « La Thèse » !  
Vivement que tu aies passé la tienne !

## **A ma famille :**

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagnée tout au long de ces années.

**Papa et Maman** : merci pour tout. Pour l'amour et pour l'éducation que vous m'avez donné. Pour votre soutien moral et matériel. Je sais les difficultés. Je sais les sacrifices. Malgré tout, vous m'avez toujours soutenue et encouragée. Je vous en serai éternellement reconnaissante. Merci de votre confiance. J'espère vous rendre fiers aujourd'hui.

**Solenn**, ma première complice dans la vie (que ce soit pour les conneries, « l'aventure » ou plus de tubes dance !) je suis fière de toi et de la famille que tu es en train de fonder avec Hugo. Mon épreuve enfin terminée, je vais tâcher d'être un témoin à la hauteur de tes attentes. C'est sûr, ce mariage sera Legendary!

**Théodore**, c'est une magnifique famille que vous formez avec Manon et le merveilleux petit Emyl ! Je suis fière de toi.

**Adrien** : ar brezhoneger de la famille et *youtubeur* de grand talent ! Peu importe ce que tu choisiras de faire plus tard, tu vas tout déchirer c'est sûr !



## **Mes grands-parents,**

Mamie, Papi et Pépé : merci pour vos encouragements, merci pour les valeurs que vous m'avez transmises, et pour les merveilleux souvenirs d'enfance que je vous dois.

Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour ma grand-mère Jeanne, partie trop tôt, qui aurait aimé être là pour me voir finir enfin ces trop longues études.

*« N'eus mann drouk bet na servij ket un dra mad bennak »*

**Marraine**

**ETUDE DES CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES,  
IMMUNOHISTOCHIMIQUES ET MOLÉCULAIRES DE CARCINOMES  
UROTHÉLIAUX INFILTRANT LE MUSCLE TRAITÉS PAR  
CHIMIOTHÉRAPIE NÉOADJUVANTE**

# TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS UTILISEES .....	23
LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX .....	26
A. Figures .....	26
B. Tableaux .....	28
I. PREAMBULE .....	29
II. GENERALITES .....	31
A. Anatomie de la vessie.....	31
B. Embryologie et histologie normale de la vessie.....	32
1. Embryologie.....	32
2. Histologie.....	33
C. Le carcinome urothélial.....	35
1. Epidémiologie.....	35
2. Etiologie.....	36
3. Présentation clinique et examens para-cliniques .....	37
D. Anatomopathologie.....	39
1. Grades OMS.....	39
2. Stades et Classification TNM .....	47
3. Variants histomorphologiques du carcinome urothélial : OMS 2016.....	48
4. Immunophénotype.....	53
5. Données moléculaires .....	54
E. Traitement et prise en charge thérapeutique.....	66
1. Prise en charge des TVNIM.....	66
2. Prise en charge des TVIM et des tumeurs métastatiques.....	67
3. Traitements émergents .....	71
F. Evaluation de la réponse aux traitements .....	74
III. OBJECTIFS .....	76
IV. MATERIEL ET METHODES .....	77
A. Cohorte.....	77
1. Sélection des patients .....	77
2. Recueil des données cliniques.....	77
B. Prise en charge des RTV .....	77
1. Evaluation morphologique des RTV .....	77
2. Tissu MicroArray.....	78
3. Immunohistochime .....	79

4.	Biologie moléculaire .....	80
C.	Prise en charge des pièces de cystectomie .....	87
1.	Prise en charge initiale .....	87
2.	Score de régression TRG.....	87
D.	Analyses statistiques .....	92
<b>V.</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>93</b>
A.	Description de la population .....	93
B.	Réponse à la chimiothérapie.....	94
C.	Scores de régression tumorale TRG .....	95
D.	Corrélation de la réponse à la CNA avec la survie.....	96
E.	Corrélation du TRG avec la survie .....	98
F.	Facteurs cliniques initiaux prédictifs de la réponse à la CNA.....	101
G.	Facteurs cliniques initiaux prédictifs de la régression tumorale (TRG).....	101
H.	Variants morphologiques .....	102
I.	Etude immunohistochimique .....	104
1.	Phénotype immunohistochimique.....	105
2.	Marqueurs IHC et réponse à la CNA.....	107
3.	Corrélation des profils IHC à la survie .....	111
J.	Résultats de biologie moléculaire .....	113
1.	Extraction et qualification des ADN .....	113
2.	Séquençage NGS.....	114
K.	Résumé des caractéristiques morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires.....	116
1.	Résumé de l'ensemble des caractéristiques de la cohorte.....	116
2.	Données morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires .....	118
<b>VI.</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>120</b>
1.	Réponse à la chimiothérapie .....	120
2.	Facteurs cliniques prédictifs de la réponse à la CNA.....	122
3.	Variants morphologiques .....	125
4.	Immunohistochimie .....	126
5.	Biologie moléculaire .....	130
6.	Hétérogénéité tumorale.....	132
7.	Définition des groupes moléculaires.....	133
8.	Perspectives : autres biomarqueurs.....	136
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>138</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>140</b>

IX. ANNEXES..... 149

## ABREVIATIONS UTILISEES

ADN	acide désoxyribonucléique
AFIP	Armed forces institute of pathology
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	acide ribonucléique
ASCO	American society of clinical oncology
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
CD44	Cluster de différenciation 44
CGH Array	Puce d'hybridation génomique comparative
CIS	Carcinome in situ
CK	Cytokératine
CMV	cisplatine, méthotrexate et vinblastine
CNA	Chimiothérapie Néoadjuvante
Ct	Cycle seuil
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CU	Carcinome Urothélial
DAB	Diaminobenzidine
DDR	DNA Damage Repair
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire
DLBCL	Diffuse large B cell lymphoma - lymphome B diffus à grandes cellules
dNTP	Mélange des quatre désoxyribonucléotides
ddMVAC	dose dense MVAC
EGFR	Epidermal Growth Factor receptor
EORTC	The European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FFPE	Formalin fixed and paraffin embedded - fixé au formol et inclus en paraffine
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
FOXA1	Forkhead box protein A1
GC	Cisplatine et Gemcitabine
GDPD3	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3

H&E Coloration hémalum éosine

HER2 Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HIF1 hypoxia-inducible factor 1

HRAS Harvey rat sarcoma virus oncogene

IC95% Intervalle de confiance à 95%

Ig Immunoglobuline

IHC Immunohistochimie

INCa Institut National du Cancer

IRM Imagerie par résonance magnétique

ISUP International Society of urological pathology

MAPK Mitogen-activated protein kinases

MMR MisMatch Repair

mRNA ARN messagers

MVAC Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin and Cisplatin

NBI Narrow Band Imaging

NGS Next-generation sequencing

OMS Organisation mondiale de la santé

P16INK4A Cyclin-dependent kinase inhibitor p16

PCR Polymerase Chain Reaction

PD1 Programmed cell death 1

PDL1 Programmed death-ligand 1

PI3KCA phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide

PPARY Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma

qPCR quantitative PCR

RB1 Gène du Rétinoblastome

RECIST response evaluation criteria in solid tumours

RISC: Retrospective international study of cancers of the urothelial tract.

RNAseqséquençage de l'ARN

RPPA Reverse phase protein array - puces protéiques

RTK Récepteur tyrosine kinase

RTV Résection transurétrale de vessie

SEER Surveillance, Epidemiology and End Results program  
SPRED1 Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1  
SWOG Southwest oncology group  
TCGA The Cancer Genome Atlas  
TMA Tissu Micro Array  
TNM Tumor nodes metastasis (tumeur ganglions métastases)  
TP53 tumor protein 53  
TRG Tumor regression grade  
TUFPM Tumeur urothéliale de faible potentiel de malignité  
TVIM Tumeur de vessie infiltrant le muscle  
TVNIM Tumeur de vessie n'infiltrant pas le muscle  
USA United States of America  
USCAP United States and Canadian Academy of Pathology  
 $\beta$ HCG hormone chorionique gonadotrope humaine

## LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

### A. Figures

Figure 1: Incidence & Mortalité aux USA entre 1975-2013, toutes races, deux sexes. Ajustées à l'âge. ....	29
Figure 2: Anatomie de la vessie chez l'homme. ....	31
Figure 3: Vue antérieure du mur postérieur de la vessie chez la femme. ....	31
Figure 4: Vue postérieure de la vessie et de la prostate. ....	32
Figure 5: Evolution du cloaque à environ 32 jours. ....	32
Figure 6: Urothélium normal: schéma en état de réplétion et de vacuité et aspect morphologique. .	33
Figure 7: Lamina propria (ou chorion) normal . ....	34
Figure 8 Muscle détroisor ou musculature propre. ....	34
Figure 9: Urothélium du trigone chez la femme : métaplasie malpighienne. ....	35
Figure 10: Parallèle entre les grades OMS 1973 et 2004 pour les tumeurs urothéliales papillaires. ...	40
Figure 11: Algorithme pour le grading des tumeurs urothéliales, proposé par l'OMS 2016. ....	41
Figure 12: classification TNM et grades 1973 et 2004 des carcinomes urothéliaux . ....	47
Figure 13: Classification TNM (UICC 2009) des cancers de vessie. ....	48
Figure 14: Variants morphologiques de carcinome urothélial. ....	52
Figure 15: Marqueurs immunohistochimique de la différenciation urothéliale. ....	53
Figure 16: Modèle des deux voies potentielles de carcinogénèse urothéliale. ....	55
Figure 17: Voies de signalisation altérées dans les carcinomes urothéliaux. ....	56
Figure 18: Récepteur FGFR3 et voies de signalisation en aval ..... ..	58
Figure 19: FGFR3. Représentation schématique de la protéine et de la position des exons correspondants. ....	59
Figure 20: Principaux biomarqueurs associés aux sous types moléculaires luminal et basal. ....	61
Figure 21 Représentation schématique et parallèle entre les différentes classifications moléculaires de CU publiées. ....	65
Figure 22: Tissu arrayeur MiniCore et bloc de TMA en paraffine. ....	78
Figure 23: Etapes de préparation de la librairie. ....	83
Figure 24: Différence entre couverture et profondeur ..... ..	84
Figure 25: Puce de séquençage (ou flowcell) Illumina, avec oligos complémentaires de P5 et P7 fixés à la surface ..... ..	84
Figure 26: Flowcell (= cellule de séquençage) et génération des clusters ..... ..	85
Figure 27: Séquençage par synthèse. ....	86
Figure 28: Alignement des séquences lues et analyse des données. ....	86
Figure 29: TRG1 : Aspect fibreux cicatriciel au niveau de la sous-muqueuse et du muscle détroisor (flèches) figurant le lit tumoral initial. ....	89
Figure 30: TRG1 : Fibrose dense et infiltrat inflammatoire lymphocytaire dispersé. ....	89
Figure 31: TRG2 : Cellules tumorales résiduelles dans le tissu adipeux péri-vésical (ypT3) au sein d'un lit tumoral essentiellement fibreux. ....	90
Figure 32: TRG3 : Tumeur résiduelle abondante, infiltrant le muscle, sans signe de régression. ....	91
Figure 33: TRG1b : Ganglions lymphatiques avec régression complète des métastases ganglionnaires. Zones fibreuses nodulaires riches en macrophages. ....	91
Figure 34: Survie globale et survie sans récurrence en fonction de la réponse à la CNA (définie par ypT<pT2 et N0). ....	97
Figure 35: Survie sans récurrence en fonction du score TRG sur pièce de cystectomie post-CNA. ....	99
Figure 36: Survie globale en fonction du score TRG sur pièce de cystectomie post-CNA ..... ..	100
Figure 37: Nombre de patients répondeurs à la CNA en fonction des variants morphologiques. ....	104

Figure 38: Marquages immunohistochimiques CK5/6 et GATA3.....	105
Figure 39: Exemple représentatif de cas "double positif" CK5/6 et GATA3 en IHC (Patient 185). ....	106
Figure 40: Exemple représentatif d'un profil CK5/6+ GATA3- en IHC (Patient 53). ....	106
Figure 41: Exemple représentatif d'un profil CK5/6 - GATA3 + en IHC (Patient 108). ....	107
Figure 42: Distribution des patients répondeurs et non répondeurs à la CNA en fonction de leur profil IHC CK5/6 et GATA3. ....	110
Figure 43: Distribution des profils IHC CK5/6 et GATA3 en fonction de la régression tumorale .....	111
Figure 44: Distribution des profils IHC de type basal et "non basal" ou luminal en fonction du TRG. ....	111
Figure 45: Survie sans récurrence en fonction du profil IHC CK5/6 et GATA3.....	112
Figure 46: Etapes de la sélection des cas pour le séquençage NGS. ....	113
Figure 47: Résumé des données morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires disponibles .....	119

## B. Tableaux

Tableau 1: Catégories diagnostiques du Paris System pour la cytologie urinaire.....	38
Tableau 2: Critères morphologiques de malignité selon le Paris System. ....	38
Tableau 3: Résumé des critères diagnostiques des lésions urothéliales papillaires selon l'OMS 2016.	43
Tableau 4: Résumé des critères diagnostiques des lésions urothéliales planes selon l'OMS 2016. ....	46
Tableau 5: Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur les plus fréquemment altérés dans les carcinomes urothéliaux.....	57
Tableau 6: Résumé des différentes classifications moléculaires décrites dans les carcinomes urothéliaux. ....	62
Tableau 7: Groupes en fonction du risque de progression et de récurrence .....	66
Tableau 8: Anticorps utilisés en immunohistochimie et conditions d'utilisation .....	79
Tableau 9: Liste des gènes analysés : Panel INCA. ....	82
Tableau 10: Score de régression tumorale selon Fleishmann. ....	88
Tableau 11: Caractéristiques clinico-pathologiques initiales de la population.....	93
Tableau 12: Description des régimes de chimiothérapie néoadjuvante.....	94
Tableau 13: Caractéristiques anatomo-pathologiques sur les pièces de cystectomie des 66 patients	95
Tableau 14: Corrélation du TRG à la réponse à la CNA .....	95
Tableau 15: Scores TRG sur les tumeurs primitives et sur les curages ganglionnaires.....	96
Tableau 16: Analyse univariée des facteurs clinico-pathologiques associés la réponse à la CNA (réponse définie par ypT<pT2). ....	101
Tableau 17: Analyse univariée des facteurs clinico-pathologiques associés à la régression tumorale .....	102
Tableau 18: Réponse à la CNA en fonction de la présence d'un variant morphologique sur la dernière RTV pré-CNA.....	103
Tableau 19: Réponse à la CNA en fonction de la morphologie tumorale. Comparaison des deux modes de définition de la réponse (ypT<pT2 ou TRG1/2). ....	103
Tableau 20: Distribution des marqueurs immunohistochimiques étudiés en fonction de la réponse à la CNA définie par le stade ypT<pT2. ....	107
Tableau 21: Association des marquages IHC CK5/6 et GATA3 et corrélation avec la réponse à la CNA. ....	109
Tableau 22: Distribution des marqueurs immunohistochimiques étudiés en fonction de la réponse à la CNA définie par le TRG. ....	110
Tableau 23: Description phénotypique des cas séquencés en NGS.....	115
Tableau 24: Résumé des caractéristiques de la cohorte.....	117
Tableau 25: Résumé des travaux publiés sur les classifications moléculaires dans les carcinomes urothéliaux .....	134
Tableau 26: Profil immunohistochimique des tumeurs urothéliales basales et lumbales .....	127

## I. PREAMBULE

Le cancer de la vessie est une maladie complexe, associée à une forte mortalité et morbidité. Il représente le septième cancer le plus fréquent dans le monde, avec plus de 430000 nouveaux cas et 150000 décès par an [1], [2]. En Europe et en Amérique du Nord, plus de 90% de ces cancers sont des carcinomes urothéliaux (CU). En 2016, aux USA, on estime à 77000 le nombre de nouveaux cas, et à 16400 le nombre de décès liés au cancer de la vessie [3]. Ces chiffres sont stables depuis plus de 20 ans, avec un pronostic qui ne s'est que peu amélioré (Figure 1).

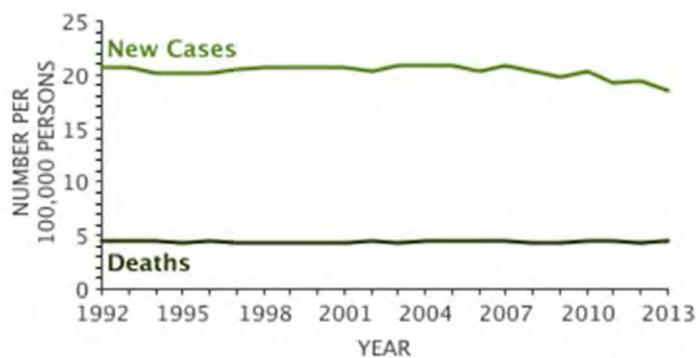


Figure 1: Incidence & Mortalité aux USA entre 1975-2013, toutes races, deux sexes. Ajustées à l'âge. (SEER)

On divise classiquement les tumeurs de vessie en deux groupes : les tumeurs infiltrant le muscle (TVIM, de stade T2, T3, T4) et les tumeurs n'infiltrant pas le muscle (TVNIM, de stade Ta, T1). Lors du diagnostic, plus de 75% des carcinomes urothéliaux sont des TVNIM et 25% des patients présentent une TVIM ou un stade métastatique [4].

L'examen anatomopathologique conventionnel permet d'apprécier l'infiltration (stade TNM) de ces tumeurs et de les grader (en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et cellulaires), ce qui permet d'en évaluer le pronostic. Actuellement, deux classifications sont utilisées en routine, le grade de l'OMS 1973 et celui de l'OMS 2004 récemment revu en 2016 [5]. Toutefois, leur valeur pronostique reste limitée. Ces dernières années, les études à la recherche de nouveaux marqueurs pronostiques ou prédictifs se sont donc multipliées, tout comme la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour les TVIM, lorsque le diagnostic est porté à un stade résécable, la cystectomie radicale précoce avec curage ilio-obturateur bilatéral est la pierre angulaire du traitement. La survie spécifique après cystectomie est relativement faible, se situant de 72% à 5 ans pour les patients ayant une maladie localisée à 48–25 % à 5 ans pour les stades avancés [6]. La survie

globale après cystectomie radicale, est restée quasiment inchangée ces trois dernières décennies [7].

Ce faible taux de guérison après cystectomie suppose que la maladie est déjà au stade micro-métastatique au moment du diagnostic, ce qui plaide en faveur de la prescription de traitements systémiques péri-opératoires afin d'obtenir un meilleur contrôle de la pathologie et d'améliorer la survie. La chimiothérapie néoadjuvante (CNA) a montré ses bénéfices oncologiques [8]. Les données de la littérature ont montré une amélioration de 5 à 10 % de la survie à 5 ans en comparaison avec la chirurgie seule [9]. La survie spécifique à 5 ans chez les patients répondeurs à la CNA est de 90 %, contrastant nettement avec une survie de 30 à 40 % chez les patients non répondeurs [9].

Malgré ce niveau de preuve, la chimiothérapie néoadjuvante à base de cisplatine fait face à une résistance du corps médical. Cette réticence à la prescription d'une CNA est essentiellement due aux préoccupations concernant les patients non répondeurs qui voient leur délai avant cystectomie s'allonger et qui font face aux toxicités du traitement sans bénéfice. Le problème principal est donc notre incapacité à prédire les chances de réponse. En effet, il n'existe actuellement aucun marqueur validé prédictif d'une réponse à la CNA. Il apparaît donc urgent de pouvoir identifier les patients qui bénéficient réellement du traitement par chimiothérapie néoadjuvante.

Alors que l'utilisation de données moléculaires dans la décision thérapeutique est devenue un standard pour la prise en charge de nombreux cancers, le traitement du cancer de la vessie reste à ce jour basé sur le stade et le grade histopathologique [10], [11]. Cependant, la recherche actuelle se concentre sur la définition de sous types moléculaires qui semblent répondre différemment aux traitements systémiques, et notamment à la CNA [12]–[15].

Dans ce travail, nous avons discuté les données actuellement disponibles sur les biomarqueurs prédictifs de réponse à la CNA dans les TVIM et, à l'aide d'outils disponibles en routine, nous avons tenté d'identifier des marqueurs immunohistochimiques ou moléculaires utiles, sur une cohorte rétrospective de TVIM traitées par CNA entre 2009 et 2015 au CHU de Toulouse

## II. GENERALITES

### A. Anatomie de la vessie

La vessie est un réservoir collecteur d'urine, alimenté par les uretères et se vidant par l'urètre. Elle se situe en arrière de la symphyse pubienne, dans la cavité pelvienne. Extérieurement, on la divise en 3 faces : supérieure, antéro-inférieure et postéro-inférieure. De l'intérieur, on distingue 3 orifices : l'orifice urétral (col de la vessie), antérieur et médian, et les orifices urétéraux. Ces trois orifices délimitent une zone triangulaire : le trigone vésical [16] (Figure 2, Figure 3).

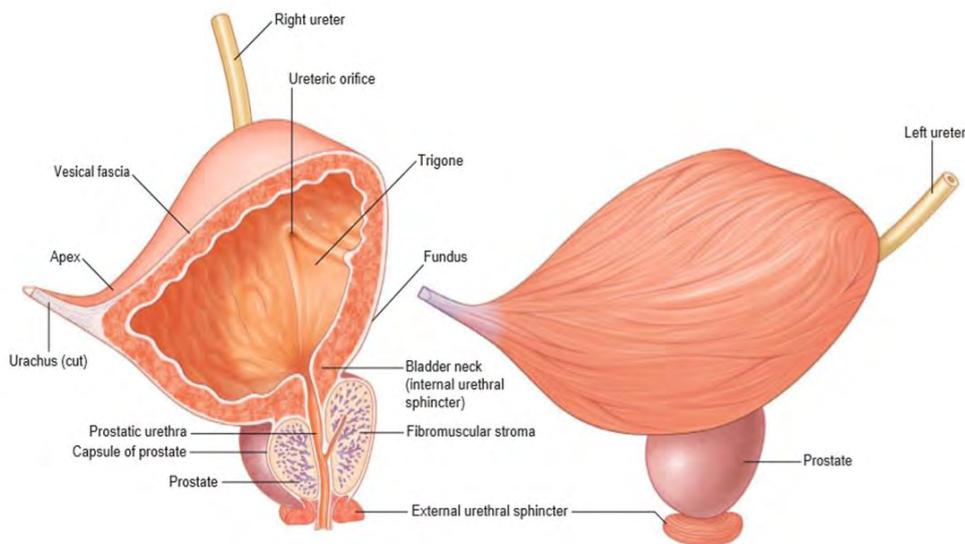


Figure 2: Anatomie de la vessie chez l'homme (Gray's atlas of anatomie-RL Drake).

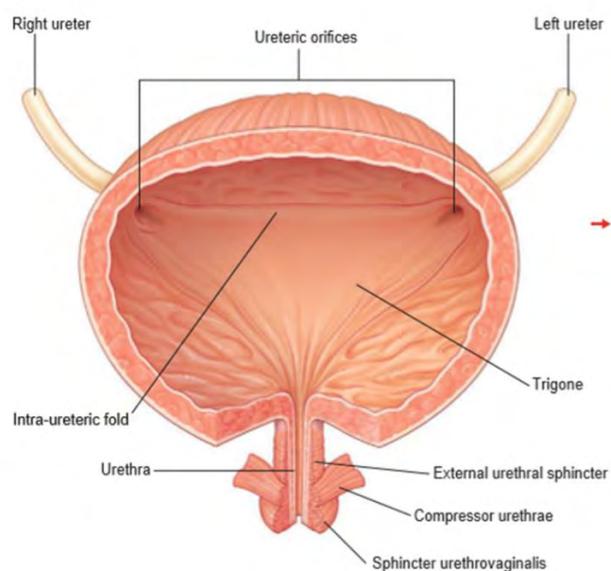


Figure 3: Vue antérieure du mur postérieur de la vessie chez la femme (Gray's atlas of anatomie- RL Drake).

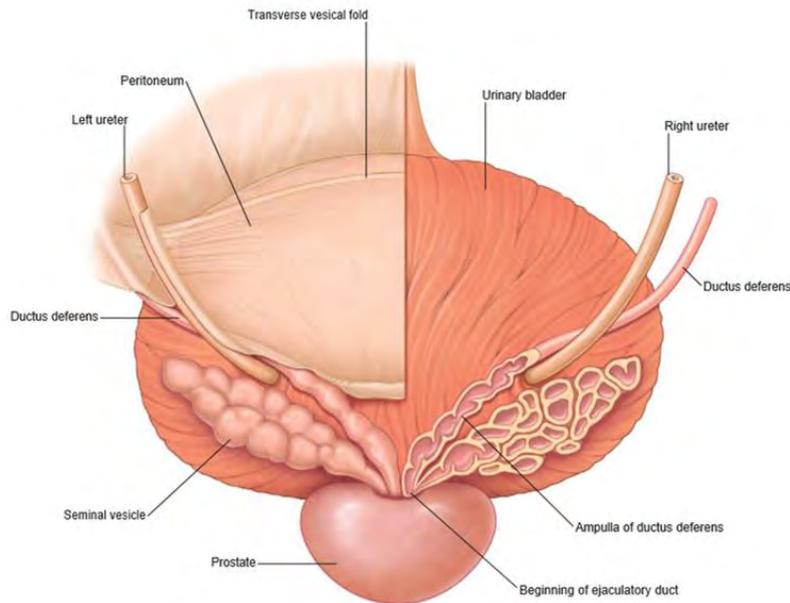


Figure 4: Vue postérieure de la vessie et de la prostate (Gray's atlas of anatomie - RL Drake).

## B. Embryologie et histologie normale de la vessie

### 1. Embryologie

La vessie est essentiellement d'origine endodermique, dérivant du sinus uro-génital qui est issu de la portion caudale de l'intestin primitif, le cloaque. A partir de la fin de la 6<sup>ème</sup> semaine, le cloaque est divisé en deux territoires, le rectum en arrière et le sinus urogénital en avant, qui formera la plus grande partie de la vessie. Le trigone se forme par l'extrophie de l'extrémité caudale des canaux de Wolff (d'origine mésoblastique) à la face postérieure du sinus urogénital. Au cours du développement embryonnaire, l'allantoïde, située à l'extrémité supérieure du sinus uro-génital, régresse pour former l'ouraque. Ce dernier s'atrophie réalisant un cordon fibreux s'étendant de l'ombilic au dôme vésical [17].

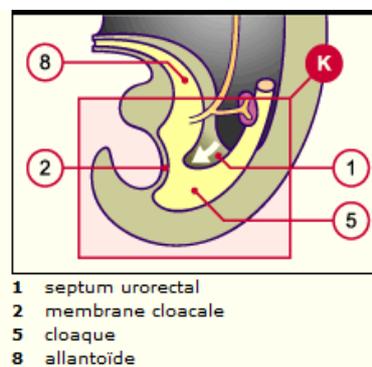


Figure 5: Evolution du cloaque à environ 32jours (. <http://www.embryology.ch/>).

## 2. Histologie

La paroi vésicale est constituée de trois plans distincts : la muqueuse comportant l'épithélium urothélial spécialisé ou urothélium et le chorion, le plan musculaire appelé détroisor et l'adventice recouverte de la séreuse péritonéale en haut et en arrière [18] (Figure 4).

### a) Urothélium

L'urothélium, également appelé épithélium transitionnel, qui borde l'ensemble des voies urinaires de l'urètre aux calices, est constitué de plusieurs assises de cellules (de 3 à 7 assises), reposant sur une membrane basale qui le sépare du chorion (lamina propria). Il est constitué de trois couches de cellules urothéliales : les cellules basales comportant des noyaux non alignés, les cellules intermédiaires ovoïdes, dites en raquette, qui sont en contact avec la membrane basale, avec un grand axe perpendiculaire à la membrane basale, et les cellules superficielles, qui sont directement en contact avec la lumière vésicale. Ces dernières, ont souvent une disposition horizontale, recouvrant les cellules intermédiaires, d'où leur nom de cellules recouvrantes, cellules ombrelles ou cellules en parapluie (Figure 6). Elles présentent un cytoplasme éosinophile, parfois micro vacuolisé et peuvent être multinucléées. Chaque cellule superficielle coiffe plusieurs cellules intermédiaires et elles n'ont aucun contact avec la membrane basale épithéliale. La membrane plasmique de leur pôle apical est riche en uroplakines, ce qui leur confère une très bonne étanchéité vis-à-vis de l'urine. On trouve également au niveau apical un film de sialomucines (glycosaminoglycane) qui constitue le glycocalyx. Au sein de l'assise basale, il existe des cellules endocrines éparses, exprimant les marqueurs des cellules neuro-endocrines (chromogranine A, synaptophysine), capables de sécréter diverses hormones dont la sérotonine et la somatostatine [18].

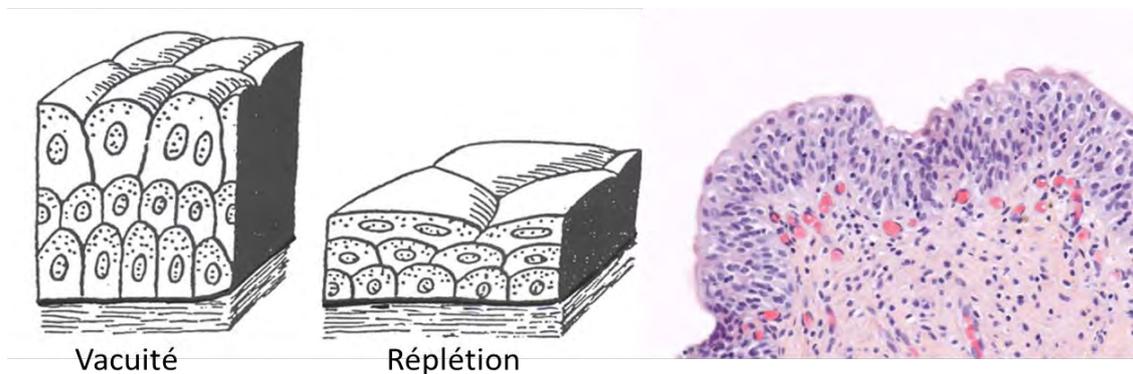
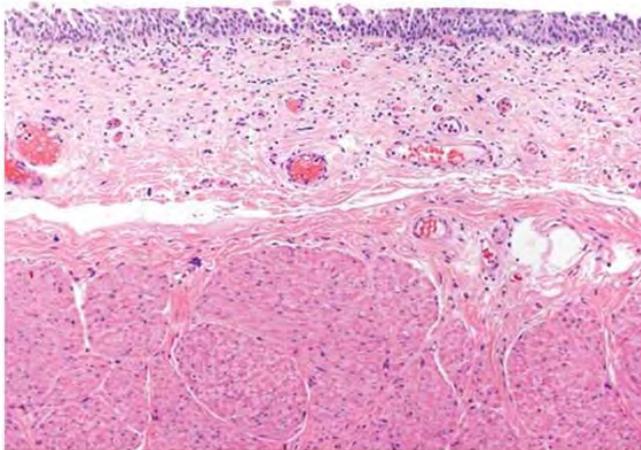


Figure 6: Urothélium normal: schéma en état de réplétion et de vacuité et aspect morphologique (coloration HE 100X).

b) *Le chorion*

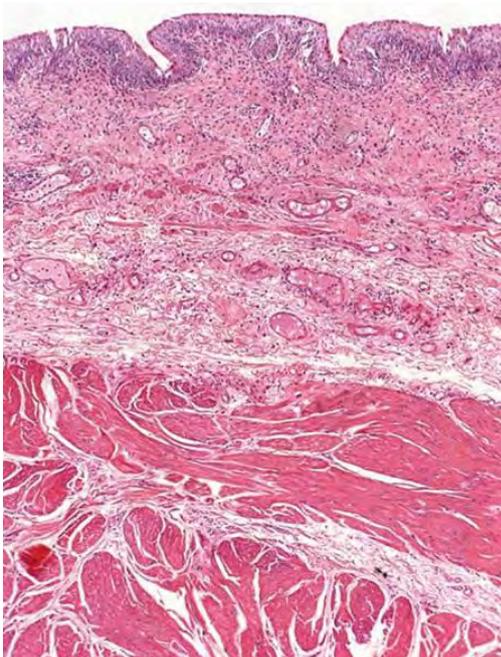
Le chorion (ou lamina propria) est d'épaisseur variable. Il est très mince au niveau du trigone et du col et plus épais au pourtour des orifices urétéraux et sur le dôme (Figure 7). Il comporte deux parties, l'une superficielle, l'autre profonde, qui sont séparées par la musculaire muqueuse ou muscularis mucosae située à mi-chemin entre l'urothélium et la musculature. Il peut parfois renfermer quelques ilots adipeux. Les fibres musculaires de la muscularis mucosae sont fines, groupées en petits faisceaux plus ou moins clairsemés et discontinus. Leur présence est variable en fonction du siège et de la nature des prélèvements. La muscularis



mucosae est souvent épaisse au niveau des orifices urétéraux (en raison d'une intrication avec des faisceaux musculaires provenant des uretères.) Elle est souvent absente sur les prélèvements du trigone (elle ne serait visible que dans la moitié des prélèvements). [18].

Figure 7: Lamina propria (ou chorion) normal (Coloration HE).

c) *Le détrusor*



La musculature vésicale ou détrusor, est constituée de deux couches (longitudinale et circulaire) de faisceaux musculaires lisses entrecroisés. Au niveau du col vésical, la musculature est plus épaisse, il existe un mélange avec les fibres musculaires de l'urètre [18] (Figure 8).

Figure 8 Muscle détrusor ou musculature propre.

d) *L'adventice*

Le tissu adipeux entourant le détrusor correspond à l'adventice, qui est tapissée par la réflexion du péritoine au niveau du dôme et de la face postérieure [18](Figure 4).

e) *Particularités*

Chez la femme, le trigone est recouvert d'un épithélium malpighien non kératinisé et souvent hyperplasique soumis aux influences hormonales cycliques oestrogéniques (Figure 9).

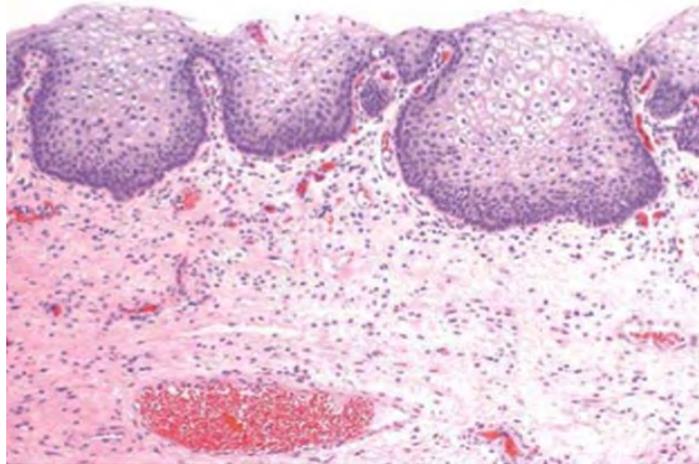


Figure 9: Urothélium du trigone chez la femme : métaplasie malpighienne.

### C. Le carcinome urothélial

#### 1. Epidémiologie

En France le cancer de la vessie est le quatrième cancer le plus fréquent chez l'homme, avec une incidence estimée à 9283 nouveaux cas pour 100000 habitants en 2012 [19]. La prévalence est six fois plus élevée dans les pays développés que dans les pays en développement. Il existe une nette prédominance masculine avec un sex-ratio de 3 à 4 hommes pour une femme. L'âge médian au diagnostic est de 65 – 70 ans [19].

Plus de 90% des carcinomes urothéliaux débutent dans la vessie alors que 5 à 10% sont diagnostiqués dans le haut appareil urinaire [20].

Les tumeurs urothéliales peuvent se présenter initialement selon trois modes anatomo-cliniques :

- dans 70 à 80 % des cas il s'agit de tumeurs n'infiltrant pas le muscle (TVNIM), ce qui correspond aux stades TNM Ta, Tis ou T1. Elles sont alors d'aspect macroscopique papillaire (infiltrant ou non le chorion), uniques ou multiples et présentent un potentiel de malignité

variable, avec un fort taux de récurrence (50 à 70%) mais une progression vers l'infiltration du muscle qui ne se fait que dans 15 à 25% des cas [20].

- dans 30 % des cas il s'agit d'un carcinome invasif d'emblée (TVIM) ou d'un stade métastatique [20].
- Enfin, dans un petit nombre de cas (moins de 5 %), la maladie est initialement découverte au stade de carcinome in situ (CIS) isolé [20].

## 2. Etiologie

De nombreux facteurs environnementaux ont un rôle démontré dans la carcinogenèse du haut ou du bas appareil urinaire [21]. Le principal facteur de risque connu est le tabagisme [1], [22]. Le risque de cancer de la vessie est corrélé à la durée et à l'intensité du tabagisme et le sevrage tabagique réduit progressivement le risque de cancer de vessie dans le temps. Les effets de la cigarette sont liés à de multiples agents chimiques en particulier les amines aromatiques. Plusieurs études épidémiologiques ont aussi rapporté que l'exposition professionnelle aux amines aromatiques (des chauffeurs routiers et des conducteurs de taxis ou de bus, des peintres et des travailleurs de l'industrie chimique) était associée à un risque augmenté de cancer de la vessie [23]. Un antécédent de traitement par radiothérapie peut également être la cause du développement d'un cancer vésical. Les effets mutagènes de l'irradiation pelvienne (irradiation externe de la prostate ou du col de l'utérus) sont associés à un risque augmenté de carcinome urothélial ou de carcinome épidermoïde pur [24]. Enfin, les causes d'inflammation chronique persistante de l'arbre urinaire sont connues pour favoriser des cancers de vessie incluant des carcinomes urothéliaux, des carcinomes épidermoïdes ou des adénocarcinomes. L'infection à *Schistosoma haematobium* en est l'exemple type [25]. Il existe également des syndromes de prédisposition aux cancers urothéliaux comme le syndrome de Lynch. Cette maladie autosomique dominante est due à une mutation des gènes MMR (*mismatch repair*) du système de réparation de l'ADN. Les patients atteints sont prédisposés à certains cancers extra coliques comme les tumeurs endométriales, intestinales, gastriques, ovariennes, hépatobiliaires, cérébrales, cutanées et du tractus urinaire [26].

### 3. Présentation clinique et examens para-cliniques

#### a) Clinique

L'hématurie macroscopique est le signe clinique le plus fréquent. Des signes d'irritation vésicale (pollakiurie, impériosités mictionnelles, brûlures urinaires), en l'absence d'infection urinaire, sont aussi observés dans 20 % des cas [27]. Les patients présentant une volumineuse tumeur, une tumeur du col vésical ou un carcinome in situ extensif présentent plus de symptômes d'ordre irritatif. Les présentations tardives avec de volumineuses masses tumorales peuvent engendrer des symptômes obstructifs, des masses sus-pubiennes palpables ou un œdème des membres inférieurs. Les sites métastatiques les plus fréquents sont le foie, les poumons et l'os [28]. Les localisations au haut appareil ou une présentation rénale ont été associées à un risque métastatique plus élevé, en particulier de métastases pulmonaires. Ces tumeurs du haut appareil peuvent être synchrones ou métachrones d'une tumeur vésicale [29].

#### b) Bilan diagnostic et imagerie

En dehors de la confirmation diagnostique, le bilan initial permet aussi d'évaluer l'infiltration vésicale et de rechercher une extension extra-vésicale locale, régionale ou à distance. Ce bilan comporte des examens cliniques, biologiques, anatomopathologiques et radiologiques.

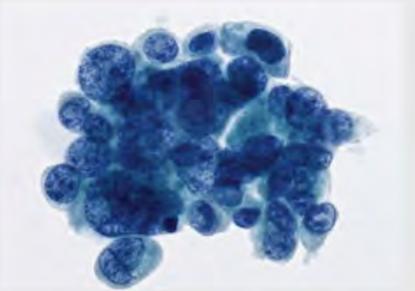
##### (1) La cytologie urinaire

L'examen cytologique des urines n'est pas toujours contributif, en particulier pour le diagnostic de tumeur de bas grade. Il s'agit d'un examen de dépistage ou de surveillance ayant une sensibilité globale de 34 à 55% et une spécificité qui se situe autour de 90% [30]. Cette méthode de screening a pour principal objectif d'éliminer une lésion de haut grade (sensibilité  $\geq 80\%$ ) en détectant les cellules carcinomateuses grâce à leurs caractéristiques morphologiques sur la coloration du Papanicolaou. Les critères et les différentes catégories diagnostiques utilisés en cytologie urinaire ont été formalisés par la Classification de Paris (Tableau 1). Pour les cellules tumorales de haut grade, les principaux critères morphologiques sont résumés dans le Tableau 2. Ils comprennent principalement une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique, un pléomorphisme nucléaire avec un hyper-chromatisme et une irrégularité des contours nucléaires [31]

Tableau 1: Catégories diagnostiques du Paris System pour la cytologie urinaire.

Catégories diagnostiques du Paris System pour la cytologie urinaire
1. Non diagnostic/ insatisfaisant
2. Négatif pour le carcinome urothélial de haut grade (NHGUC)
3. Cellules urothéliales atypiques (AUC)
4. Suspect de carcinome urothélial de haut grade (SHGUC)
5. Carcinome urothélial de haut grade (HGUC)
6. Néoplasie urothéliale de bas grade (LGUN)
7. Autre: cellules malignes autres et lésions variables

Tableau 2: Critères morphologiques de malignité selon le Paris System.

Critères de malignité selon le Paris System	
<ul style="list-style-type: none"><li>- Cellularité : au moins 5 à 10 cellules anormales</li><li>- Rapport Noyau/cytoplasme <math>\geq 0,7</math></li><li>- Noyau hyperchromatique</li><li>- Chromatine grossière ou mottée</li></ul>	

## (2) La cystoscopie

La cystoscopie est utilisée pour le diagnostic des lésions du bas appareil urinaire avec une sensibilité de 87% et une spécificité de 100% [32]. Deux nouvelles technologies ont récemment été introduites pour améliorer la détection des lésions vésicales, et en particulier celle des lésions planes : l'examen en lumière bleue ou photodynamique (Hexvix®) et le Narrow Band Imaging (NBI). L'examen en lumière bleue est réalisé avec utilisation de l'hexaminolévulinate hydrochloride (Hexvix®). Cette technologie améliore significativement la sensibilité diagnostique pour des lésions de stade Ta ou le CIS [33], [34]. La technique Hexvix® est basée sur l'augmentation du contraste visuel entre les cellules bénignes et les cellules malignes de la vessie par l'interaction d'une lumière spécifique (illumination de la vessie en lumière bleue) sur un agent photosensible doté d'une affinité élevée pour les cellules cancéreuses. Une solution d'hexaminolévulinate est instillée dans la vessie, via une sonde vésicale, 60 minutes avant la résection transurétrale de vessie. Après vidange et lavage vésical par gravité suivis d'une première inspection en lumière blanche, l'inspection en lumière bleue avec une source lumineuse au xénon et un filtre (Olympus®) est réalisée. La résection

transurétrale de vessie emporte ensuite toutes les lésions identifiées en lumière blanche et en lumière bleue.

La technologie NBI améliore la visibilité des vaisseaux sanguins de la muqueuse vésicale [35].

#### (3) Marqueurs urinaires

Actuellement, l'analyse moléculaire des urines ne tient pas une place importante au moment du diagnostic initial d'une tumeur urothéliale. Plusieurs marqueurs tumoraux urinaires ont été développés. Ils se basent sur des différences d'expression de protéines, ADN, ou ARN [36]–[38]. Le test Urovysion® basé sur de la FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) est un marqueur prédictif intéressant chez les patients traités chez qui la cytologie retrouve des éléments atypiques. La place de ces marqueurs en pratique courante reste encore à préciser [38], [39].

#### (4) Imagerie

Les techniques de référence pour le diagnostic et la stadification de ces tumeurs sont la cystoscopie et les biopsies ou résections trans-urétrales (RTV). Le scanner et l'IRM ont des sensibilités rapportées de 79 à 89%, ce qui est insuffisant pour remplacer la cystoscopie [40]. De plus, la présence d'un épaissement mural sur le scanner n'indique pas toujours une tumeur infiltrant le muscle et cet examen a une sensibilité très faible pour détecter une infiltration superficielle [40]. Les nouvelles techniques d'IRM peuvent permettre de déterminer le stade, et en particulier de distinguer les tumeurs limitées à la vessie de celles qui infiltrent la graisse péri-vésicale [41].

### D. Anatomopathologie

#### 1. Grades OMS

##### a) *Historique des classifications*

Pour les TVNIM, le facteur pronostic le plus important est le grade. Mais grader les tumeurs urothéliales s'avère parfois difficile, comme le prouve le nombre important de publications et de réunions de consensus internationales à ce sujet. L'histoire a vu se succéder de nombreux grades différents, avec plus d'une dizaine de classifications en 70 ans.

Depuis 1973 et pendant plus de 20 ans, la classification OMS 73 de Mostofi a dominé [42]. Cette classification, basée uniquement sur le degré d'anaplasie cellulaire, comporte 3 groupes G1, G2 et G3 dont la reproductibilité a été largement discutée. En effet, seules les tumeurs G1 et G3 sont facilement identifiables, et ce système a conduit à une forte prévalence de grade 2 (grade intermédiaire). Le grade 1 présente des anomalies architecturales minimales et peu de

figures mitotiques alors que le grade 3 montre un pléomorphisme nucléaire important et des désordres architecturaux marqués avec perte de polarité ainsi qu'une importante activité mitotique. Ce système basé sur des critères morphologiques ne permettait pas de classer les tumeurs en catégories cliniquement pertinentes [43]

En 1998, l'ISUP a défini une nouvelle classification adoptée par l'OMS qui faisait intervenir pour la première fois le terme de tumeur urothéliale papillaire de faible potentiel de malignité (TUFPM) ou PUNLMP (Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential) à côté des carcinomes urothéliaux de bas grade et de haut grade. En 2004, l'OMS et l'AFIP ont publié la nouvelle classification [43] basée sur celle de 1998, en définissant précisément la terminologie, et les critères morphologiques diagnostiques (Figure 10). Ce grade OMS 2004 sépare les tumeurs en haut grade et bas grade en se basant sur l'architecture et les atypies cytonucléaires [44]. La classification ISUP/OMS 2004 a également clarifié le problème des lésions en muqueuse plane qui ont été regroupées à partir d'un système multi-niveaux (atypies légères, modérées, sévères ou CIS) dans un système à deux entrées comprenant seulement la dysplasie et le CIS [44].

*b) Grade OMS/ISUP 2016*

La révision de l'OMS 2016 n'apporte pas de modification notable au système de grading de 2004, à l'exception de l'introduction d'une catégorie de proliférations urothéliales de potentiel malin incertain (Figure 10, Figure 11). Environ 50% des TVNIM sont de bas grade alors que la plupart des TVIM sont de haut grade [5], [45].

OMS 1973	Papillome	Grade 1	Grade 2	Grade 3
OMS 2004	Papillome	PUNLMP	Bas grade	Haut grade

Figure 10: Parallèle entre les grades OMS 1973 et 2004 pour les tumeurs urothéliales papillaires.

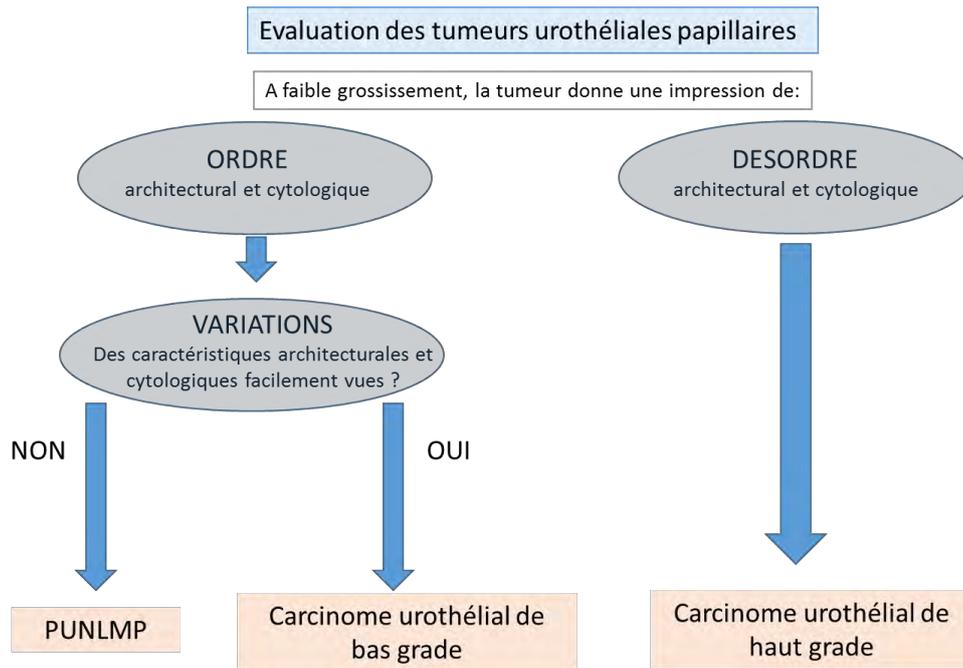


Figure 11: Algorithme pour le grading des tumeurs urothéliales, proposé par l'OMS 2016.

(1) Lésions papillaires

(a) Papillome

Il s'agit d'une lésion bénigne avec un faible risque de récurrence et pas de risque de progression. Cette lésion est papillaire avec un revêtement urothélial d'épaisseur normale, tout à fait comparable à un urothélium normal, reposant sur des axes fibro-vasculaires [5]. La cellularité et la polarisation restent normales (Tableau 6).

(b) Tumeur urothéliale papillaire de faible potentiel de malignité

Elle correspond à une lésion papillaire exophytique dont l'architecture et la polarité cellulaire sont régulières (Tableau 6). L'épithélium est un peu épaissi, sans atypie, avec très peu de mitoses, qui restent essentiellement basales. Cette lésion correspond aux anciens carcinomes de grade 1 (OMS 1973). Les lésions montrant le même type d'aspect en zone plane sont considérées comme une hyperplasie plane [5].

(c) Carcinome papillaire de bas grade

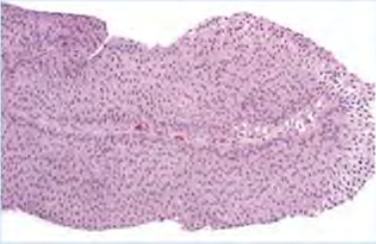
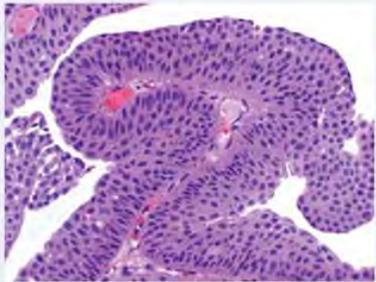
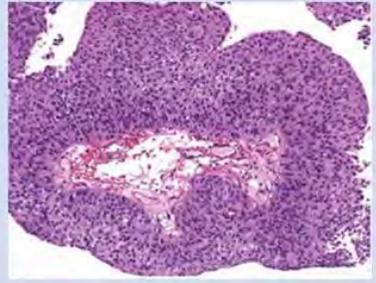
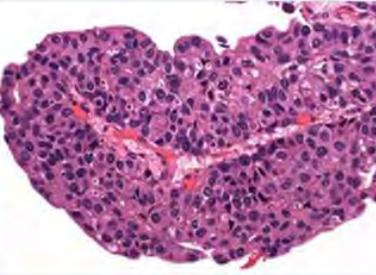
C'est une tumeur papillaire exophytique qui se caractérise par une discrète désorganisation architecturale, avec perte de polarité, parfois sous forme d'enroulement (Tableau 6). Les papilles, d'épaisseur variable, peuvent être fusionnées. Le revêtement urothélial présente des atypies cytologiques légères (nucléomégalie, noyaux allongés, ovalaires, aux contours irréguliers, chromatine irrégulière, assez dense, renfermant parfois des nucléoles). Des mitoses peuvent être observées à tous les niveaux. Ce groupe de lésions regroupe les anciens

carcinomes de grade 1 avec atypies et les grades 2 « de bas grade » de l'OMS 1973. Le même type de lésions rencontrées en muqueuse plane correspond à un urothélium dysplasique [5].

(d) Carcinome papillaire de haut grade

C'est une tumeur papillaire exophytique et/ou endophytique, souvent associée à des lésions planes de CIS et de dysplasie (Tableau 6). Les papilles sont d'épaisseur variable, souvent coalescentes. Elles se caractérisent par la présence d'une désorganisation architecturale avec perte de maturation en surface, des atypies cytonucléaires marquées et de nombreuses mitoses étagées. Les noyaux sont souvent globuleux, hyperchromatiques et nucléolés. Ce groupe de tumeurs correspond aux grades 2 « de haut grade » et aux grades 3 de l'OMS 1973. Le même degré d'atypies cytologiques en muqueuse plane correspond à un CIS [5].

Tableau 3: Résumé des critères diagnostiques des lésions urothéliales papillaires selon l'OMS 2016.

<p><b>Papillome</b></p>	<p>Lésion bénigne avec un faible risque de récurrence et pas de risque de progression.                      Revêtement comparable à un urothélium normal                      Architecture papillaire avec un revêtement d'épaisseur normale                      Axes fibro-vasculaires.                      Cellularité et polarisation normales</p>	
<p><b>Tumeur papillaire de faible potentiel de malignité (LMP)</b></p>	<p>Lésion papillaire exophytique                      Architecture et polarité cellulaire régulières                      Epithélium un peu épaissi, sans atypie,                      Très peu de mitoses (essentiellement basales)</p>	
<p><b>Carcinome papillaire de bas grade</b></p>	<p>Tumeur papillaire exophytique                      Discrète désorganisation architecturale, perte de polarité (parfois sous forme d'enroulement).                      Papilles d'épaisseur variable, +/- fusionnées.                      Atypies cytologiques légères (nucléomégalie, noyaux allongés, ovalaires, aux contours irréguliers, chromatine irrégulière, assez dense, renfermant parfois des nucléoles).                      Mitoses possibles à tous les niveaux.</p>	
<p><b>Carcinome papillaire de haut grade</b></p>	<p>Tumeur papillaire exophytique et/ou endophytique, souvent associée à des lésions planes de CIS et de dysplasie.                      Papilles d'épaisseur variable, souvent coalescentes.                      Désorganisation architecturale avec perte de maturation en surface,                      Atypies cytonucléaires marquées (noyaux globuleux, hyperchromatiques et nucléolés)                      Nombreuses mitoses étagées.</p>	

(2) Lésions planes

(a) Le carcinome in situ

Le carcinome in situ, aussi appelé néoplasie intra-urothéliale de haut grade, est une lésion plane d'épaisseur variable, dépourvue de papille et comportant des cellules morphologiquement malignes (Tableau 4). Il est caractérisé par la présence de cellules aux noyaux augmentés de volume et pléomorphes souvent nucléolés. On observe une perte de polarité (perte de l'arrangement perpendiculaire à la membrane basale des cellules urothéliales), et une irrégularité nucléaire. Les mitoses sont le plus souvent nombreuses, parfois atypiques. Le chorion sous-jacent est congestif et inflammatoire avec des vaisseaux proéminents. Les cellules tumorales peuvent ne pas occuper toute l'épaisseur de l'urothélium. En effet, une infiltration pagétoïde est suffisante pour ce diagnostic. Le CIS est souvent peu cohésif avec des cellules néoplasiques qui desquament dans les urines et un urothélium qui peut apparaître entièrement dénudé ou avec de rares cellules isolées très atypiques (*clinging carcinoma*) [5].

La distinction entre un CIS ou des atypies réactionnelles peut s'avérer très difficile. L'interprétation se fait en fonction du contexte clinique (traitement par BCG, Mytomyline, geste invasif, résections antérieures...) et l'immunohistochimie est souvent peu contributive dans ce contexte. Les remaniements réactionnels se caractérisent par des noyaux uniformément augmentés de taille avec une chromatine fine et homogène et de fin nucléoles. Un infiltrat inflammatoire mixte ou chronique est souvent associé avec une exocytose dans l'urothélium. Des antécédents d'infections urinaires, de calculs, d'instillations intra vésicales ou de sondages confortent le diagnostic.

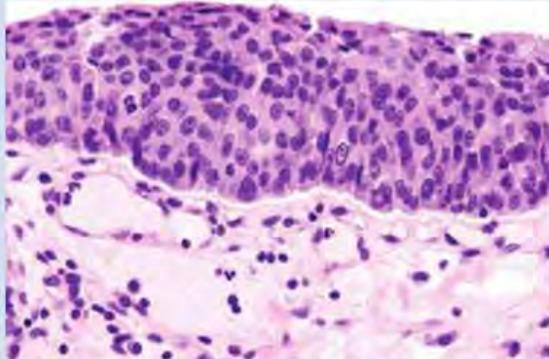
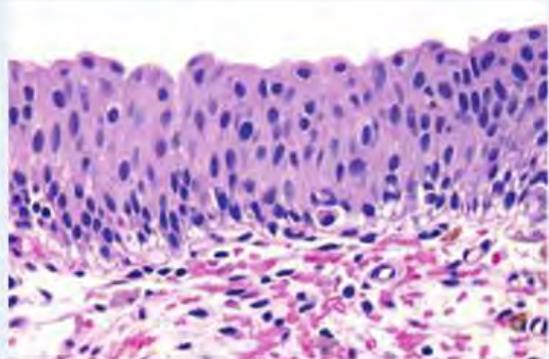
(b) Dysplasie urothéliale

La dysplasie urothéliale est l'entité la plus difficile à définir. Il s'agit d'un diagnostic porté en présence d'aspects cytologiques et architecturaux pré-néoplasiques insuffisants pour le diagnostic de CIS (Tableau 4). On la distingue de l'urothélium normal, de l'urothélium avec atypies réactionnelles, ou de l'urothélium avec atypies de signification indéterminée. Les lésions classées en dysplasie ont une perte de la polarité nucléaire et présentent des cellules légèrement augmentées de taille, irrégulières, souvent en l'absence de contexte inflammatoire. La présence d'un pléomorphisme nucléaire, de noyaux de taille supérieure à celle de 5 à 6 lymphocytes, et d'une forte activité mitotique est plus en faveur du CIS que de la dysplasie [5].

(c) Prolifération urothéliales à potentiel de malignité incertain

Il s'agit de lésions présentant un urothélium épaissi avec peu ou pas d'atypies cytologiques et aucune formation papillaire vraie. On observe un urothélium ondulant (>10 couches) et épaissi, sans papilles. Ces aspects sont rencontrés soit de façon isolée chez un patient ayant un antécédent de carcinome urothélial papillaire, soit à proximité immédiate d'une tumeur papillaire de bas grade [5]

Tableau 4: Résumé des critères diagnostiques des lésions urothéliales planes selon l'OMS 2016.

<b>Carcinome in situ</b>	<p>Néoplasie intra urothéliale de haut grade Lésion plane d'épaisseur variable, sans papille Cellules morphologiquement malignes. (aux noyaux augmentés de volume, pléomorphes, irréguliers, nucléolés) Perte de polarité nucléaire, Mitoses nombreuses, +/-atypiques. Chorion sous-jacent congestif et inflammatoire avec des vaisseaux proéminents. Peu cohésif → cellules néoplasiques desquamant dans les urines. L'urothélium qui peut apparaître entièrement dénudé ou avec de rares cellules isolées très atypiques (clinging carcinoma).</p>	
<b>Dysplasie urothéliale</b>	<p>Entité la plus difficile à définir. Diagnostic porté en présence d'aspects cytologiques et architecturaux pré-néoplasiques insuffisants pour le diagnostic de CIS. A distinguer de l'urothélium normal, de l'urothélium avec atypies réactionnelles, ou de l'urothélium avec atypies de significations indéterminées. Perte la polarité nucléaire Cellules légèrement augmentées de taille, irrégulières Absence de contexte inflammatoire.</p>	

## 2. Stades et Classification TNM

Pour les CU infiltrants, le facteur pronostic le plus important reste le stade TNM [46], basé sur la profondeur de l'invasion tumorale et la présence ou non de métastases ganglionnaires ou à distance (Figure 12). Le stade histologique est parfaitement bien défini pour les pathologistes (Figure 13). Une tumeur pTa ne dépassant pas la membrane basale épithéliale est dite non invasive. Une tumeur pT1 infiltrant le chorion et une tumeur pT2 infiltrant le muscle sont dites tumeurs invasives. Le terme de tumeur superficielle ou tumeur de vessie n'envahissant pas le muscle est un terme uniquement clinique qui regroupe les tumeurs pTa, pT1 et le CIS, qui bénéficieront d'un traitement conservant la vessie. Le terme de tumeur infiltrante ou tumeur de vessie infiltrant le muscle est un terme clinique qui regroupe les tumeurs envahissant et dépassant le muscle détroisor.

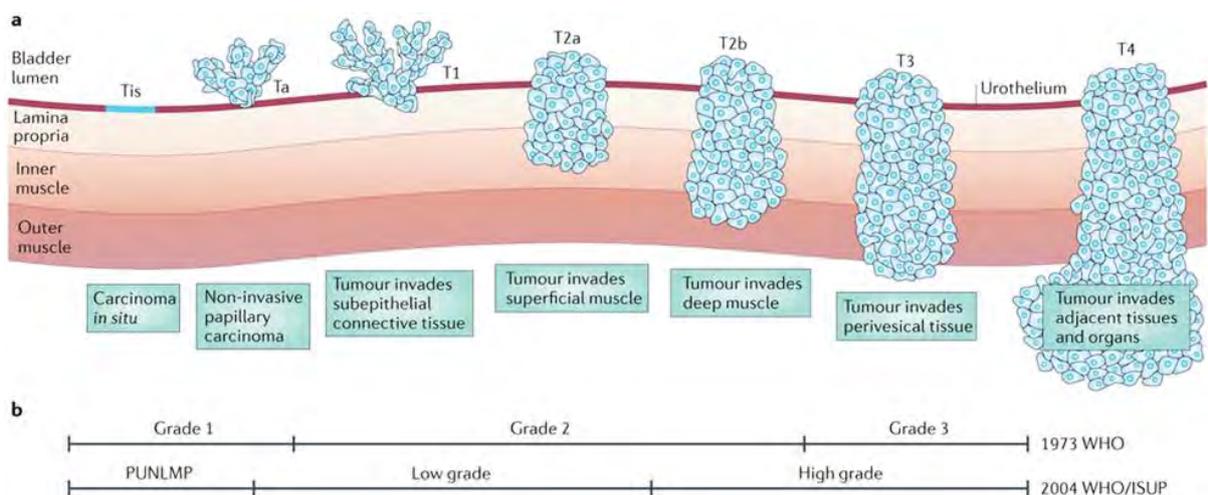


Figure 12: classification TNM et grades 1973 et 2004 des carcinomes urothéliaux (Knowles MA Nature Reviews Cancer 2015).

La cystoscopie est l'étape initiale pour l'évaluation du stade d'infiltration tumorale. Les biopsies ou les résections trans-urétrales réalisées lors d'une cystoscopie diagnostique permettent une confirmation diagnostique et également d'approcher le niveau d'infiltration dans la vessie, ce qui est déterminant avant une chirurgie définitive. Toutefois, l'évaluation du stade pT peut être limitée par la qualité du matériel réséqué ou par des artéfacts dus à l'électrocoagulation. Une RTV adéquate requiert la résection de toutes les tumeurs visibles et

doit intéresser le muscle propre sous-jacent afin de pouvoir déterminer s'il est infiltré ou non. Il est important de pouvoir distinguer l'invasion des petites fibres musculaires discontinues de la musculaire muqueuse (pT1) d'une infiltration des trousseaux musculaires plus volumineux du muscle propre (détrusor) (pT2).

<p><b>T (Tumeur)</b> Tx : tumeur primitive ne pouvant être classée ; T0 : pas de tumeur primitive décelable ; Ta : tumeur papillaire non invasive ; Tis : carcinome <i>in situ</i> : « tumeur plane » ; T1 : tumeur envahissant le chorion ; T2 : tumeur envahissant la musculature ;     ▪ T2a : tumeur envahissant le muscle superficiel (moitié interne),     ▪ T2b : tumeur envahissant le muscle profond (moitié externe) ; T3 : tumeur envahissant le tissu périvésical ;     ▪ T3a : envahissement microscopique,     ▪ T3b : envahissement macroscopique (masse extravésicale) ; T4 : envahissement d'un organe périvésical ou de la paroi ;     ▪ T4a : prostate, utérus ou vagin,     ▪ T4b : paroi pelvienne ou paroi abdominale.</p> <hr/> <p><b>N (Adénopathies régionales)</b> Nx : ganglions non évaluables ; N0 : pas de métastase ganglionnaire. Atteinte des ganglions hypogastriques, obturateurs, iliaques externes ou pré-sacrés :     N1 : un seul ganglion atteint ;     N2 : plusieurs ganglions atteints. Atteinte des ganglions de l'iliaque commune :     N3 : un ou plusieurs ganglions.</p> <hr/> <p><b>M (Métastases à distance)</b>     • M0 Pas de métastase à distance ;     • M1 Présence de métastases à distance.</p>
---

Figure 13: Classification TNM (UICC 2009) des cancers de vessie.

3. Variants histomorphologiques du carcinome urothélial : OMS 2016  
Le carcinome urothélial infiltrant peut présenter une grande variété d'aspects morphologiques avec de multiples différenciations divergentes appelées variants. Les variants reconnus dans l'OMS 2016 [5] diffèrent les uns des autres par leur pronostic et/ou induisent une prise en charge thérapeutique différente.

a) Différenciation épidermoïde

La différenciation épidermoïde est définie par la présence de ponts intercellulaires (cadres clairs) ou de kératinisation. C'est le mode de différenciation le plus fréquemment rencontré,

présent dans 40% à 60% des carcinomes urothéliaux invasifs. La présence d'une différenciation malpighienne sur une biopsie ou une RTV a été associée à un risque plus élevé de maladie localement avancée [47]. Quelques études ont aussi montré que cette différenciation malpighienne est associée à une moins bonne réponse à la radiothérapie ou à la chimiothérapie néoadjuvante [47]–[49].

b) *Différenciation glandulaire*

Elle est définie comme la présence de formations glandulaires dans la prolifération tumorale. Décrite dans 18% des cas, il s'agit le plus souvent d'une différenciation de type intestinale. Du point de vue immunohistochimique ces carcinomes montrent une acquisition du CDX2 et une positivité de la CK20. Aucune signification pronostique n'a été retrouvée à ce jour [5].

D'autres variants moins fréquents ont été décrits.

c) *Différenciation trophoblastique*

Une différenciation trophoblastique est rare. Elle se caractérise par la présence de cellules géantes ressemblant au syncytiotrophoblaste. En immunohistochimie, 35% des cas expriment le  $\beta$ HCG. Cette expression est corrélée aux stades et grades plus élevés [5].

d) *Carcinome urothélial en nids*

Il s'agit du « nested variant » des anglo-saxons, très agressif. Il se compose de petits massifs, ou nids tumoraux infiltrant la paroi vésicale. En surface, l'épithélium reste plan et non atypique. Les massifs tumoraux, réguliers, peuvent être confondus avec les îlots de Von Brunn. Il s'agit de nids cellulaires arrondis, ovoïdes entourés de membrane basale. Les cellules sont relativement régulières et peu atypiques [5].

e) *Carcinome microkystique*

Ce variant agressif se rapproche du CU en nids. Il comporte des images de cavitation kystique des nids. La difficulté diagnostique est de savoir faire la différence avec une lésion bénigne de type cystite kystique ou une métaplasie néphrogénique [5].

f) *Carcinome micro papillaire*

Caractérisé par de petits amas épithéliaux ou des micros papilles présentant des artéfacts de rétraction autour des massifs tumoraux. Il représente 0,6 à 2,2% des CU. Sa morphologie rappelle les carcinomes papillaires séreux de l'ovaire. L'OMS ne définit pas de seuil minimum pour le pourcentage de morphologie micro papillaire nécessaire au diagnostic de ce variant. Seule une zone de morphologie micro papillaire même inférieure à 10% de la surface tumorale suffit à ce diagnostic. Il s'agit toujours d'une tumeur de très haut grade, de stade avancé, dont

le pronostic est sombre. Ce variant est fréquemment associé à du carcinome in situ (dans près de 50% des cas), à des embolies vasculaires, ou à des métastases ganglionnaires [5].

g) *Carcinome de type lymphoépithélial*

Ces cas ressemblent au carcinome lymphoépithélial du nasopharynx. Ils comportent un contingent urothélial minoritaire de haut grade entouré d'un abondant stroma inflammatoire, riche en lymphocytes B et T, en plasmocytes, histiocytes et polynucléaires neutrophiles. Les formes lymphoépithéliales prédominantes ou pures sont associées à un meilleur pronostic. Elles répondent à la chimiothérapie et peuvent bénéficier d'un traitement conservateur [5].

h) *Carcinome plasmocytoïde*

Constitué de cellules tumorales isolées d'aspect plasmocytoïde, au noyau excentré et au cytoplasme abondant et éosinophile, situées dans un stroma souvent lâche ou myxoïde. Ce variant, agressif, est de mauvais pronostic et montre une forte propension à l'envahissement péritonéal [5].

i) *Carcinome à cellules géantes*

Il s'agit d'un variant rare souvent associé à du CU conventionnel. Le contingent pléomorphe se constitue de cellules géantes très atypiques. Les mitoses sont nombreuses. On observe fréquemment une invasion de la musculature et de la nécrose [5].

j) *Carcinome urothélial riche en lipides*

Caractérisé par des cellules de grande taille « *lipoblaste-like* », avec des vacuoles cytoplasmiques formant des indentations du noyau. Seuls 37 cas ont été décrits dans la littérature. Le pronostic est sombre [5].

k) *Carcinome urothélial à cellules claires*

Le carcinome urothélial à cellules claires est constitué de cellules au cytoplasme clair riche en glycogène, proches de celles observées dans le carcinome rénal à cellules claires. Il s'agit d'un variant très rare dont le pronostic n'est pas connu [5].

l) *Carcinome urothélial sarcomatoïde*

Ce variant survient chez l'homme et la femme à un âge avancé (7<sup>ème</sup> ou 8<sup>ème</sup> décennie). Il représente 0,6% des carcinomes urothéliaux. Les principaux facteurs de risque connus sont l'irradiation et le traitement par cyclophosphamide. Le contingent à cellules fusiformes peut n'être qu'une inflexion partielle d'un carcinome urothélial, mais en général, il constitue la totalité de la masse tumorale. Macroscopiquement, ces tumeurs forment de gros bourgeons polypoïdes saillants dans la lumière vésicale. Histologiquement, il peut exister un contingent

urothélial fait de massifs carcinomateux plus ou moins abondants et difficiles à identifier. Le contingent fusiforme est d'abondance et d'aspect variables, uniforme, épithélioïde, ou prenant une différenciation hétérologue de type chondrosarcome, ostéosarcome ou plus rarement de type rhabdomyosarcome ou léiomyosarcome. Le contingent sarcomatoïde peut conserver une expression des cytokératines de haut poids moléculaire, de p63 ou de GATA3. Les carcinomes à cellules fusiformes sont très agressifs et leur évolution est défavorable, avec apparition rapide de métastases pulmonaires ou hépatiques et une survie à 5 ans de 20% avec une médiane de survie globale à 14 mois [5].

*m) Carcinome peu différencié*

Cette entité comprend les tumeurs de morphologie mixte, sarcomatoïde, à cellules géantes, ou indifférenciées.

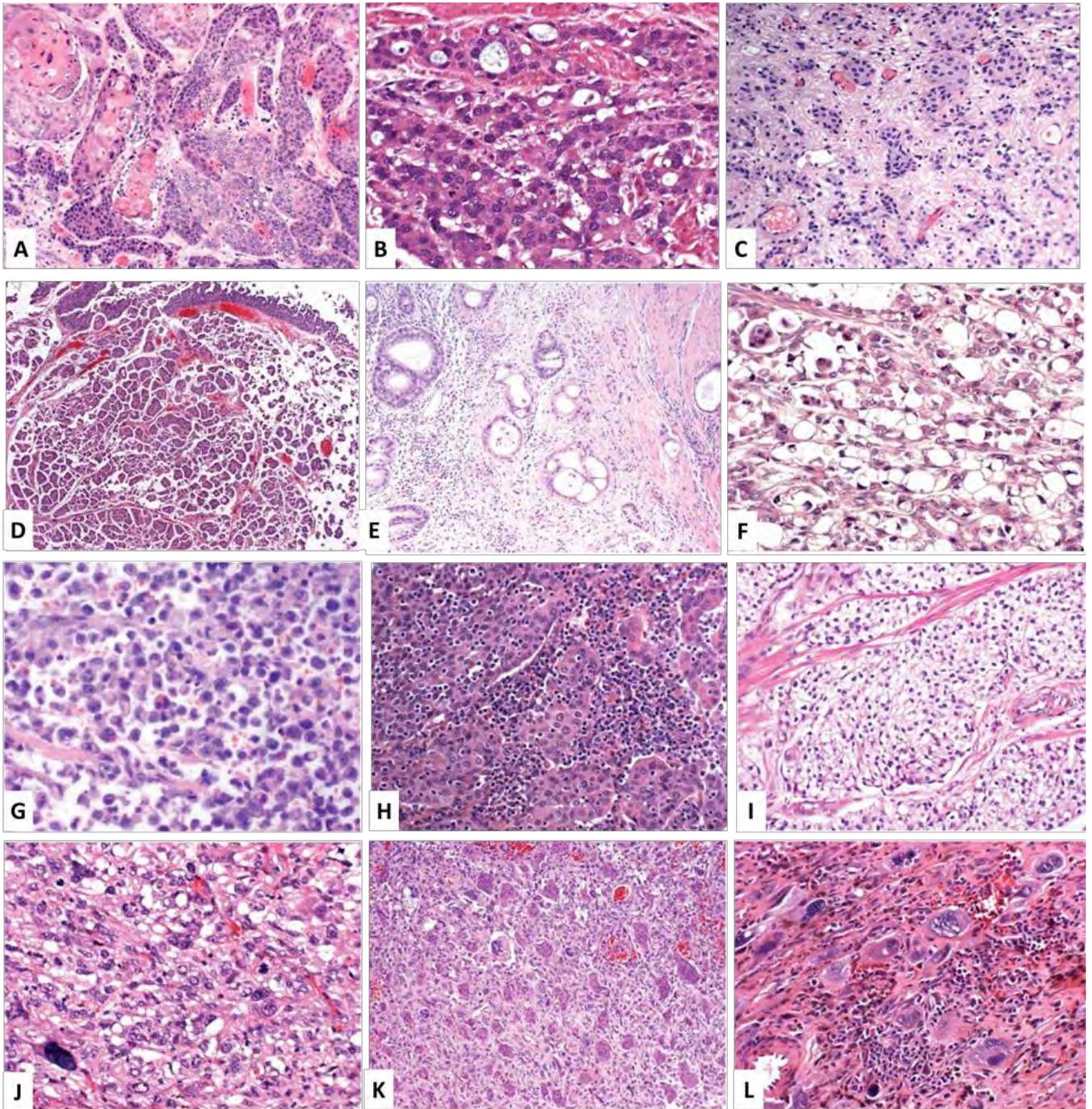


Figure 14: Variants morphologiques de carcinome urothélial. A.épidermoïde; B.glandulaire; C. forme en nids; D. micropapillaire; E.microkystique; F. riche en lipides; G. plasmocytoïde; H. lymphoépithélial; I.à cellules claires; J.sarcomatoïde; K.trophoblastique; L. à cellules géantes. (Bladder Pathology, Liang Cheng, 2012).

#### 4. Immunophénotype

L'immunohistochimie est une aide importante au diagnostic des carcinomes urothéliaux infiltrants, mais est également en passe de devenir un outil pronostique voire théranostique [50]. Pour bien comprendre l'intérêt des différents marqueurs utilisés, il est utile de connaître l'immunophénotype de l'urothélium normal, et les marqueurs associés à la différenciation urothéliale (Figure 15). L'immunoréactivité typique de l'urothélium normal montre une positivité de la CK20 limitée aux cellules superficielles (cellules ombrelles) tandis que les marquages par le CD44 et la CK5/6 ne sont positifs que dans les couches basales de l'urothélium. Le facteur de transcription GATA3 est positif sur toute l'épaisseur de l'urothélium normal [51].

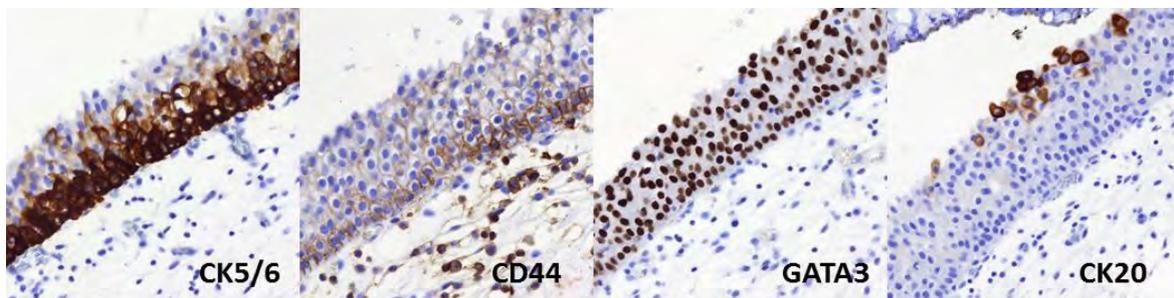


Figure 15: Marqueurs immunohistochemiques de la différenciation urothéliale.

##### a) Intérêt diagnostique

Dans le cadre du diagnostic des carcinomes urothéliaux infiltrants, et en particulier lorsque se pose le problème du diagnostic différentiel avec un autre carcinome, comme un adénocarcinome prostatique peu différencié, le profil immunohistochemique permet de résoudre la question dans la majorité des cas. L'uroplakine III a longtemps été considérée comme le marqueur le plus spécifique d'une différenciation urothéliale mais a une sensibilité assez faible de 19 à 60% [52]. Plus récemment, l'uroplakine II a montré une spécificité équivalente pour une sensibilité meilleure de 63 à 77%. [51], [53].

GATA3 est un marqueur nucléaire, exprimé dans 67 à 90% des carcinomes urothéliaux [54]–[56]. Ce facteur de transcription est également exprimé par les lymphocytes T régulateurs et de nombreux autres carcinomes, en particulier d'origine mammaire [57].

L'utilisation de marquages immunohistochemiques est un outil pouvant également aider à la détermination du niveau d'infiltration tumorale. Un marquage par un anticorps anti-pan-cytokératine ou anti-cytokératine 7 (CK7) est alors le plus souvent utilisé. En effet, la CK7 est

positive dans près de 100% des cas et la CK20 dans 67% des cas. On note cependant que près de 14% des CU de haut grade n'expriment ni CK7 ni CK20 [58].

Les cytokératines de haut poids moléculaire (comme 34βE12 ou CK5/6) sont aussi parfois utiles car elles sont exprimées dans beaucoup de CU de haut grade. La protéine p63 (exprimée dans 81 à 92% des cas) est un autre marqueur utile au diagnostic différentiel [59].

Concernant le diagnostic de CIS, l'utilisation de marquages anti p53 et CK20 associés à un marquage par le Ki-67 permet d'orienter vers un diagnostic de malignité *versus* un aspect réactionnel ou dysplasique. En situation normale, la CK20 est limitée aux cellules ombrelles en superficie, alors que dans le CIS le marquage est le plus souvent présent sur toute l'épaisseur de l'urothélium [51]. De plus, le CIS montre un index de prolifération élevé, bien objectivé par un marquage par le Ki-67. Et Il existe classiquement un marquage fort et diffus par la p53 [58].

#### b) *Intérêt pronostique et théranostique*

La recherche d'un panel de biomarqueurs immunohistochimiques, applicable en routine, sur un matériel fixé au formol et inclus en paraffine (*formalin fixed and paraffin embedded* - FFPE), et ayant une valeur pronostique ou prédictive de la réponse à la chimiothérapie est toujours en cours. L'équipe de *Baras et al* a par exemple trouvé deux marqueurs immunohistochimiques (GDPD3 et SPRED1) prédictifs de la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante [60].

Il serait notamment intéressant de pouvoir, comme en sénopathologie, classer les tumeurs de façon simple, grâce à l'immunohistochimie, dans les groupes luminal et basal décrits en biologie moléculaire (*cf infra*).

## 5. Données moléculaires

### a) *Introduction :*

Les techniques à notre disposition à l'heure actuelle permettent d'acquérir différents types de données :

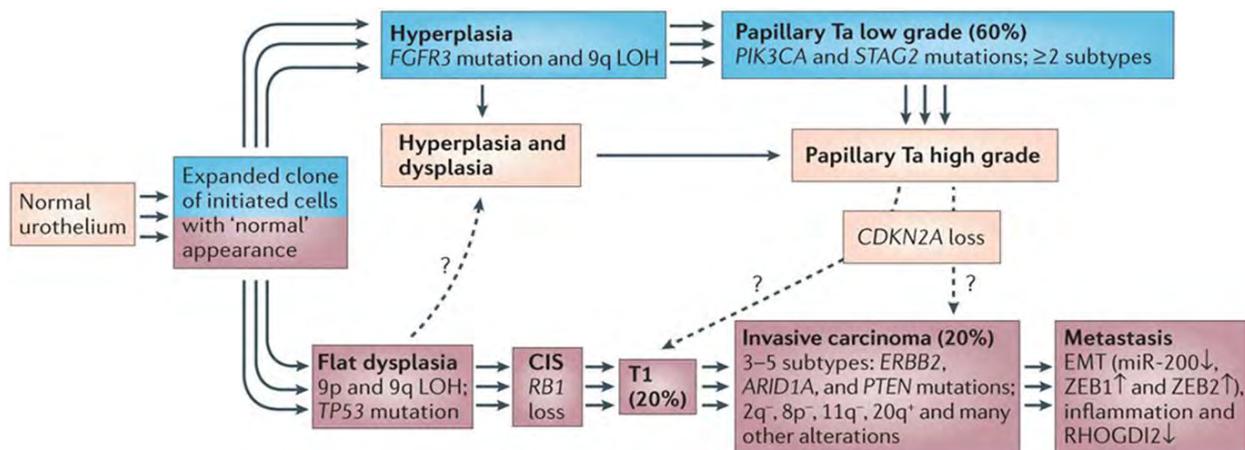
- les données du génome : CGH array, SNP array, Whole Genome Sequencing, Exome Sequencing ;
- les données du transcriptome : cDNA array, RNASeq ;
- les données du protéome : RPPA, immunohistochimie (IHC).

Ces données permettent d'établir des classifications à différents niveaux (génomique, transcriptomique et protéique).

Après une brève description des voies de la carcinogénèse urothéliale et des mutations géniques les plus fréquemment retrouvées dans les CU, nous aborderons les différents groupes moléculaires publiés. Nous terminerons par la description des deux principaux grands groupes moléculaires de carcinomes urothéliaux que sont les tumeurs de type basal et luminal.

b) *Multiplés voies de cancérogenèse*

Les données actuelles montrent que les tumeurs urothéliales se développent à travers au moins deux voies de cancérogenèse différentes (Figure 16). Ces voies passent soit par les tumeurs papillaires superficielles de type TVNIM soit par le CIS avant d'évoluer vers les TVIM [61]. Selon ce modèle, les tumeurs de vessie peuvent donc être classées en papillaires et non papillaires uniquement sur la base d'altérations génétiques différentes. Parmi les mutations les plus fréquentes on retrouve les mutations activatrices de FGFR3 dans les tumeurs papillaires et les mutations inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeur tels que TP53 et RB1 dans les tumeurs non papillaires, invasives [15].



Nature Reviews | Cancer

Figure 16: Modèle des deux voies potentielles de carcinogénèse urothéliale. (Knowles MA, Nature Reviews cancer 2015)

c) Spectre mutationnel : données du génome

Les données de séquençage [15] ont permis d'identifier des mutations récurrentes de gènes tels que TP53, FGFR3, PI3KCA, RB1, et HRAS. Les mutations activatrices de FGFR3 et inactivatrices de TP53 sont les plus fréquemment observées (Tableau 5 et Figure 17).

Des altérations moléculaires différentes ont été caractérisées dans les TVNIM d'une part et dans le CIS et les TVIM d'autre part. Les tumeurs papillaires de bas grade (TVNIM) ont le plus souvent des mutations activatrices de récepteurs tyrosine kinase (RTK) de la voie Ras, telles que les mutations de FGFR3. Les tumeurs Ta de haut grade sont caractérisées par une délétion homozygote de P16INK4A. Les lésions de CIS et les tumeurs invasives (TVIM) ont des mutations de la voie TP53 et de RB.

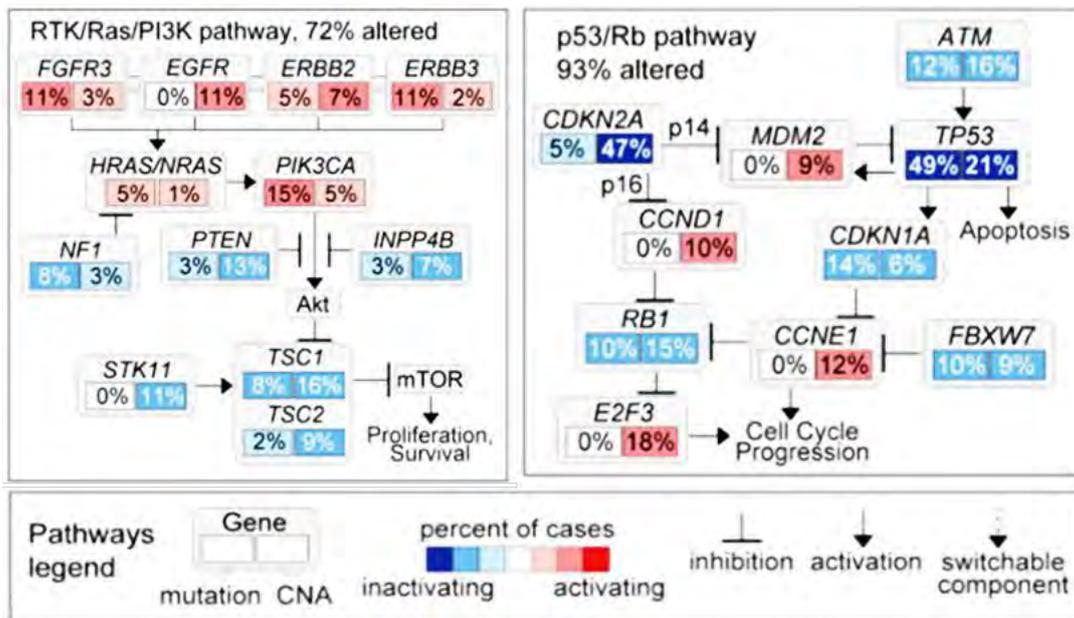


Figure 17: Voies de signalisation altérées dans les carcinomes urothéliaux. Mutations somatiques et altérations du nombre de copies dans les voies p53/Rb et RTK/RAS/PI3K. (Rouge : mutations activatrices ; Bleu : mutations inactivatrices) Adapté du TCGA research network [15].

Tableau 5: Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur les plus fréquemment altérés dans les carcinomes urothéliaux (d'après Knowles MA et Hurst DC, Nature reviews cancer 2015).

<b>Oncogènes altérés dans les carcinomes urothéliaux</b>						
<b>Gène</b>	<b>Chromosome</b>	<b>Altération dans les TVNIM de bas grade</b>	<b>Fréquence</b>	<b>Altération dans les TVIM (≥pT2)</b>	<b>Fréquence</b>	<b>Fonction de la protéine codée</b>
FGFR3	4p16	mutation ponctuelle surexpression	60 - 70% 80% (protéine)	mutation ponctuelle surexpression	5 - 20% 40% (protéine)	RTK
PIK3CA	3q26	mutation ponctuelle	25%	mutation ponctuelle	9 - 20%	sous-unité catalytique α de PI3K
AKT1	14q32	mutation ponctuelle	1 - 3%	mutation ponctuelle	1 - 3%	serine-threonine kinase
NRAS	1p13	mutation ponctuelle	1 - 2%	mutation ponctuelle	1 - 2%	GTPase cytoplasmique
HRAS	11p15	mutation ponctuelle	5 - 10%	mutation ponctuelle	5 - 6%	GTPase cytoplasmique
KRAS	12p12	mutation ponctuelle	5%	mutation ponctuelle	5%	GTPase cytoplasmique
EGFR	7p12	surexpression	20% (protéine)	surexpression	50%	RTK
ERBB2	17q12	NI	NI	amplification surexpression mutation ponctuelle	5 - 14% 8 - 30% (protéine) 8%	RTK
<b>Gènes suppresseurs de tumeurs avec perte de fonction dans les carcinomes urothéliaux</b>						
CDKN2A	9p21	délétion hémizygote délétion homozygote mutation ponctuelle	50 - 60% 15% NI	délétion hémizygote délétion homozygote mutation ponctuelle	50 - 60% 20 - 30% 5%	code pou p16 et p14 ARF, CDKI
MDM2	12q14	amplification	3%	amplification	4 - 5%	E3 ubiquitine ligase, cible p53
RB1	13q14	mutation inactivatrice	NI	mutation inactivatrice	11 - 13%	régulateur du cycle cellulaire
TP53	17p13	mutation inactivatrice surexpression	0 - 14% ≤10%	mutation inactivatrice surexpression	24 - 56% 30 - 50%	facteur de transcription, réponse au stress, apoptose

NI non connu, FGFR fibroblast growth factor receptor, PI3KCA phosphatidyl inositide tri phosphate sous unité α, EGFR epidermal growth factor receptor.

(1) FGFR3

Parmi les mutations les plus fréquentes, on trouve les mutations activatrices du gène FGFR3 qui active la voie de signalisation FGFR3/RAF/RAS. Elles ont été décrites dans 74% des TVNIM de bas grade et dans 5 à 20% des TVIM [62].

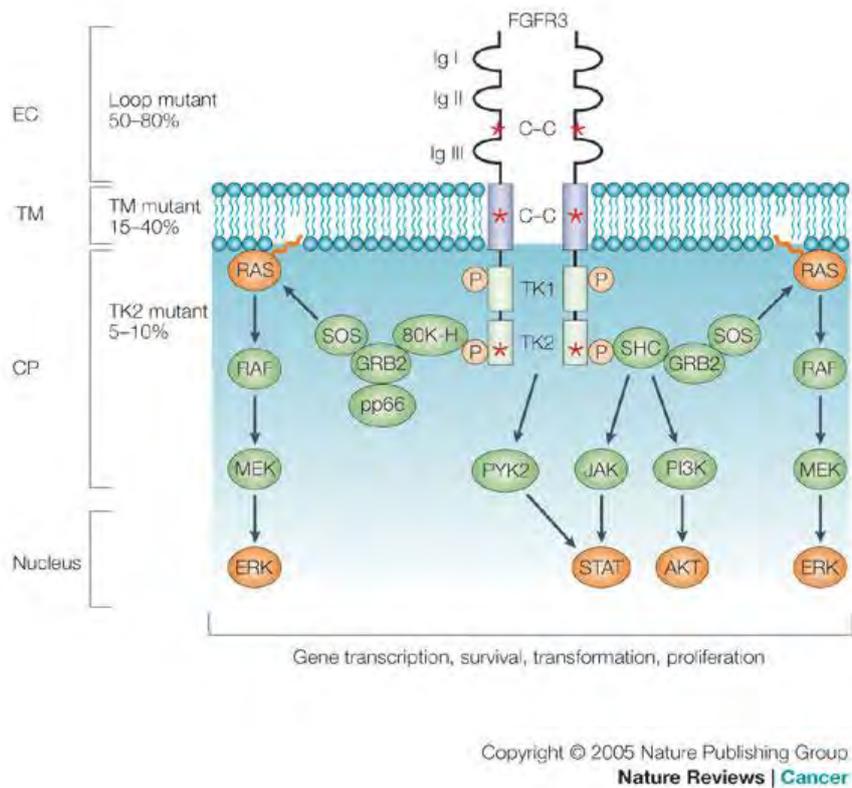


Figure 18: Récepteur FGFR3 et voies de signalisation en aval

Le récepteur FGFR3 est un membre de la famille des FGFR (FGFR1- 4), récepteurs à activité Tyrosine kinase activant la voie RAS/MAPK et/ou PI3K. Ces voies sont impliquées dans l'embryogenèse et différents processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la migration, l'angiogenèse et l'apoptose. La structure des récepteurs FGFR est commune. Ils comportent un domaine extracellulaire, constitué d'un résidu hydrophobe amino-terminal et de trois domaines immunoglobuline-like, un domaine hydrophobe transmembranaire, et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase (Figure 18). Les ligands (FGFs) se fixent aux domaines extracellulaires Ig-like II et III, entraînant ainsi l'activation du récepteur par homo-dimérisation et trans phosphorylation de résidus tyrosine intracellulaires puis l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires en aval (Figure 18). Dans les CU, les mutations les plus fréquentes de FGFR3 sont celles qui ajoutent un résidu cystéine dans le domaine extracellulaire (S249C, Y375C, R248C, G372C) créant ainsi des

ponts disulfures intermoléculaires et la dimérisation du récepteur (Figure 19). Les mutations de RAS et FGFR3 sont mutuellement exclusives. Quatre-vingt-deux pourcents des tumeurs Ta de bas grade sont mutées pour l'un ou l'autre de ces deux gènes.

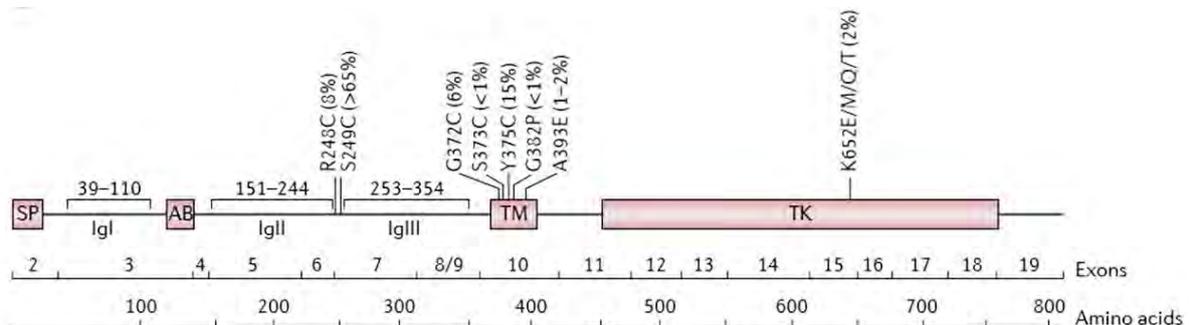


Figure 19: **FGFR3**. Représentation schématique de la protéine et de la position des exons correspondants. Les codons présentant des mutations ponctuelles activatrices et leur fréquence relative en pourcentage des mutations rapportées dans la littérature sont indiqués. FGFR3 comporte les domaines suivants : signal peptide (SP); acid box (AB); immunoglobulin-like domains IgI, IgII and IgIII; transmembrane (TM) region and tyrosine kinase (TK). Selon Knowles MA (Nature Reviews Cancer 2015).

### (2) TP53

Un autre gène très fréquemment muté est le gène TP53 qui code pour la protéine p53 ayant un rôle central dans la régulation du cycle cellulaire. Elle inhibe la transition de la phase G1 à la phase S, par activation de la transcription de p21. Les mutations inactivatrices de TP53 entraînent donc la perte de son rôle suppresseur de tumeur. Alors que la protéine p53 normale a une demi-vie courte de 30 minutes, qui prévient son accumulation dans le noyau, la protéine p53 mutée est résistante à la dégradation par la voie ubiquitine et s'accumule. Cette accumulation est détectable par immunohistochimie. Plusieurs études rétrospectives ont montré la valeur pronostique de la surexpression de p53 dans les carcinomes urothéliaux [63], [64].

### (3) Rb

La protéine Rb interagit avec des protéines impliquées dans la transition G1-S du cycle cellulaire. A l'état déphosphorylée, elle séquestre le facteur de transcription E2F. Lorsque Rb est phosphorylée (par des Kinases cycline dépendantes), E2F est libéré et induit la transcription de gènes nécessaires à la synthèse de l'ADN. Des mutations inactivatrices de Rb, entraînant une perte d'expression, sont décrites dans les CU et sont associées à un mauvais pronostic [65].

d) *Sous types moléculaires/ classification moléculaire*

(1) Parallèle avec la classification moléculaire des cancers du sein

Concernant les tumeurs solides, les premiers travaux ayant utilisé des techniques de cDNA microarray ou « *genome mRNA expression profiling* » ont été effectués en 2000 par l'équipe de *Perou* dans les cancers mammaires [66]. Ils ont établi que les tumeurs mammaires pouvaient être divisées en sous-groupes moléculaires distincts (Claudin-low, basal, HER2+, luminal A, et luminal B) sur la base de leur profil d'expression génique. Les biomarqueurs associés à ces groupes intrinsèques sont communs avec les cellules épithéliales mammaires normales à différents stades de différenciation. Les tumeurs de type basal expriment des biomarqueurs que l'on retrouve normalement exprimés par la couche basale de l'épithélium glandulaire normal alors que les tumeurs HER2+ et lumbales expriment des biomarqueurs de différenciation [67].

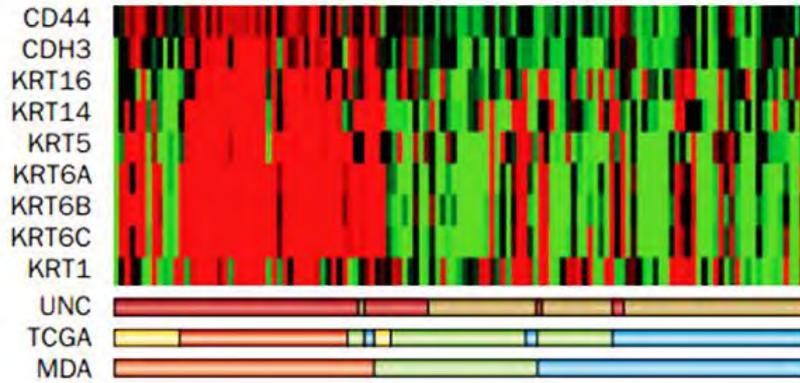
Cette publication des portraits moléculaires des cancers du sein a révolutionné l'approche de la pathologie mammaire [66]. En classant les tumeurs en fonction de profils d'expression des gènes, les auteurs ont ouvert la voie à une approche complètement nouvelle de la diversité des cancers du sein. En 10 ans, cette classification moléculaire a été affinée et des tests génomiques ont été développés pour prédire l'évolution métastatique des patientes ou la réponse tumorale au traitement [68]. Ces connaissances ont ensuite pu être transposées au matériel et aux outils utilisés quotidiennement par les pathologistes, c'est-à-dire aux tissus FFPE et à l'analyse morphologique et immunohistochimique des tumeurs.

De même, plus de dix ans après la pathologie mammaire, la pathologie vésicale bénéficie de l'apport de ces différentes techniques moléculaires.

(2) Profiling moléculaire des cancers de vessie : Données transcriptomiques

La classification transcriptomique repose sur l'analyse simultanée du niveau d'expression des ARN messagers de milliers de gènes dans une même tumeur (Figure 20). Le regroupement des différentes tumeurs se fait ensuite en fonction de leur profil d'expression génique [69]. Plusieurs équipes ont utilisé le « *whole genome expression profiling* » pour classer les tumeurs urothéliales en sous-types moléculaires distincts (Figure 20 et Tableau 6) [12]–[15], [70]. Elles ont toutes montré des similitudes importantes avec les groupes décrits dans les cancers mammaires [13].

**Basal markers**



**Luminal markers**

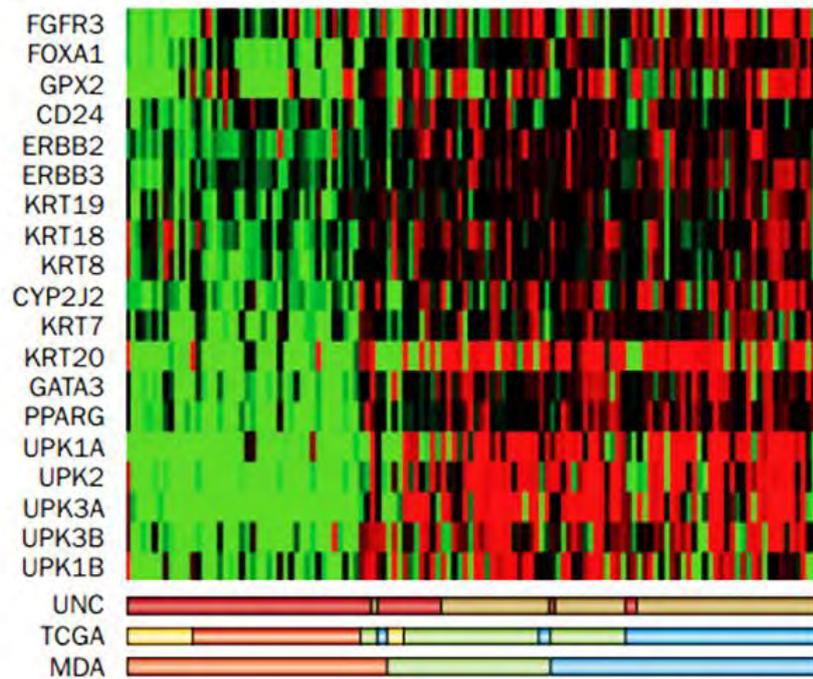


Figure 20: Principaux biomarqueurs associés aux sous types moléculaires luminal et basal. Données issues du RNASeq de l'étude du TCGA. (MDA, MD Anderson Cancer Center; TCGA, The Cancer Genome Atlas; UNC, University of North Carolina).

Tableau 6: Résumé des différentes classifications moléculaires décrites dans les carcinomes urothéliaux.

Publications/Equipes/ Année	Nombre de groupes identifiés	Noms des Groupes décrits
A. Damrauer & al / UNC/ 2014	2	- Basal (+ claudin low) - Luminal
B. Choi W& al/ MDA /2014	3	- Basal - Luminal - P53-Like
C. TCGA/ 2014	4	- Cluster I - Cluster II - Cluster III - Cluster IV
D. Sjödaahl & al / Lund (Suède) / 2012	5	- Urobasal A - SCCL (squamous cell cancer like) - Genomically unstable - Urobasal B - Infiltrated

*Lindgren et al*, sont les premiers à avoir utilisé le regroupement hiérarchique du niveau d'expression des gènes dans la vessie et ont d'abord proposé deux sous-groupes intrinsèques de carcinome urothélial : le groupe MS1 et le groupe MS2 [71].

L'équipe de *Volkmer et al* a ensuite décrit de nouveaux sous types moléculaires de carcinomes urothéliaux en utilisant, elle aussi, les données d'expression génique des tumeurs primitives. Ces sous-types étaient basés sur les déterminants moléculaires de la différenciation tumorale : basale, intermédiaire, ou différencié [72]. Dans leur étude, les CU de différenciation basale (définis par une positivité de la CK14 et de la CK5, et une négativité de la CK20) avaient une survie globale significativement diminuée en comparaison avec les sous-types de différenciation intermédiaire ou différenciés [72].

Dans un article plus récent, utilisant du « *whole genome mRNA expression profiling* », l'équipe de *Choi et al*, du MD Anderson [12] a décrit trois sous-types moléculaires de CU. Les auteurs ont désigné ces sous-types : basal, luminal et p53-like. Même si le sous-type basal avait une signature moléculaire différente de celle décrite par *Volkmer*, les deux équipes ont montré que ce sous-type présentait une expression augmentée des cytokératines de haut poids moléculaire (CK14 et CK5). De plus, le sous-type basal décrit par *Choi* partageait des biomarqueurs communs avec le sous-type basal des cancers du sein et était caractérisé par

une présentation plus agressive de la maladie. Ces tumeurs basales comportaient plus souvent des aspects sarcomatoïdes ou malpighiens et se présentaient en général d'emblée à un stade métastatique. Elles présentaient également un haut niveau d'expression de l'EGFR. Les tumeurs du groupe luminal montraient les caractéristiques de l'activation de PPAR $\gamma$  et du récepteur aux œstrogènes. Elles étaient enrichies en mutations activatrices de FGFR3. Ce sous-type montrait aussi une surexpression de CK20 et exprimait des marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine. Le sous-type p53-like était, lui, constamment résistant à la chimiothérapie néoadjuvante à base de méthotrexate, vinblastine, doxorubicine et cisplatine (MVAC). Ce groupe p53-like se distinguait du groupe luminal par une expression de gènes associés à la protéine p53 sauvage activée, sans expression de la protéine p53 sauvage. Par ailleurs toutes les tumeurs chimio-résistantes adoptaient un phénotype p53-like après traitement [12].

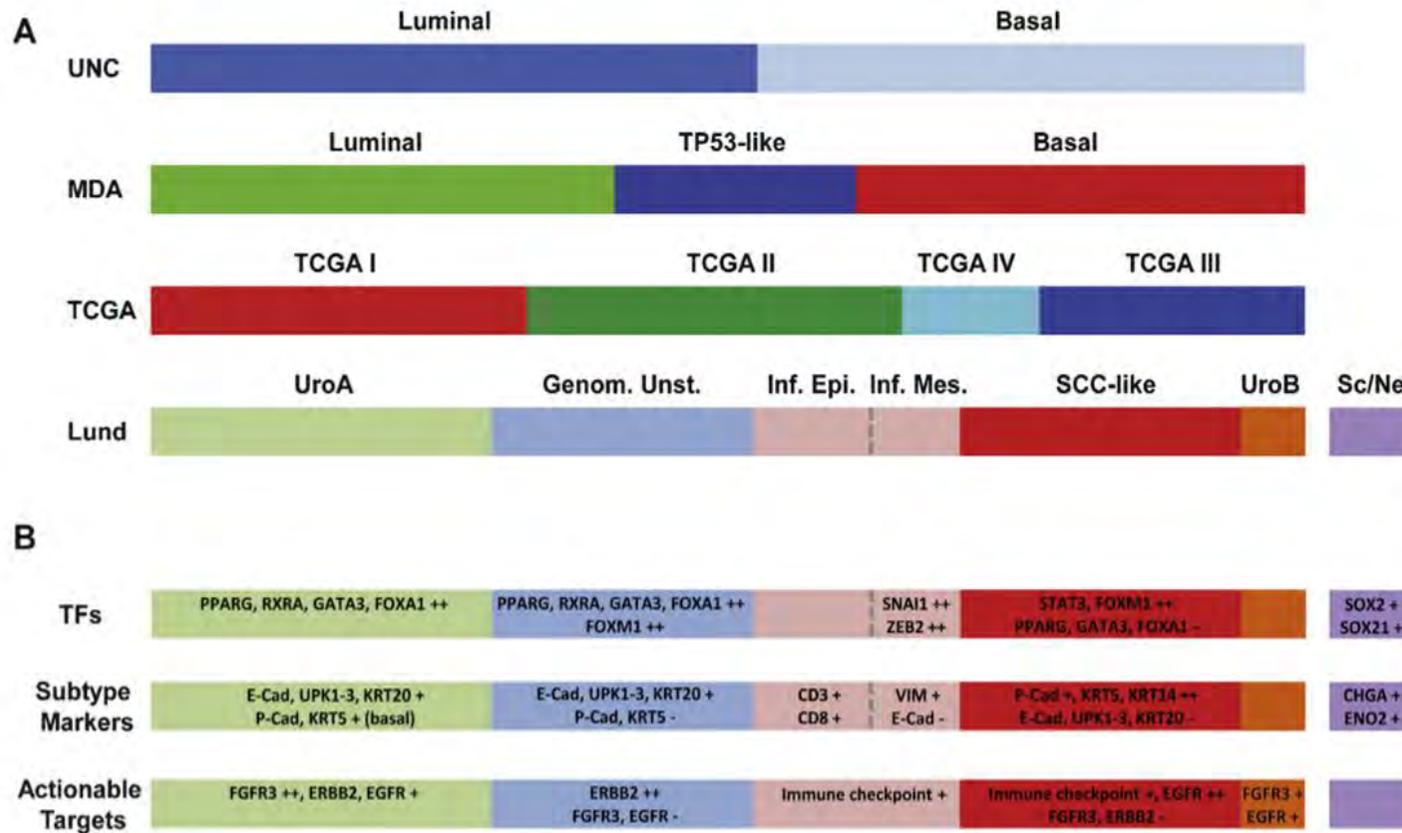
En 2012, l'équipe suédoise de *Sjödahl et al* [14], a quant à elle étudié les profils d'expression génique de 308 tumeurs urothéliales. Ce travail leur a permis de définir cinq groupes différents : les groupes « urobasal A et B », « génétiquement instable », « épidermoïde-like », et « infiltré ». Le sous-type « urobasal A » était caractérisé par une expression de la CK5 proche de celle de la couche basale normale de l'urothélium, ainsi que par une fréquence significativement plus élevée de mutations FGFR3 et PIK3CA. Ces caractéristiques étaient proches de celles du groupe luminal décrit par l'équipe de *Choi*. En revanche, les tumeurs « urobasal B » et « épidermoïde-like » montraient une expression de CK5/6, CK14 et CK16 indiquant un phénotype malpighien ou squameux. Le profil d'expression des cytokératines par les tumeurs « épidermoïde-like » était comparable à celui du sous-type basal de *Choi*. Le groupe « urobasal B » avait également une fréquence élevée de mutations TP53, rappelant le groupe p53-like. Le groupe « génétiquement instable » était caractérisé par des mutations de TP53 associées à de nombreux réarrangements génomiques. Enfin, le groupe hétérogène des tumeurs dites « infiltrées », était lui caractérisé par la présence de nombreuses cellules infiltrant la tumeur (lymphocytes T, myofibroblastes, cellules endothéliales). Cette étude a aussi pu retrouver ces profils d'expression différents au niveau protéique en immunohistochimie [14].

Enfin, en 2014, les efforts du groupe « The cancer genome Atlas network » (TCGA) [15] ont conduits à l'identification de quatre groupes moléculaires dans les TVIM de haut grade (cluster

I à IV). Les tumeurs du cluster I avaient une morphologie papillaire et une augmentation de l'expression de FGFR3, ou des mutations de FGFR3. Elles montraient également des aspects similaires à ceux des tumeurs mammaires de type luminal A, avec notamment une expression élevée de GATA3 et FOXA1. La surexpression d'ERBB2 ou du récepteur bêta aux œstrogènes par ces tumeurs suggère également qu'elles pourraient être ciblées par des thérapies hormonales. La signature d'expression du cluster III (basal squamous like) était similaire à celle des tumeurs mammaires de type basal étant caractérisée par une expression de la CK14, CK5, CK6 et de l'EGFR [15].

Toutes ces nomenclatures différentes, et les différentes méthodes de classification utilisées, ajoutent de la confusion à un sujet déjà complexe. Les groupes moléculaires des TVIM sont hétérogènes. Toutefois, il existe de nombreuses similitudes entre toutes ces classifications (Figure 21). En mars 2015, une réunion de consensus a été organisée par le Spanish national cancer Research Center (CNIO) afin de confronter les différentes classifications et d'atteindre un consensus [73]. À l'issue de ce travail, un consensus a été obtenu au sujet de l'existence d'un groupe basal ou « épidermoïde-like » de CU. Ce groupe a été désigné « basal Squamous like tumors » et est caractérisé par une expression élevée des cytokératines 5/6 et CK14 ainsi que par une absence d'expression des facteurs de transcription FOXA1 et GATA3. Un second groupe de CU présentant des caractéristiques de différenciation urothéliale (luminal) a également été reconnu, toutefois sa définition moléculaire reste à préciser. Concernant les autres sous-groupes décrits, il a été conclu que d'autres études sont nécessaires afin de préciser leur définition [73].

Au total, l'ensemble de ces données démontre l'existence de sous types moléculaires distincts de CU ayant des signatures d'expression caractéristiques. Globalement, les marqueurs utilisés pour classer les tumeurs urothéliales dans les deux principaux groupes (basal et luminal) reflètent les profils d'expression des couches basale ou intermédiaire/luminale de l'urothélium normal [12], [70]. Ces groupes ont un impact pronostique et pourraient guider les approches thérapeutiques.



**Genom. Unst.** = genomically unstable; **Inf. Epi.** = infiltrated epithelial; **Inf. Mes.** = infiltrated mesenchymal; **MDA** = MD Anderson Cancer Center; **SCC** = squamous cell carcinoma; **Sc/Ne** = small cell/neuroendocrine; **TCGA** = The Cancer Genome Atlas; **TFs** = transcription factors; **UNC** = University of North Carolina; **UroA** = urobasal A; **UroB** = urobasal B.

Figure 21 Représentation schématique et parallèle entre les différentes classifications moléculaires de CU publiées. Pour chaque classification, la distribution des sous-types est proportionnelle aux résultats de la classification. Le parallèle entre les classifications a été fait approximativement en fonction des résultats de chaque étude. B : Gènes dont l'expression est modifiée dans chaque sous-types, rangé par catégorie (Facteurs de transcription ; marqueurs tumoraux, cible thérapeutique). D'après Aine et al.

## E. Traitement et prise en charge thérapeutique

### 1. Prise en charge des TVNIM

Le traitement conventionnel des TVNIM comporte en premier lieu la résection chirurgicale trans urétrale (RTV), plus ou moins associée à des instillations intra vésicales adjuvantes de chimio- ou immuno-thérapie (mitomycine C ou BCG).

#### a) Stratification du risque

Les TVNIM sont associées à un risque de récurrence à 5 ans de 50 à 70%, et à un risque de progression de 10 à 30% [20]. Les facteurs de risque associés à la récurrence et à la progression comprennent le haut grade, les tumeurs de grande taille (>3cm), la multifocalité, le nombre élevé de récurrences précédentes et la présence de CIS associé.[74] Les autres facteurs de mauvais pronostics sont la présence d'embolies vasculaires, la présence de certains variants morphologiques ou le stade pT1b. L'utilisation de ces critères (Tableau 7), et des nomogrammes de l'EORTC permet de classer les TVNIM en haut risque, risque intermédiaire ou bas risque de récurrence. Cette stratification du risque permet ensuite de guider la prise en charge [74].

Tableau 7: Groupes en fonction du risque de progression et de récurrence (d'après EAU 2016)

Bas risque	Première tumeur unique, pTa, BG/G1, <3cm, absence de CIS
Risque intermédiaire	Toutes les tumeurs n'entrant pas dans les deux autres catégories
Haut risque	Présence d'au moins un critère parmi: - Stade pT1 - Tumeur de Haut Grade/Grade 3 - CIS - Tumeurs multiples et récidivantes de plus de 3cm, et de stade pTa, de grade 1-2

#### b) Résection trans urétrale

La RTV est l'étape initiale de la prise en charge des TVNIM. On recherche une résection la plus complète possible, avec une marge profonde suffisante devant intéresser le muscle propre. Des biopsies additionnelles de la muqueuse vésicale sont également réalisées afin de déterminer la présence de carcinome in situ associé.

Une nouvelle résection (*Second look*), 2 à 6 semaines après une première RTV, est recommandée en cas de première résection incomplète ou quand le muscle propre n'a pas été résecté sur le premier spécimen d'une tumeur pTa de haut grade ou d'une tumeur classée

pT1. Pour les tumeurs pT1 de haut grade, ces nouvelles résections conduisent à une augmentation du stade et à un changement dans la prise en charge chez 24 à 49% des patients [75].

*c) Chimiothérapie et immunothérapie intravésicale*

Pour les patients avec une TVNIM de bas risque, une seule instillation de chimiothérapie intravésicale (mitomycin, epirubicin, ou gemcitabine) en post RTV immédiate est recommandée [11]. Dans le cas des risques intermédiaires, un traitement d'entretien de un an a montré un bénéfice sur la récurrence mais pas sur la progression. Concernant les hauts risques, l'immunothérapie intravésicale (BCG) a montré une meilleure efficacité [76]

2. Prise en charge des TVIM et des tumeurs métastatiques

*a) Cystectomie radicale et curages lombo-aortiques*

La cystectomie radicale, souvent précédée d'une chimiothérapie néoadjuvante à base de cisplatine est le traitement gold-standard dans le cancer de la vessie infiltrant le muscle [77].

Pour déterminer l'opérabilité et la faisabilité de la construction d'une néo-vessie, l'analyse extemporanée des marges urétérales et l'analyse, en préopératoire, de biopsies de l'urètre prostatique et du col vésical sont utiles [78].

La mortalité de la cystectomie radicale à 90 jours a été évaluée à 9 % [79]

*b) Radiothérapie*

Les patients non opérables, ou refusant la chirurgie radicale, peuvent être candidats à un traitement tri-modal associant une RTV complète suivie d'une radiothérapie associée à une chimiothérapie radio sensibilisante. Les critères de sélection des patients pouvant bénéficier de cette prise en charge comprennent : une tumeur urothéliale de type conventionnel, sans variant spécifique, une invasion minimale de type T2a, une résection trans urétrale complète et l'absence d'hydronephrose associée [80].

*c) Radiothérapie adjuvante*

La radiothérapie adjuvante peut être bénéfique chez les patients avec un cancer vésical localement avancé, chez qui le taux de récurrence locale à 5 ans, après cystectomie, atteint 20 à 45%.[81], [82] Toutefois cette pratique reste encore expérimentale [83].

d) *Traitements systémiques*

Les recommandations françaises et européennes actuelles préconisent la réalisation d'une chimiothérapie néoadjuvante à base de cisplatine avant cystectomie chez les patients atteints d'une TVIM ayant un DFG > 60 ml/min [4], [10].

En effet, dans les TVIM, les données actuelles en faveur de la chimiothérapie néoadjuvante (CNA) avant cystectomie radicale ou avant radiothérapie, sont plus robustes que celles concernant la chimiothérapie adjuvante [84].

Deux essais randomisés [85], [86] et deux méta-analyses [8], [9] ont montré le bénéfice de survie apporté par des chimiothérapies néoadjuvantes (CNA) à base de cisplatine de type MVAC (méthotrexate, vinblastine, doxorubicine, et cisplatine) et CMV (cisplatine, méthotrexate et vinblastine) en comparaison avec la chirurgie seule chez les patients avec une TVIM.

Dans l'étude du SWOG [85], 317 patients avec une maladie opérable de stade T2 à T4, N0 M0 étaient randomisés dans les groupes chimiothérapie (3 cycles de MVAC suivie d'une cystectomie) ou cystectomie seule. La survie globale des patients du groupe chimiothérapie était plus longue que celle du groupe cystectomie seule (77 vs 46 mois). Le groupe CNA obtenait une réponse complète histologique significativement plus importante (38 vs 15 %,  $p < 0,001$ ), ce qui était associé à une augmentation significative de la survie à cinq ans (85 %).

Les deux principales méta-analyses réalisées [8], [9] ont toutes les deux montré un bénéfice de survie significatif avec la CNA. La première [9], basée sur les données individuelles de 3005 patients de 11 essais cliniques différents, a mis en évidence un bénéfice de survie à 5 ans de 5% (passant de 45 à 50%), et une réduction de 14 % du risque de décès avec la chimiothérapie.

En 2000, l'association GC (cisplatine et gemcitabine) a quant à elle montré le même bénéfice avec moins de toxicités [87]. D'autres essais de phase 2 [88], [89] ont retrouvé un taux de réponse histologique complète (défini par un stade pT  $\leq$  pT1) de 38 à 49% avec une CNA par MVAC accéléré ou MVAC dit renforcé ou « dose-dense » (ddMVAC).

En se basant sur l'ensemble de ces données, les chimiothérapies de type CMV, MVAC ou GC peuvent être prescrites en situation néoadjuvante. Malgré cela, la chimiothérapie néoadjuvante demeure encore sous-prescrite du fait des toxicités engendrées chez les nombreux patients âgés. En 2014, aux États-Unis, la chimiothérapie néoadjuvante n'était

réalisée que pour 16,9% des TVIM [90]. Par ailleurs, le bénéfice n'est pas toujours évident. La chimiothérapie néoadjuvante engendre un gain de survie, mais il existe un nombre non négligeable de patients résistants (51 à 58% de non répondeurs) à la chimiothérapie, qui progressent pendant la CNA et n'en bénéficient pas, voire se voient récusés pour la chirurgie [91].

Il apparaît donc primordial de développer des stratégies pour mieux sélectionner les patients susceptibles de répondre à un traitement par chimiothérapie néoadjuvante, ce qui permettrait alors une meilleure prescription.

e) *Biomarqueurs prédictifs de réponse à la chimiothérapie néoadjuvante*

De multiples biomarqueurs ont été étudiés pour prédire la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante. Les études se sont notamment intéressées aux régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose, aux voies de la réparation de l'ADN, à des récepteurs tyrosine kinases, à des signatures d'expression génique, ou encore à des molécules du micro environnement.

(1) *Régulateurs de l'apoptose et du cycle cellulaire*

Le gène suppresseur de tumeur p53 présente des altérations dans près de 50 % des cancers de vessie [92]. Ceci a été corrélé aux grades élevés et aux stades avancés [92]. La protéine p53 mutée est souvent surexprimée du fait d'une stabilité augmentée. In vitro, la plupart des mutations p53 confèrent une sensibilité des lignées cellulaires de carcinome urothélial au cisplatine et la doxorubicine [93]. Toutefois les données de la littérature sur le lien p53 et chimio-sensibilité sont contradictoires. Dans un essai de phase II, *Plimack et al* ont recherché les anomalies moléculaires présentes dans les tumeurs primitives et aucune corrélation entre les mutations de p53 et la réponse à la chimiothérapie n'a pu être démontrée [88]. D'autres études, chez des patients recevant une chimiothérapie par MVAC, ont montré une corrélation entre la surexpression de p53 en immunohistochimie et un mauvais pronostic [94]. À l'inverse, *Watanabe et al* ont démontré par séquençage que p53 sauvage était associé à une mauvaise réponse à la chimiothérapie dans leur série [95].

Bcl2 est une protéine anti-apoptotique, qui serait un marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie ou à la radiothérapie[96]. *Cooke et al* ont randomisé 51 patients pour un traitement par radiothérapie ou radiothérapie plus chimiothérapie par cisplatine [96]. Chez les patients ayant reçu du cisplatine, ceux qui présentaient une négativité de Bcl2 avaient une survie à cinq ans de 55%, tandis que celle des patients Bcl2 positifs était de 14 % ( $p < 0,03$ ).

(2) Voies impliquées dans la réparation de l'ADN

Récemment, *Iyer et al* ont présenté à l'ASCO leur étude sur les relations entre les altérations des gènes du système de réparation des dommages à l'ADN (gènes DDR) et la réponse à la CNA [97]. Dans cette étude de phase II ayant inclus 46 patients recevant une CNA de type GC, les gènes DDR les plus fréquemment mutés étaient BRCA2 et ATR. Le nombre moyen d'altérations des gènes de réparation chez les répondeurs et non répondeurs était similaire, mais 5 des 14 répondeurs présentaient des mutations délétères du système de réparation de l'ADN (DNA damage repair – DDR) alors qu'aucun des 10 non répondeurs n'en présentait ( $p = 0,053$ ).

Dans une étude prospective, *Plimack et al* ont montré que les altérations génomiques du système de réparation de l'ADN (gènes ATM, RB et FANCC) prédit la réponse à la CNA à base de cisplatine [98].

(3) Classification moléculaire et réponse à la chimiothérapie/  
Implications thérapeutiques

Les différentes classifications issues des études récentes sur les profils d'expression génique ayant défini des sous types moléculaires intrinsèques de cancers de vessie ont également fournit des informations pronostiques et permettent d'identifier des sous-groupes de patients avec une sensibilité accrue à la chimiothérapie.

En effet, dans l'étude *Choi et al* [12], en l'absence de traitement, les tumeurs infiltrant le muscle de type basal étaient plus agressives et montraient une survie plus courte que les tumeurs de type luminal. Par contre, ces cancers de type basal montraient une plus grande sensibilité aux chimiothérapies à base de platine, avec un bénéfice plus important de la chimiothérapie de première ligne en comparaison avec les tumeurs de sous-type luminal. Dans cette même étude [12], le sous-type luminal correspondant au cluster II du TCGA, appelé p53-like par Choi, apparaissait résistant aux chimiothérapies néo adjuvantes à base de cisplatine.

Une identification de ces groupes avec un set minimal de biomarqueurs immunohistochimiques serait donc particulièrement utile pour mieux sélectionner, en routine, les patients susceptibles de répondre à la chimiothérapie.

Dans cet esprit, en 2014, le SWOG (South West Oncology Group) a lancé un essai clinique (NCT02177695 – inclusions en cours) comparant l'efficacité de 2 chimiothérapies de première

ligne (GC versus MVAC) en situation néoadjuvante et évaluant la capacité d'un algorithme basé sur les profils d'expression génique, appelé CoXEN, à prédire la réponse histologique complète [99].

### 3. Traitements émergents

Grâce aux travaux du TCGA, une meilleure connaissance des cibles thérapeutiques potentielles dans le cancer de la vessie a permis de voir émerger plusieurs thérapeutiques nouvelles dans les 5 dernières années. Des thérapies ciblant FGFR3, EGFR, VEGF, mTOR, le récepteur aux androgènes et CD24 ont toutes montrées une activité pré-clinique, et beaucoup sont en cours d'essai clinique.

a) *Thérapies ciblées : anticorps monoclonaux ciblant les RTK (Récepteurs Tyrosine Kinase) ?*

(1) FGFR3

Concernant le groupe luminal, il présente un fort taux de mutation de FGFR3 mais également de ERBB2 et ERBB3, ce qui est en faveur d'une stratégie anti-FGFR.

Plusieurs stratégies thérapeutiques innovantes sont en cours de développement. Des petites molécules pan-FGFR inhibitrices ont montré des résultats prometteurs dans les tumeurs vésicales présentant une mutation activatrice ou une translocation de FGFR.

(2) EGFR

Les tumeurs du groupe basal sont également enrichies en EGFR et HIF1. Les données précliniques montrent que ces dernières seraient sensibles aux anti-EGFR et répondraient mieux que les luminales au traitement par DD-MVAC (dose dense methotrexate, vinblastine, doxorubicine, et cisplatine plus bevacizumab) qui inhibe le VEGF (cible de HIF1)

Parmi les récepteurs tyrosine kinases, les inhibiteurs de l'EGFR pourraient être efficaces dans les tumeurs de vessie avec surexpression de l'EGFR ou de ERBB2 (HER2) et non primo traitées par chimiothérapie [100].

(3) HER2

Des résultats précliniques encourageants ont été obtenus avec le trastuzumab associé à un agent cytotoxique dans les tumeurs HER2 positives [101]. Des essais d'inhibiteurs de HER2 dans le cancer de la vessie ont suggéré qu'une positivité HER2 en immunohistochimie ou en FISH pourrait guider la thérapeutique. Mais à l'inverse des tumeurs mammaires, la plupart des surexpression HER2 des carcinomes urothéliaux ne sont pas associées à une amplification du

gène ERBB2. Un taux plus élevé de mutations ERBB2 et plus faible d'amplifications du gène sont présents dans les cancers vésicaux [102].

Par ailleurs les inhibiteurs de la voie mTOR associés aux inhibiteurs de MEK et aux inhibiteurs des régulateurs du cycle cellulaire PLK1 et CDK4 sont en cours d'étude en association avec les chimiothérapies [103].

b) *Axe PD1/PDL1 et Immunothérapies*

L'immunothérapie est traditionnellement un élément central dans la prise en charge des cancers génito-urinaires. Notamment dans le traitement des TVNIM ou l'utilisation des instillations de BCG est ancienne. Les premiers auteurs ayant rapporté l'utilisation du BCG dans la vessie sont Morales A *et al* en 1976 [104].

Dans les TVIM, plusieurs études ont montré une dysfonction immunitaire. En effet, le profil immunologique des patients porteurs d'un CU montre une altération de la fonction lymphocytaire avec une prédominance de la fonction T régulateur Helper et des cytokines Th1 inhibitrices dans le microenvironnement tumoral. De plus, le nombre de lymphocytes T CD8+ intra tumoraux est corrélé à la survie spécifique. Parmi les principaux médiateurs de la réponse immune se trouve la famille B7 des protéines co-régulatrices (B7-H1 ou PD-L1, B7-H3, PD-1). La surexpression de ces protéines co-régulatrices (CTLA4, PD1 et PDL1) par la tumeur ou son microenvironnement est un des mécanismes par lequel le carcinome urothélial échappe à la réponse immunitaire et aux effets cytotoxiques des traitements traditionnels [105], [106]. La voie PD1/PDL-1 est donc une cible thérapeutique intéressante dans la vessie, tout comme dans d'autres carcinomes (rénal, pulmonaire) ou le mélanome.

Des données sur l'atezolizumab, l'avelumab (inhibiteurs de PDL1), et le pembrolizumab (inhibiteur de PD-1) sont disponibles et ont été présentées à l'ASCO en 2016 [107]–[109]. Un autre anti-PD-L1 est aujourd'hui en développement dans le cancer de la vessie : le durvalumab [110]. Ces molécules ont montré des taux de réponses supérieurs à ceux obtenus historiquement avec les chimiothérapies cytotoxiques chez les patients métastatiques. Le taux de réponse approche les 30% chez les patients montrant une surexpression de PD-L1 en immunohistochimie [107]. De plus, ces thérapies semblent mieux tolérées que la chimiothérapie.

Les tumeurs basales sont enrichies en une signature immune (en particulier le sous-groupe des tumeurs « claudin-low ») ce qui pourrait permettre de sélectionner les patients pour un traitement inhibiteur de checkpoint immunitaire [111]. Les tumeurs basales montrent le plus fort taux de lymphocytes T PDL1 positifs [107].

Si la place de l'immunothérapie dans les cancers de vessie est assurée, il reste donc la question de la sélection des patients bons répondeurs à l'immunothérapie (et du grand nombre de biomarqueurs proposés par les différents laboratoires) ainsi que la question de savoir comment et à quel moment l'introduire. En d'autres termes, à quel moment doit-on remplacer la chimiothérapie conventionnelle par une immunothérapie ?

## F. Evaluation de la réponse aux traitements

Actuellement l'évaluation clinique de la réponse au traitement se base sur l'estimation de la taille tumorale selon les critères de l'OMS ou les critères RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours) [112]. Les critères OMS prennent en compte le plus grand diamètre tumoral et le diamètre perpendiculaire. La réponse au traitement étant estimée par un pourcentage de diminution du produit de ces deux diamètres. Les critères RECIST ne prennent en compte que le plus grand diamètre tumoral, et évaluent la réponse par le pourcentage de réduction de ce diamètre. Ces méthodes sont sujettes à des variations inter et intra observateurs, et sont particulièrement difficiles à appliquer à la vessie étant donné les images artéfactuelles d'épaississement pariétal observées des suites de la RTV.

Alors que le nombre de cancers de vessie traités par chimiothérapie néoadjuvante augmente, l'une des problématiques est désormais de mieux définir les éléments de la réponse au traitement, ainsi que d'identifier des facteurs pronostiques sur les pièces chirurgicales de cystectomie après chimiothérapie.

L'examen anatomopathologique de la pièce de cystectomie radicale est aujourd'hui considéré comme le gold standard pour évaluer la réponse à la chimiothérapie. Dans toutes les études publiées, la définition de la réponse à la CNA était basée sur le stade ypTNM. On retrouve une régression du stade anatomopathologique (« Downstaging ») dans 50 à 60 % des cas [113].

Concernant la définition histopathologique précise de la réponse au traitement, le groupe RISC (*Retrospective International Study of Cancers of the Urothelial Tract*) définit la réponse histologique complète (pCR) par un stade inférieur ou égal à pT1N0 sur la pièce de cystectomie (90, 118). Depuis, d'autres études ont également évalué l'efficacité de CNA en définissant la réponse histologique de manière similaire, par un stade pT strictement inférieur à pT2 sur la cystectomie (13, 117).

La réponse ainsi définie a été associée à un gain de survie. Par exemple, en 2015, dans l'étude de *Gandhi et al*, la survie spécifique à cinq ans des patients répondeurs à la CNA était de 90,6 % *versus* 27,1 % pour les patients non répondeurs [113].

Il est donc établi que la survie des patients est fortement corrélée à la réponse histologique. Toutefois, d'autres définitions de la réponse histopathologique peuvent être proposées.

Alors même que des grades histologiques de régression tumorale (*Tumor Regression Grade* - TRG), quantifiant la réponse histopathologique des tumeurs après chimiothérapie, ont montré un meilleur impact pronostic que le stade ypTNM dans les cancers rectaux [115], les tumeurs de l'œsophage [116] ou encore mammaires, seules deux études ont été réalisées dans la vessie [117], [118]. Pourtant la définition d'un TRG pourrait permettre de mieux définir les critères de réponse à la chimiothérapie, de préciser le pronostic et d'aider à l'identification des facteurs prédictifs de réponse.

En 2014, l'équipe suisse de *Fleischmann* a décrit un grade TRG pour le cancer urothélial de la vessie et a évalué son impact pronostique sur la survie sans progression et la survie globale [117]. Dans leur étude, le grade TRG a été évalué sur 56 cas de cystectomie post-CNA. Le TRG était défini ainsi : le TRG1 correspondait à une régression tumorale complète, le TRG2 à une régression de plus de 50% de la surface tumorale et le TRG3 à une régression inférieure à 50% de la surface tumorale [117].

### III. OBJECTIFS

L'objectif de notre travail était de rechercher des biomarqueurs associés à la réponse à la chimiothérapie, à l'aide de techniques accessibles en pratique courante telles que l'immunohistochimie ou le séquençage d'un panel de gènes ciblés (panel INCa) en NGS.

Sur notre série de patients traités par chimiothérapie néo-adjuvante avant cystectomie, nous avons également évalué l'utilisation d'un score de régression tumorale (TRG) sur les pièces de cystectomie. Il s'agissait de déterminer si le grade TRG nous permettait de mieux définir la réponse à la chimiothérapie et pouvait faciliter l'identification de biomarqueurs prédictifs de la réponse au traitement.

## IV. MATERIEL ET METHODES

### A. Cohorte

#### 1. Sélection des patients

Cette étude rétrospective a concerné l'ensemble des patients opérés au CHU de Toulouse ou à l'IUCT, par cystectomie, cystoprostatectomie ou exentération pelvienne antérieure, pour un carcinome urothélial de la vessie, entre janvier 2010 et décembre 2015.

Les critères d'inclusion étaient :

- Diagnostic de carcinome urothélial infiltrant le muscle.
- Prescription d'une chimiothérapie néo adjuvante avant chirurgie à visée curative.
- Réalisation d'une cystectomie, cystoprostatectomie ou exentération pelvienne antérieure à visée curative entre janvier 2010 et décembre 2015.
- Non opposition du patient à l'utilisation du matériel tumoral pour la recherche

Les critères d'exclusion étaient :

- L'opposition du patient
- La réalisation d'une cystectomie de rattrapage après radiothérapie et chimiothérapie néoadjuvante concomitantes.
- La réalisation d'une autre chimiothérapie dans les 6 mois précédant le diagnostic
- La présence d'un deuxième cancer synchrone
- Les patients métastatiques
- Les cystectomies à visée palliative.

#### 2. Recueil des données cliniques

Les données cliniques, biologiques et l'évolution ont été recueillies à l'aide des logiciels informatiques de traitement du dossier médical Orbis et DPI (Dossier Patient Informatisé) et à l'aide du réseau Oncomip (réseau informatique de cancérologie de Midi-Pyrénées).

Pour tous les patients, l'âge, le sexe, la date du diagnostic et de la chirurgie, le type et le nombre de cycles de chimiothérapie reçus, et les données de l'évolution ont été recueillis.

### B. Prise en charge des RTV

#### 1. Evaluation morphologique des RTV

L'ensemble des lames et des blocs de la dernière RTV avant chimiothérapie a été désarchivé ou récupéré auprès des laboratoires extérieurs en possession de ce matériel. Tous les cas ont

été relus par deux pathologistes (GD et MLQR) et ont été gradés selon l'OMS 2016. De même toutes les autres données histopathologiques de la dernière RTV avant chimiothérapie (la présence de carcinome in situ associé, le stade pTNM et la présence d'un variant morphologique) ont fait l'objet d'une nouvelle évaluation (relecture GD et MLQR).

## 2. Tissu MicroArray

Les tissu microarrays (TMA) ont été réalisés à partir des blocs archivés de RTV provenant de la dernière résection réalisée chez chacun des patients, avant tout traitement par chimiothérapie. Les échantillons tumoraux étaient fixés en formol et inclus en paraffine.

L'ensemble des lames de ces RTV, colorées à l'hémalun éosine, a été revu par deux pathologistes (GD et MLQR) et les zones, riches en cellules tumorales, les mieux préservées, ont été identifiées. Ces zones ont ensuite été repérées sur les blocs de paraffine correspondants.

Pour chaque tumeur, deux zones tumorales représentatives étaient sélectionnées et deux carottes de 2 mm de diamètre étaient prélevées au punch puis incluses dans les TMA. Les TMA ont été réalisés sur la plateforme d'histopathologie du centre de ressources biologiques (CRB Cancer) du CHU de Toulouse, de façon semi-automatisée à l'aide du « Tissu arrayeur » MiniCore® 3 (Figure 22) et du logiciel. Excilone® (Liste des blocs sélectionnés en annexe 1).



Figure 22: Tissu arrayeur MiniCore et bloc de TMA en paraffine.

### 3. Immunohistochimie

#### a) Anticorps utilisés

En se basant sur les profils d'expression génique publiés [14], [111] et sur les profils décrits par l'OMS [5] et la conférence de consensus de 2016 [73], nous avons sélectionné un panel d'anticorps afin d'étudier les profils immunohistochimiques des tumeurs urothéliales de notre cohorte, en approchant les groupes moléculaires basal et luminal décrits dans la littérature [111].

Les marqueurs luminaux choisis comprenaient la cytokératine 20 (CK20, clone Ks20.8, prédilué, Dako) et le facteur de transcription GATA3 (clone HG3-31, dilution 1 :100, Santa-Cruz Biotechnology Inc.). Les marqueurs de basalité sélectionnés étaient les cytokératines 5 et 6 (CK5/6, clone D5/16 B4, prédilué, Dako) et le CD44 (clone DF1485, dilution 1 :50, Dako). La description des épitopes marqués par ces anticorps est jointe en annexe 4.

#### b) Protocole technique

Les marquages immunohistochimiques ont été réalisés sur des coupes de 3 µm d'épaisseur à partir des blocs de TMA préparés (avant utilisation pour l'extraction de l'ADN tumoral). Ces immunomarquages ont été réalisés de manière automatisée, sur les automates Dako® autostainer, Dako® Omnis et / ou Ventana® Benchmark Ultra. Pour chacun des anticorps utilisés, le protocole d'immunomarquage commençait par une étape de déparaffinage suivi d'une étape de démasquage. L'anticorps primaire était révélé par le système Ultraview DAB (Ventana Medical Systems, Inc.) ou Flex/HRP de Dako. Les lames étaient contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer. Les conditions de marquage utilisées pour chaque anticorps sont résumées dans le Tableau 8.

Tableau 8: Anticorps utilisés en immunohistochimie et conditions d'utilisation

Cible	Référence	Automate	Dilution	Démasquage	Dépôt Ac primaire	Révélation
CK5/6	Dako Clone D5/16 B4	Dako OMNIS	prédilué	30 min 97°C pH 9- Hight	12 :30 min – 32°C	Flex/HRP 20min
CD44	Dako clone DF1485	Dako Autostainer	1:50	pH 6- Low	20 min – 32°C	Flex/HRP 20min
CK20	Dako Clone Ks20.8	Dako OMNIS	prédilué	30 min 97°C pH 9- High	20 min – 32°C	Flex/HRP 20min
GATA3	(HG3-31) SC-268	Dako Autostainer	1:250	Flex TRS High	20 min	Flex/HRP 20min
FGFR3	SC-13121	Ventana Benchmark Ultra	1:100	CC1-95°C pH 8.6	32 min	Ultraview DAB

c) *Analyse des marquages immunohistochimiques*

Les résultats des immunomarquages ont été interprétés par deux pathologistes (MLQR et GD), en aveugle, au microscope optique.

L'évaluation des marquages a été réalisée comme suit : la proportion de cellules tumorales présentant un marquage positif nucléaire pour GATA3, ou une positivité membranaire complète pour les autres marqueurs était évaluée. Pour les anticorps anti GATA3, CK5/6 et CK20, le marquage était considéré positif lorsqu'au moins 20% des cellules tumorales étaient marquées [50]. Pour l'anticorps anti-CD44, le seuil de positivité était de 10% de cellules tumorales marquées comme précédemment publié [119]. Pour l'anticorps anti-FGFR3, le seuil de positivité était de 1% de cellules marquées [120].

4. Biologie moléculaire

a) *Extraction de l'ADN*

(1) *Extraction sur tissu fixé (FFPE)*

A partir de 10 copeaux prélevés au microtome sur les blocs de tissu de RTV fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE), l'ADN tumoral a été extrait à l'aide du kit *QIAamp DNA FFPE* (Qiagen®). Le dosage et la qualité de l'ADN extrait ont été vérifiés sur *Xpose Trinean*® et sur la *Tapestation* de Agilent®.

(2) *Extraction sur tissu congelé*

Les cas pour lesquels nous disposons de matériel de RTV cryo-préservé en tumorotheque au CRB (Centre de Ressources Biologiques), ont été extraits à partir de 10 copeaux réalisés à l'aide d'un cryostat et du *Kit QIAamp DNA minikit* (Qiagen®). Le dosage et la qualité de l'ADN extrait ont été vérifiés sur *Xpose Trinean*® et sur la *Tapestation* de Agilent®.

b) *Qualification de l'ADN pour l'analyse en NGS*

La première étape qui suit l'extraction de l'ADN, est une étape qui consiste à qualifier les ADN extraits, c'est-à-dire à déterminer leur caractère amplifiable ou non. En effet, les différents fixateurs utilisés (formol ou autres fixateurs), ou même les conditions de stockage des blocs de paraffine peuvent induire des modifications sur les bases de l'ADN ou des dégradations de l'ADN et donc influencer sur sa qualité [121]. Pour qualifier les ADN, une qPCR (quantitative Polymérase Chain Réaction) est réalisée avec des amorces ciblant une zone de 149 pb d'un gène dit « de ménage » (gène TNIF). Ces amorces vont permettre l'amplification d'une séquence de 149 pb (paires de bases) de ce gène. Cette taille de 149 pb correspondant à la taille des reads que l'on séquence en NGS (*cf infra*).

c) *Principes et étapes du flux du séquençage NGS Illumina*

Le principe de la technologie du séquençage haut débit, dit NGS, est basé sur le séquençage par synthèse. Une ADN polymérase catalyse l'incorporation de dNTP (déoxyribonucléotides triphosphates) marqués par un fluorochrome, dans un brin d'ADN synthétisé. A chaque cycle, le nucléotide incorporé est identifié grâce à l'excitation du marqueur fluorescent présent sur chaque dNTP. La principale différence du NGS avec la technique classique de séquençage *Sanger* (gold standard) est qu'au lieu de séquencer un seul brin d'ADN, on peut séquencer des millions de fragments en parallèle.

Nous utilisons au laboratoire la technologie *Dual-strand amplification* et le séquençage d'Illumina®. Cette technologie est basée sur l'amplification de régions cibles, et cela à partir des deux brins de l'ADN.

Le flux de la technique NGS Illumina comporte donc 5 étapes de base :

1- *La préparation de la librairie*

Avant l'étape du séquençage à proprement parler sur la machine *MiSeqDx* d'Illumina®, l'ADN génomique de chaque échantillon doit être préparé. Cette première étape de préparation est appelée la préparation de la librairie. Le terme librairie désigne la collection de fragments d'ADN représentative de l'ADN à séquencer.

Pour la préparation de la librairie, les régions d'intérêt (gènes ou parties de gènes que l'on veut séquencer) sont amplifiées, à l'aide d'un panel d'amorces choisi.

Le panel d'amorces utilisé au laboratoire est le panel « INCa ». Ce panel a été élaboré par notre laboratoire (D. Grand, Ingénieur dans le service d'anatomopathologie) à partir des recommandations de l'INCA (Institut National du Cancer) qui a déterminé une liste de gènes minimale à analyser dans le cadre d'un usage à visée diagnostique du NGS (Tableau 9).

Tableau 9: Liste des gènes analysés : Panel INCA.

gène	Exons / hotspots	Transcrit de référence
AKT1	3	NM_001014431.1
ALK	23+24+25	NM_004304.1
BRAF	11+15	NM_004333.4
EGFR	18+19+20+21	NM_005228.3
ERBB2 (HER2)	20	NM_004448.2
ERBB4	E452K et R393W	NM_005235.2
FGFR2	S252, N549, K659	NM_000141.4
FGFR3	7+9+14 (R248 à S249 et G370 à Y373)	NM_000142.4
HRAS	2+3+4	NM_005343.2
KIT	8+9+11+13+17+18	NM_000222.2
KRAS	2+3+4	NM_033360.2
MAP2K1 (MEK1)	2	NM_002755.3
MET	2 + 14 (de c.2942-63 en 5' à c.3082+20 en 34) à 20	NM_001127500.1
NRAS	2+3+4	NM_002524.3
PDGFRA	12+14+18	NM_006206.4
PIK3CA	9 + 20	NM_006218.2

Cette étape de préparation de la librairie commence par l'hybridation des amorces spécifiques 1 et 2 sur un brin de l'ADN cible (étape 1, Figure 23). On effectue ensuite une purification pour retirer les amorces spécifiques non hybridées. Puis une phase d'extension-ligation à 37°C pendant 45 minutes aboutit à la formation d'un premier produit d'amplification contenant les régions cibles bornées par des séquences ou amorces de séquençage qui seront ensuite nécessaires à l'amplification (Etape 2, Figure 23).

Les produits obtenus à l'étape 2 sont ensuite amplifiés à l'aide d'amorces comportant des séquences index (index 1 et index 2, qui sont des séquences « codes barre » permettant d'identifier l'ADN d'un patient) et des séquences adaptatrices (P5 et P7) permettant la fixation de l'ADN sur la cellule de séquençage (ou flowcell) (Etape 3, Figure 23).

Pour chaque échantillon, deux librairies étaient générées avec deux panels d'oligonucléotides indépendants contenant des amorces spécifiques des séquences d'intérêt sur les brins sens et antisens.

Au final, on obtenait des séquences cibles (16 gènes cibles, avec 48 exons, Tableau 9) amplifiées et bornées par des amorces de séquençage, des séquences index et des séquences adaptatrices (Etape 4, Figure 23) (ce qui représente, avec notre panel, 150 amplicons).

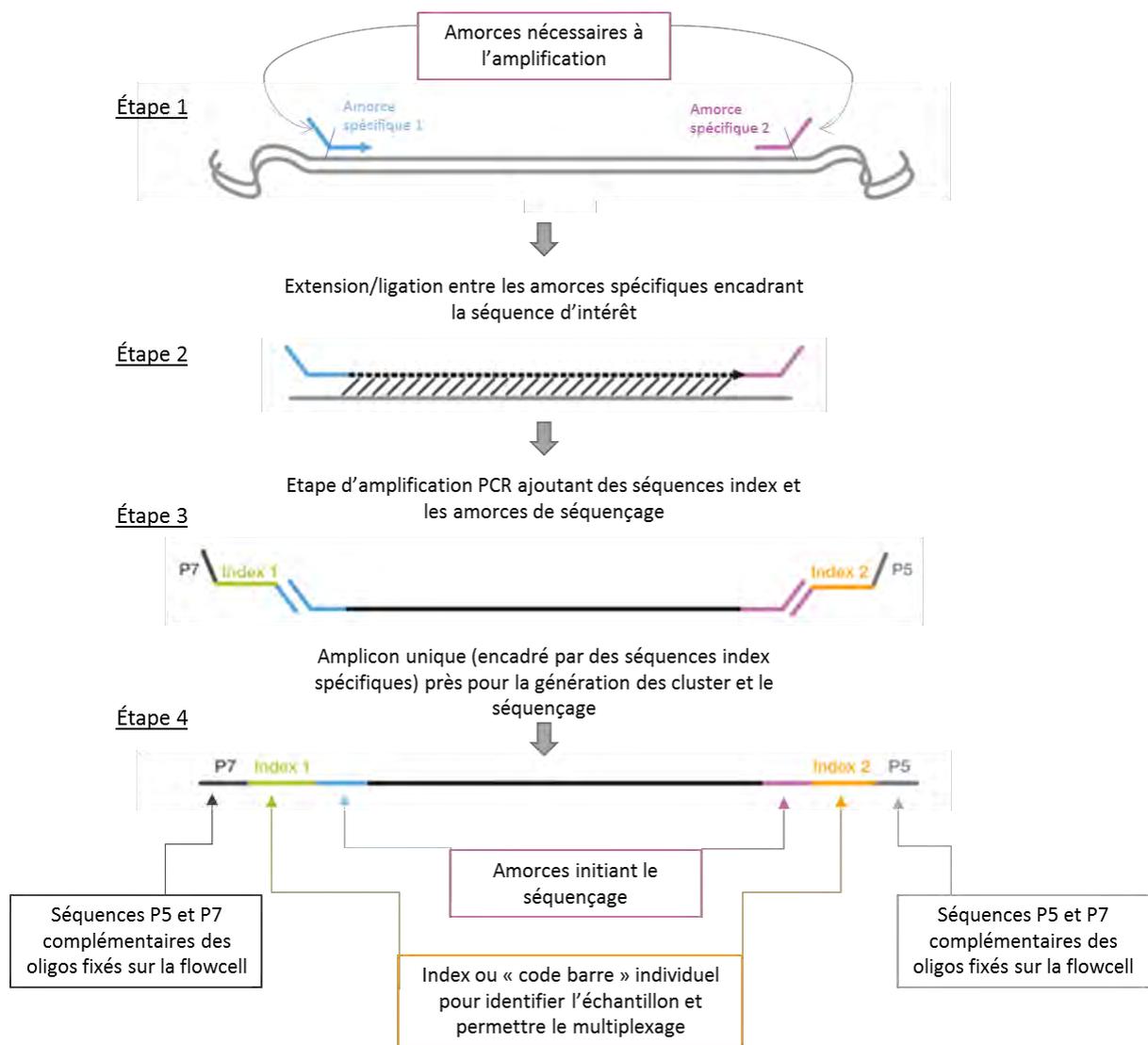


Figure 23: Etapes de préparation de la librairie (d'après illumina®).

#### 2- Etape de normalisation avant multiplexage

Avant de regrouper et mélanger les échantillons des différents patients (multiplexage) pour le séquençage, on effectue une étape de normalisation qui permet de s'assurer une représentation égale de chaque librairie dans le pool d'échantillons sur la flowcell. Ceci permet d'obtenir une couverture et une profondeur de lecture équivalente pour tous les échantillons présents sur la même cellule de séquençage (Figure 24).

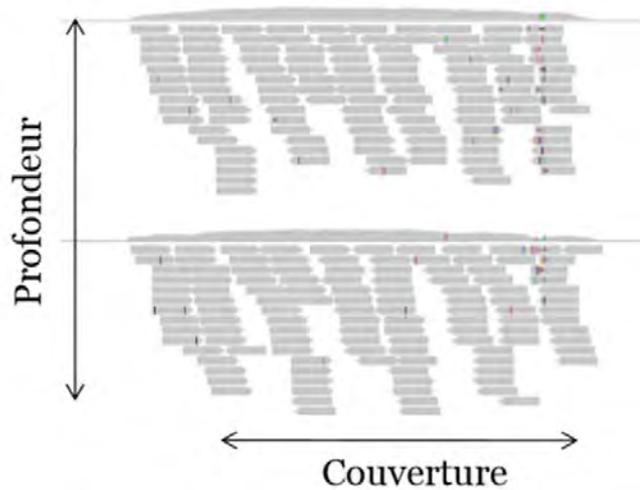


Figure 24: Différence entre couverture et profondeur : La couverture correspond à la zone du génome couverte (% du génome couvert) par un nombre suffisant de lecture (ou read). Et la profondeur au nombre de lecture de chaque base (d'après illumina®).

Les produits de PCR sont donc purifiés (puces AMPure XP, Beckman Coulter, Brea, CA), quantifiés, et normalisés à 4nM avant le séquençage sur le MiSeq Dx (Illumina).

### 3- Génération des clusters

La librairie ainsi préparée et normalisée est ensuite chargée sur une puce de séquençage (« flowcell »). Sur cette puce, se trouvent des oligos dont la séquence est complémentaire à celle des adaptateurs P5 et P7 utilisés au moment de la préparation de la librairie, permettant ainsi à l'ADN de se fixer à la puce par hybridation (Figure 25).

#### Illumina: puces



#### flow cell



Figure 25: Puce de séquençage (ou flowcell) Illumina, avec oligos complémentaires de P5 et P7 fixés à la surface (d'après illumina®)

Chaque fragment est ensuite amplifié pour former des clusters (Figure 26). Une fois les clusters générés, le séquençage peut commencer.

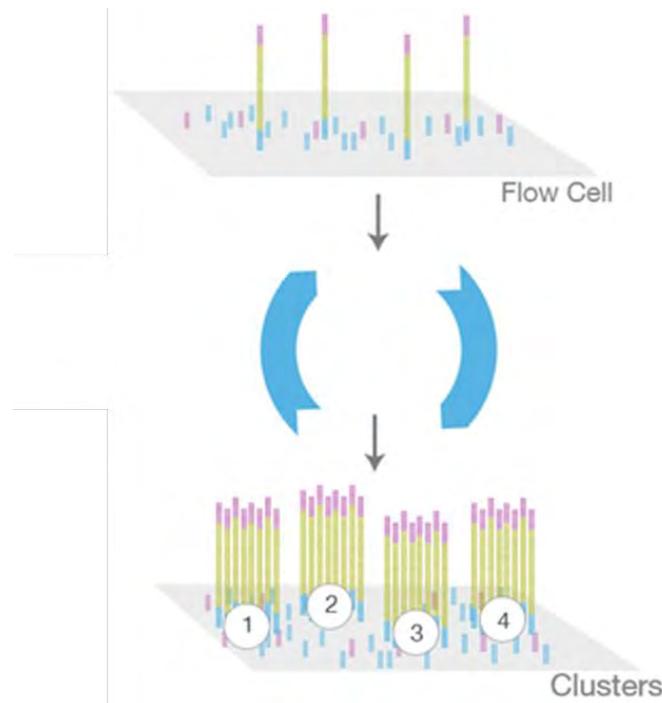


Figure 26: Flowcell (= cellule de séquençage) et génération des clusters : La librairie est chargée sur la puce et les fragments d'ADN s'hybrident à la surface de cette puce grâce à la présence de petites séquences d'ADN fixées dessus, qui sont complémentaires des séquences P5 et P7. Chaque fragment d'ADN ainsi hybridé sera ensuite amplifié de façon clonale pour former un cluster (d'après illumina®).

#### 4- Séquençage

Enfin l'étape du séquençage Illumina® par synthèse utilise une technologie de « terminateur de chaîne réversible » qui détecte chaque base lorsqu'elle est incorporée sur le brin d'ADN synthétisé. A chaque cycle, les quatre types de dNTP associés à une molécule dite « terminateur réversible » et à un fluorochrome spécifique, sont injectés dans la flowcell. Ainsi, lorsqu'un dNTP est intégré au brin synthétisé, la synthèse se bloque (le terminateur bloque l'intégration de la base suivante par la polymérase). La fluorescence associée à chacun des dNTP est alors détectée (A : rouge, C : Bleu, T : Vert et G : Gris). Le terminateur étant réversible, il est donc ensuite « débloqué » pour permettre à la base suivante d'être ajoutée sur le brin d'ADN, et ainsi de suite, l'opération se répète à chaque cycle (pour chaque base ajoutée). Le séquençage se fait donc base par base, en temps réel, ce qui réduit le taux d'erreur possible, même en cas de séquences répétées (Figure 27). Le séquençage est réalisé en « pair-end », c'est-à-dire dans un sens puis dans l'autre, et génère un fichier de données brutes appelé

FastQ qui sera ensuite aligné à un génome de référence puis analysé à l'aide de différents logiciels.

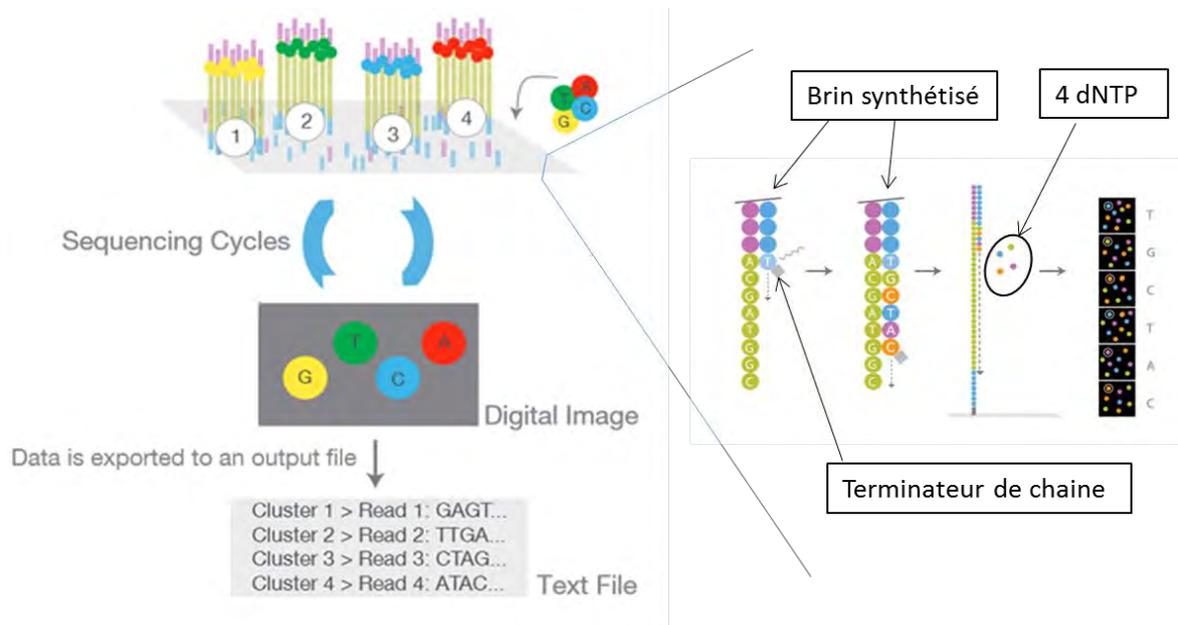


Figure 27: Séquençage par synthèse. Lors du séquençage sur la flowcell, des nucléotides fluorescents sont incorporés au brin synthétisé. À chaque incorporation de nucléotide, une image de la puce est générée et l'émission fluorescente est enregistrée pour chaque clusters. La longueur d'onde et l'intensité émise permettent d'identifier la base. Ce cycle est répété  $n$  fois pour obtenir un read de  $n$  paires de bases (d'après illumina®).

#### 5- Analyse des données

Lors des étapes d'alignement et d'analyse des données, tous les reads (séquences lues) sont alignées au génome humain de référence (GRCh37(hg19)) grâce à deux logiciels d'analyse différents. Les différences entre la séquence génomique de référence et les séquences lues (variants) sont alors identifiées (Figure 28).

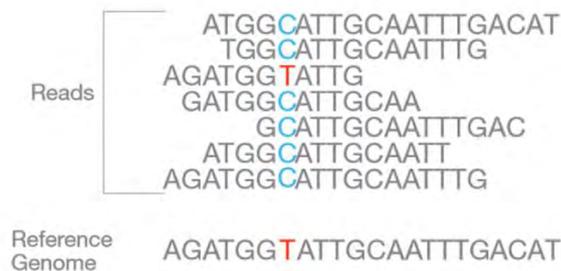


Figure 28: Alignement des séquences lues et analyse des données (d'après illumina®).

Les fichiers FastQ générés par le logiciel de séquençage MiSeq Reporter (Illumina®) sont analysés à l'aide de deux logiciels (ou pipelines) différents : MiSeq reporter / Variant Studio (Illumina®) et NextGENE (Softgenetics®).

Les cas étudiés étaient considérés comme mutés si un variant (une mutation) était retrouvé sur les deux brins (2 librairies) et avec les deux logiciels d'analyse. Par ailleurs les variants devaient avoir atteint une profondeur de lecture minimale de 300 X.

## C. Prise en charge des pièces de cystectomie

### 1. Prise en charge initiale

Toutes les pièces de cystectomies ont été prises en charge au laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Toulouse. Chaque pièce opératoire était fixée dans du formol 4% tamponné, pendant 24 à 48 heures. Dans un premier temps, les caractéristiques macroscopiques des pièces opératoires étaient décrites (présence de tumeur résiduelle, localisation, taille, rapport avec les tissus en périphérie, ulcération, cicatrice) puis un échantillonnage était réalisé pour l'examen histologique. En cas d'absence de tumeur résiduelle visible macroscopiquement, la zone du lit tumoral faisait l'objet d'une inclusion en totalité. Des prélèvements systématiques étaient réalisés au niveau du trigone, du col vésical, du dôme, et des faces antérieure, postérieure, ainsi que des faces latérales droite et gauche. Les limites chirurgicales au niveau des uretères et de l'urètre étaient également systématiquement prélevées.

L'ensemble des curages était inspecté et palpé à la recherche de ganglions lymphatiques et tous les ganglions repérés macroscopiquement étaient inclus. Dans les cas où aucun ganglion n'était repéré en macroscopie, le prélèvement était inclus en totalité pour examen histologique.

Une seule lame colorée à l'hémalum éosine était réalisée pour chaque bloc, et aucun examen immunohistochimique n'était réalisé de façon systématique. Lors de l'examen microscopique, le stade TNM post-chimiothérapie (ypTNM) était déterminé sur toutes les tumeurs et les ganglions selon la 7<sup>ème</sup> classification de l'IUCC 2009 [46].

### 2. Score de régression TRG.

Le score de régression a été réalisé comme décrit précédemment [117] en se basant sur une évaluation microscopique de la taille des résidus tumoraux viables observés, proportionnellement à la taille initiale du lit tumoral. Le lit tumoral était caractérisé par la présence de zones de fibrose dans la paroi vésicale et au niveau des tissus mous péri-vésicaux.

Les zones de régression montraient un lit tumoral fait d'une fibrose dense, sans cellule tumorale résiduelle. Par place on notait de l'œdème ou une accumulation de macrophages plus ou moins associés à des cellules inflammatoires essentiellement lymphocytaires mais aussi, plus rarement, des polynucléaires éosinophiles ou neutrophiles. Les plages de nécrose tumorale étaient plus rares. Les ganglions lymphatiques montraient des signes de régression tumorale comparables (Figure 33).

Le score de régression était défini comme suit (*Tableau 10*), en référence au score défini par *Fleischmann* [117]. Les lésions papillaires superficielles ou les lésions de carcinome in situ observées n'étaient pas prises en compte pour l'évaluation de la régression tumorale.

Selon le même principe, les ganglions ne présentant pas de zones évidentes de métastases antérieures étaient considérés de grade TRG1a, alors que ceux présentant des zones de fibrose indiquant la régression complète d'une métastase étaient considérées de grade TRG1b. L'ensemble des ganglions TRG1a et TRG1b, constituant le groupe de score TRG1 (Figure 33).

Le grading était déterminé séparément sur la pièce de cystectomie et les ganglions lymphatiques du curage. Pour chaque patient, le TRG « dominant » (TRG le plus haut) entre celui de la tumeur primitive et celui des ganglions lymphatiques était déterminé.

*Tableau 10: Score de régression tumorale selon Fleischmann.*

TRG1	Réponse complète	<b>Absence</b> de cellule tumorale résiduelle identifiable et fibrose extensive du lit tumoral. (Figure 29, Figure 30)
TRG2	Réponse forte	Lit tumoral avec prédominance de fibrose et cellules tumorales résiduelles occupant <b>moins de 50%</b> de la surface tumorale. (Figure 31)
TRG3	Absence de réponse ou réponse faible	Présence de cellules tumorales résiduelles sur <b>plus de 50%</b> de la surface tumorale ou absence de régression. (Figure 32)

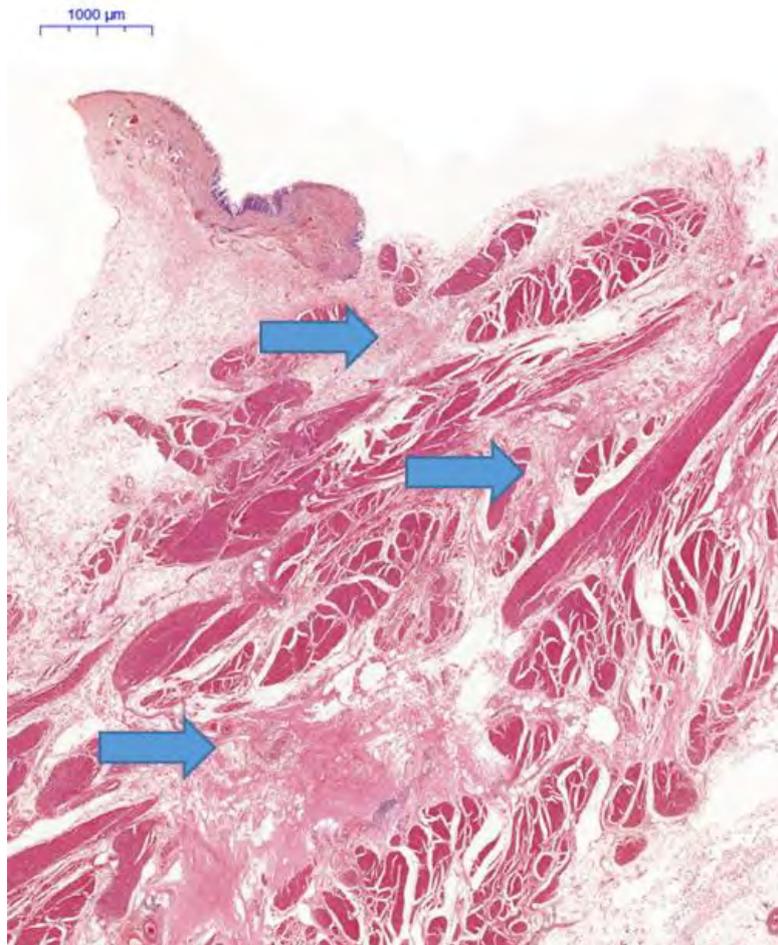


Figure 29: TRG1 : Aspect fibreux cicatriciel au niveau de la sous-muqueuse et du muscle détrusor (flèches) figurant le lit tumoral initial. (Coloration H&E).

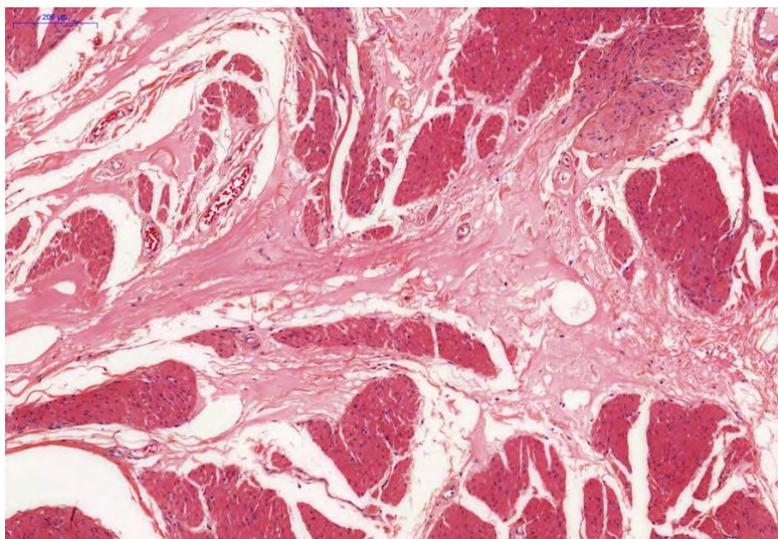


Figure 30: TRG1 : Fibrose dense et infiltrat inflammatoire lymphocytaire dispersé (H&E).

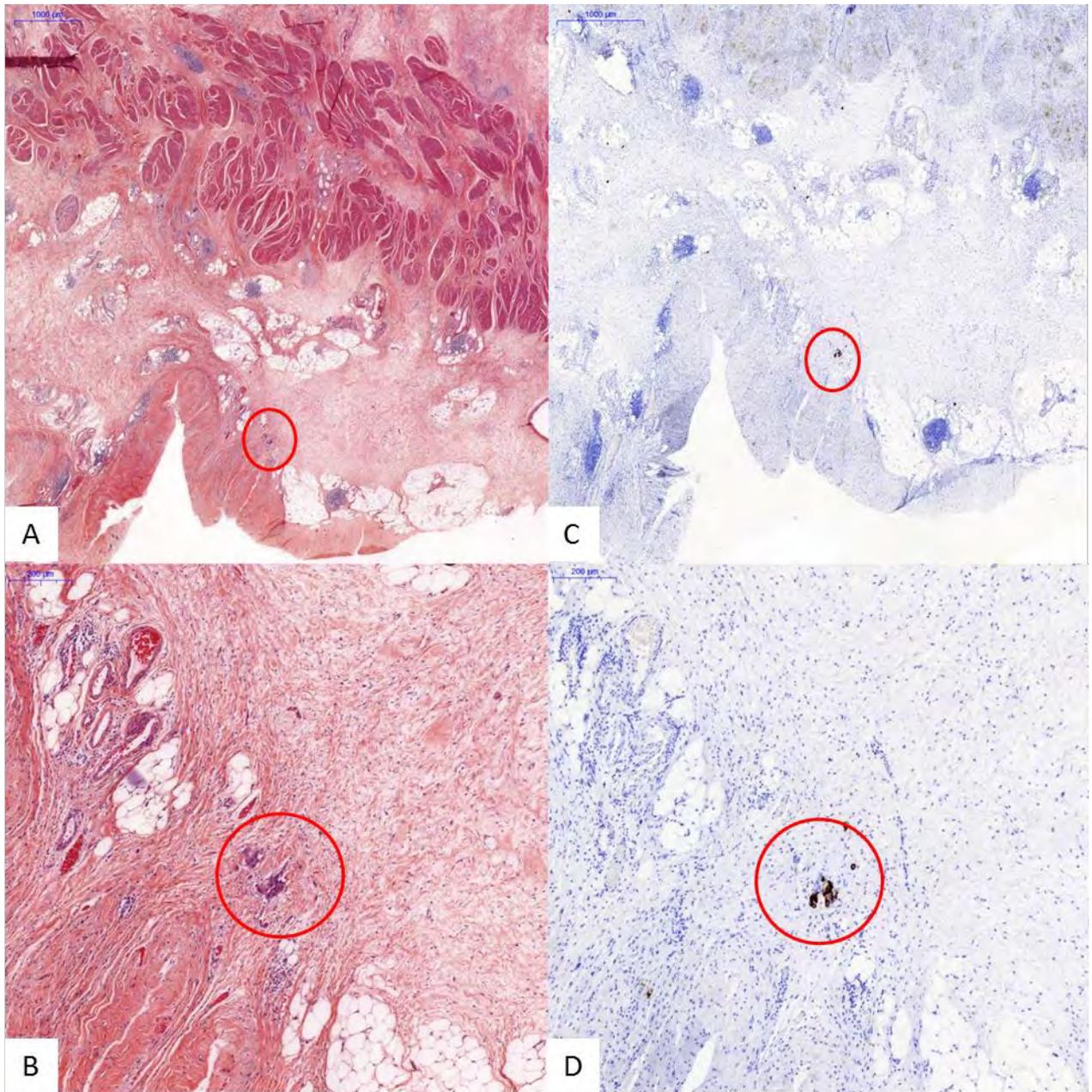


Figure 31: TRG2 : Cellules tumorales résiduelles dans le tissu adipeux péri-vésical (ypT3) au sein d'un lit tumoral essentiellement fibreux. A et B : Coloration H&E ; C et D : Immunomarquage anti-CK7.

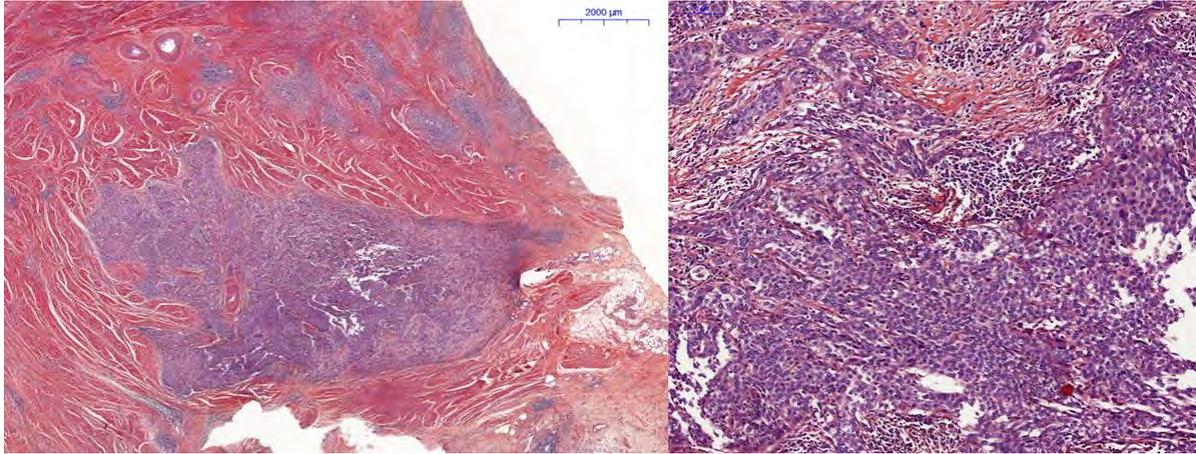


Figure 32: TRG3 : Tumeur résiduelle abondante, infiltrant le muscle, sans signe de régression. Coloration H&E.

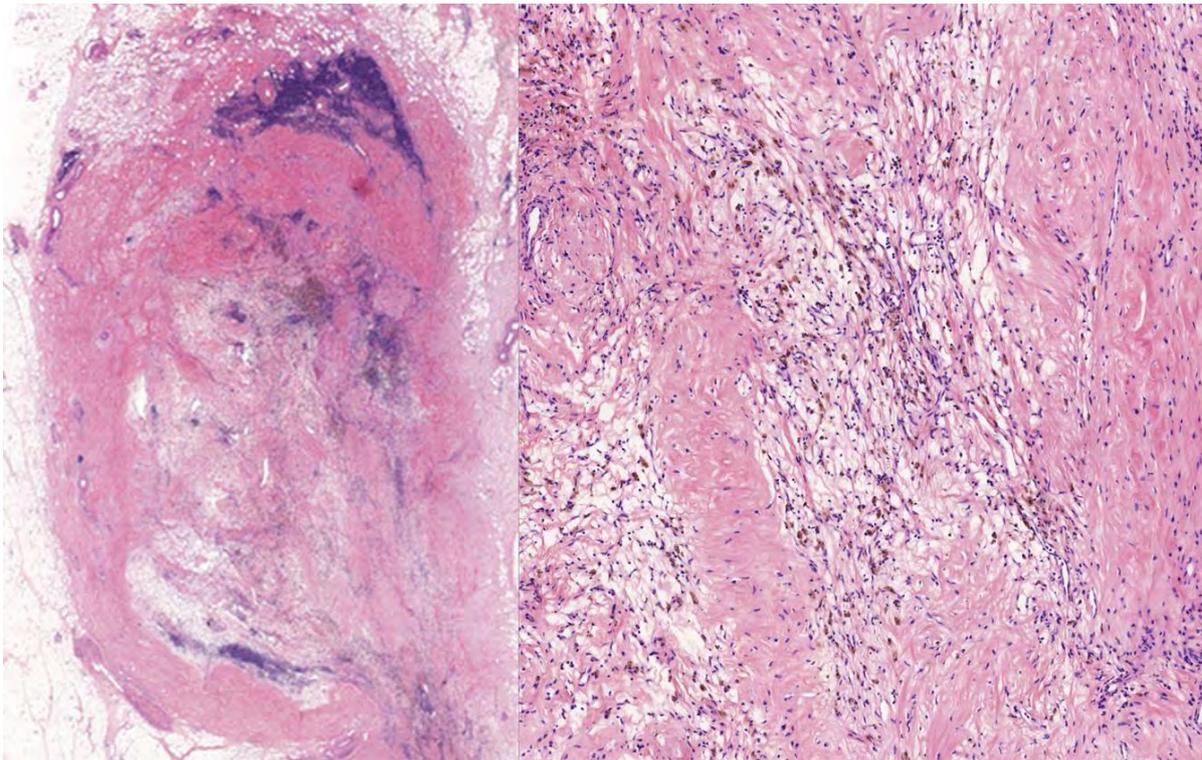


Figure 33: TRG1b : Ganglions lymphatiques avec régression complète des métastases ganglionnaires. Zones fibreuses nodulaires riches en macrophages. (H&E X10 à gauche ; X100 à droite)

#### D. Analyses statistiques

Les caractéristiques de la population ont été décrites avec les statistiques usuelles. Les variables qualitatives sont décrites par le nombre et le pourcentage de chaque modalité de la variable. Les données quantitatives sont décrites par la médiane, le minimum et le maximum. Les comparaisons entre les groupes sont réalisées par le test du Chi-2 ou le test exact de Fisher pour les variables qualitatives et par le test de Mann-Whitney pour les variables quantitatives. Le coefficient de corrélation de Spearman a été calculé pour les associations entre les variables quantitatives.

Pour les analyses de survie, la date de référence est la date de la chirurgie. La survie globale est définie par le délai entre la date de référence et la date de décès ou la date de dernières nouvelles (données censurées). La survie sans récurrence est définie par le délai entre la date de référence et la date du premier événement survenu (récurrence locale, récurrence haut appareil, récurrence métastatique ou décès). Les patients en vie à la date des dernières nouvelles sont censurés à cette date. Les données de survie sont estimées à l'aide de la méthode de Kaplan-Meier et présentées avec leur intervalle de confiance à 95%. Les analyses univariées sont réalisées à l'aide du test du logrank pour les variables qualitatives.

## V. RESULTATS

### A. Description de la population

Au total, sur 159 patients opérés au CHU de Toulouse et à l'IUCT, par cystectomie, cystoprostatectomie ou exentération pelvienne antérieure, pour un carcinome urothélial de la vessie, entre janvier 2010 et décembre 2015, 66 ont reçu de la chimiothérapie néoadjuvante. Notre population d'étude comportait donc 66 patients.

Les caractéristiques clinico-pathologiques initiales de la population étudiée sont résumées dans le Tableau 11. L'âge médian au moment de la chirurgie était de 63 ans. Le suivi médian était de 32,2 mois (IC95 % [24–35]). Le délai médian entre la dernière RTV et la cystectomie radicale était de 150,5 jours (de 96 à 275 jours). Tous présentaient un carcinome urothélial de haut grade selon l'OMS 2016. Le stade TNM déterminé sur RTV était au moins pT2 pour tous les cas étudiés.

Tableau 11: Caractéristiques clinico-pathologiques initiales de la population.

<b>Age en années, au moment de la chirurgie (médian)</b>	63 (46-76)
<b>Sexe</b> (n = 66)	
Femme	10 (15,2%)
Homme	56 (84,8%)
<b>Suivi médian</b> (mois)	32,2 (IC 95% [23,95 – 34,96])
<b>BMI</b> (n = 64)	26,7 (17,5 - 51,4)
<b>RTV</b> (n = 61)	
Caractère complet de la RTV	45 (73,8%)
<b>Grade OMS 2016</b> (n = 66)	
Haut grade	66 (100%)
Bas grade	0
<b>Stade pT</b> (n = 66)	
pT2 minimum	66 (100%)
< pT2	0
<b>Présence de CIS associé sur la RTV</b> (n = 66)	17 (25,7%)
<b>Antécédents d'instillations endo-vésicales</b> (n = 66)	
BCG	9 (13,6%)
Mitomycine	1 (1,5%)
<b>Gestes associés</b> (n = 66)	
Pelvectomie antérieure	9 (13,6%)
NUT	2 (3%)
<b>Adénopathie(s) pelvienne(s) sur le TDM</b>	12 (18,2%)
<b>Hydronéphrose</b>	22 (33,3%)
<b>Délai médian entre la RTV et la Cystectomie</b> (jours)	150,5 (96 - 275)

Concernant les régimes de chimiothérapie, l'association de chimiothérapie la plus fréquemment utilisée était le MVAC, reçue par 37 patients (61,7 %). Une chimiothérapie de type GC a été prescrite pour 18 patients (30 %), et 5 patients (8,3%) ont reçu une autre association à base de carboplatine (Tableau 12).

Tableau 12: Description des régimes de chimiothérapie néoadjuvante

Type de CNA	N (%)
MVAC	37 (61,7%)
GC	18 (30%)
Autre association à base de Carboplatine	5 (8,3%)
Données manquantes	6

#### B. Réponse à la chimiothérapie

Les données de l'examen anatomopathologique des pièces de cystectomie sont résumées dans le Tableau 13. En définissant la réponse à la chimiothérapie par le stade ypTNM (avec ypT <ypT2 et ypN=0) 39 patients (59,1 %) étaient considérés comme répondeurs à la CNA à la date de la chirurgie. Le taux de réponse complète était de 34,8% (soit 23 patients ne présentant plus de tumeur résiduelle, stade ypT0). Cinquantes-deux patients (78,8%) ne présentaient aucune métastase ganglionnaire.

Tableau 13: Caractéristiques anatomo-pathologiques sur les pièces de cystectomie des 66 patients

<b>Données Anatomopathologiques sur la pièce de cystectomie</b>	
Taille de la lésion (cm)	1 (0 - 11)
<b>Stade tumoral (pT)</b>	
ypT0	23 (34,8%)
ypTis	10 (15,2%)
ypT1	6 (9,1%)
ypT2	5 (7,6%)
ypT3	16 (24,2%)
ypT4	6 (9,1%)
<b>Evaluation ganglionnaire</b>	
Nombre de ganglions examinés par patient	16 (2 - 43)
<b>Stade ganglionnaire (ypN)</b>	
ypN0	52 (78,8%)
ypN1	12 (18,2%)
ypNx	2 (3%)
<b>Présence de CIS associé (sur la pièce de cystectomie)</b>	24 (36,4%)
<b>Emboles vasculaires</b>	12 (18,2%)
<b>Engainements péri-nerveux</b>	11 (16,7%)
<b>Statut des marges de résection</b>	
R1/R2	4 (6,1%)
R0	62 (93,9%)
<b>Adénocarcinome prostatique associé</b>	14 (21,2%)

### C. Scores de régression tumorale TRG

L'analyse des scores de régression tumorale déterminés sur les pièces de cystectomie (Tableau 14), montre que le TRG est bien corrélé au stade ypT ( $p < 0.0001$ ).

On note que 29,6% des patients classés comme non répondeurs (par leur stade ypT > ypT2), présentent une régression de plus de 50% de la surface tumorale (TRG2).

Tableau 14: Corrélation du TRG à la réponse à la CNA

	<pT2 (n = 39)	≥ pT2 (n = 27)
TRG1	34 (87,2%)	0
TRG2	5 (12,8%)	8 (29,6%)
TRG3	0	19 (70,4%)

Les scores de régression évalués sur les ganglions et les score TRG des tumeurs primitives correspondantes sont résumés dans le Tableau 15. Dans 72% des cas, le TRG évalué sur la pièce

de cystectomie et sur les ganglions du curage ganglionnaire étaient identiques. Les TRG discordants (n=18) montrent majoritairement une régression plus importante au niveau ganglionnaire que sur la tumeur primitive. Pour 5 cas (7%), on observait une régression tumorale moins importante sur les métastases ganglionnaires que sur la tumeur primitive. Le score TRG le plus élevé (TRG dominant) était TRG1 pour 48,5% des cas (n=32/66) ; TRG2 pour 15,1% des cas (n=10/66) et TRG3 pour 36,4% (n=24/66).

Tableau 15: Scores TRG sur les tumeurs primitives et sur les curages ganglionnaires. (b) = nombre de cas avec régression tumorale évidente dans les ganglions.

	Tumeurs primitives		
	TRG1	TRG2	TRG3
Ganglions			
TRG1 (b)	31 (9)	9 (4)	12 (2)
TRG2	0	1	0
TRG3	2	3	7
Total	34 (1 cas sans curage)	13	19

#### D. Corrélation de la réponse à la CNA avec la survie

Pour l'ensemble de la cohorte, le taux de survie globale à deux ans était de 83,2 % (95% IC [69.9 – 90.9]) et la survie sans récurrence de 65% (95% IC [51.0 - 76]). Il s'agissait de récurrence locale dans 3 % des cas et d'une récurrence métastatique dans 30,3 % des cas.

Avec un suivi médian de 32,2 mois (IC95 % [24–36]), la survie globale à deux ans des patients répondeurs à la CNA était de 87,2% (IC95 % [69,2–95]) tandis que celle des patients non répondeurs était de 77,3% (IC95 % [53,3–90]) (p = 0,32). Concernant la survie sans récurrence, la différence était proche de la significativité avec un taux de survie sans récurrence à deux ans de 73 % (IC 95% [54,5 –85]) pour les patients répondeurs à la CNA contre 53,7 % (IC 95 % [31,8–71,4]) pour les non répondeurs (p = 0,08) (Figure 34).

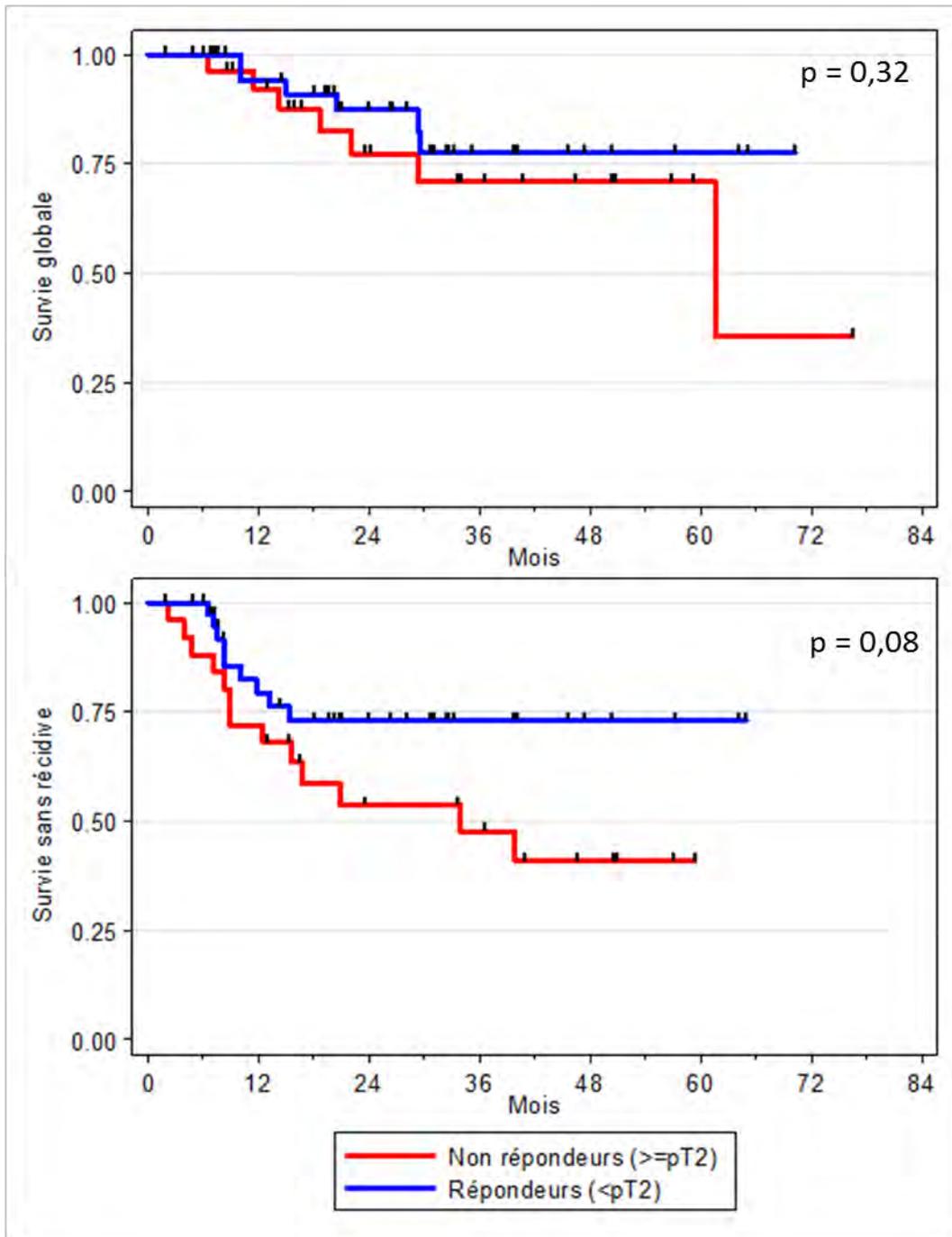


Figure 34: Survie globale et survie sans récurrence en fonction de la réponse à la CNA (définie par  $y_pT < pT2$  et  $N0$ ).

#### E. Corrélation du TRG avec la survie

En analyse univariée, le score de régression TRG de la tumeur primitive était associé à la survie (Figure 35 et Figure 36).

Pour la survie sans récurrence (Figure 35), la différence était significative avec un taux de survie à deux ans de 75,2% (IC 95% [58,7 –85.8]) pour les patients avec un TRG  $\leq$  2 contre 41.7 % (IC 95 % [18.5–63.5]) pour ceux ayant un TRG = 3 ( $p = 0,008$ ).

Concernant la survie globale (Figure 36), les courbes montrent la même tendance, mais sans différence significative. On observe un taux de survie globale à deux ans de 86,9% (IC 95% [71.2 –94.4]) pour les patients avec un TRG  $\leq$  2 contre 74% (IC 95 % [44.2–89.5]) pour ceux ayant un TRG = 3 ( $p = 0,11$ ).

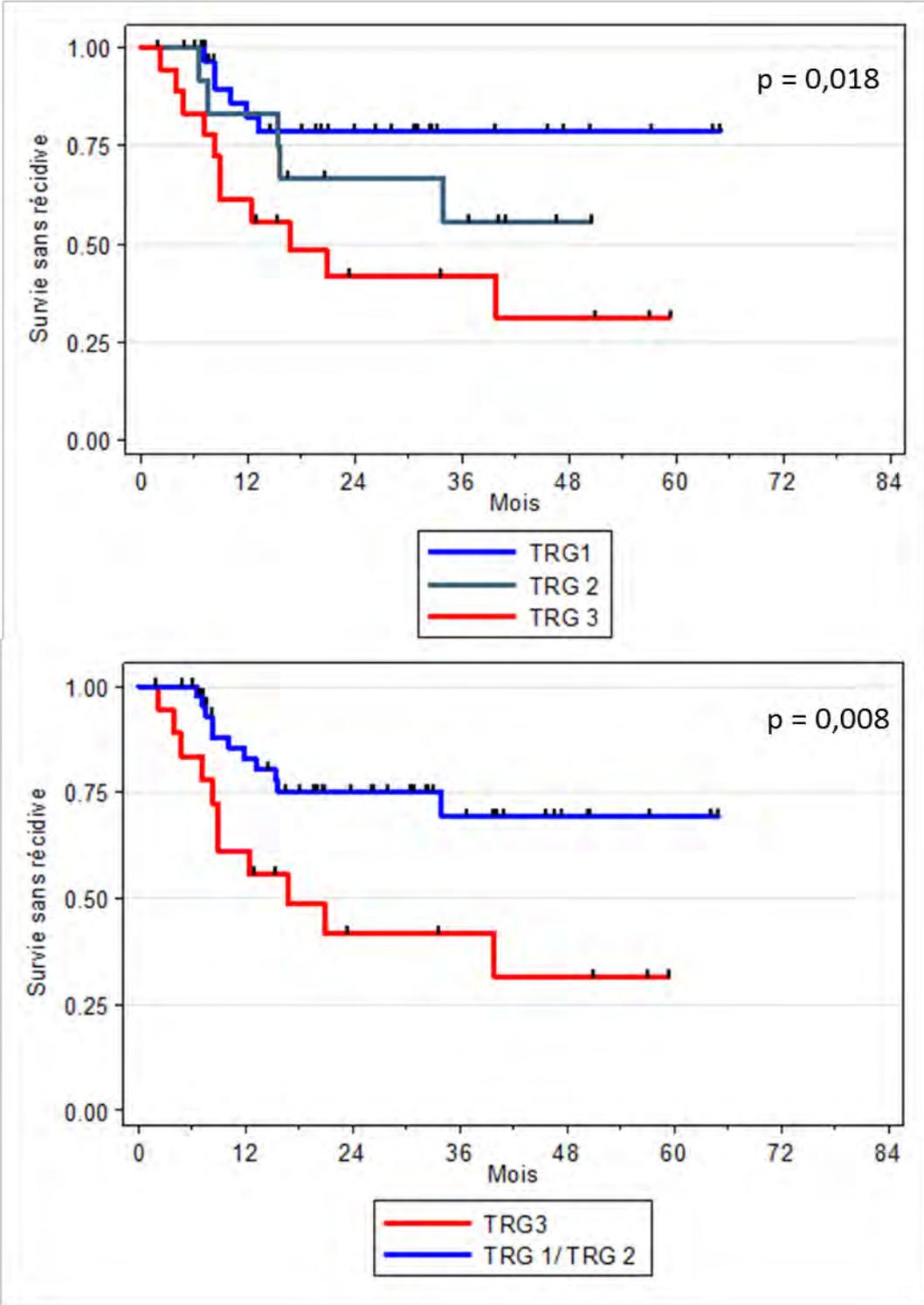


Figure 35: Survie sans récurrence en fonction du score TRG sur pièce de cystectomie post-CNA.

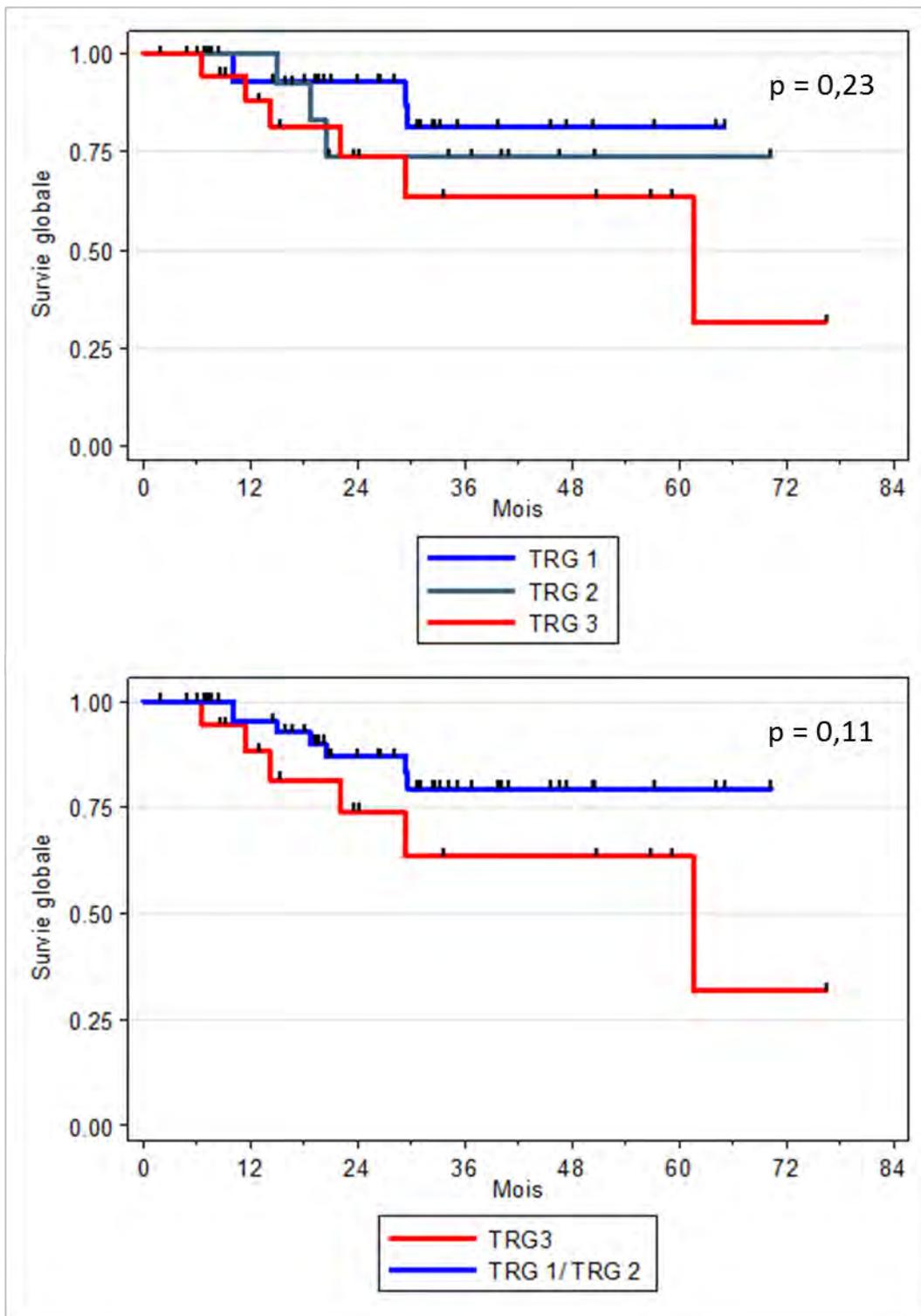


Figure 36: Survie globale en fonction du score TRG sur pièce de cystectomie post-CNA

F. Facteurs cliniques initiaux prédictifs de la réponse à la CNA  
 En analyse univariée (Tableau 16), aucun des facteurs cliniques étudiés n'était prédictif d'une réponse à la chimiothérapie néoadjuvante. On note toutefois que 83,8 % des patients répondeurs à la CNA avaient eu une résection macroscopiquement complète lors de leur dernière RTV contre 58,3 % des patients non répondeurs ( $p = 0,03$ ). Cet élément constitue très probablement un facteur confondant.

Tableau 16: Analyse univariée des facteurs clinico-pathologiques associés la réponse à la CNA (réponse définie par  $ypT < pT2$ ).

	<pT2 (n = 39)	≥ pT2 (n = 27)	p
<b>Age &lt; 60 ans</b> (n = 66)	11 (28,2%)	11 (40,7%)	0,29
<b>Sexe</b> (n = 66)			0,3
Homme	35 (89,7%)	21 (77,8%)	
Femme	4 (10,3%)	6 (22,2%)	
<b>Antécédents d'instillation endo-vésicale</b> (n = 66)			
BCG	3 (7,7%)	6 (22,2%)	0,14
Mitomycine	0	1 (3,7%)	0,41
<b>Hydronéphrose</b> (n = 66)	12 (30,8%)	10 (37%)	0,6
<b>Présence de CIS sur la RTV</b> (n = 66)	12 (30,8%)	5 (18,5%)	0,30
<b>Tumeurs multifocales</b> (n = 58)	9 (26,5%)	7 (29,2%)	0,82
<b>Résection complète lors de la dernière RTV</b> (n = 61)	31 (83,8%)	14 (58,3%)	<b>0,03</b>
<b>Type de CNA</b> (n = 60)			0,56
MVAC	20 (57,1%)	17 (68%)	
Cisplatine/Gemcitabine	11 (31,4%)	7 (28%)	
Association à base de Carboplatine	4 (11,4%)	1 (4%)	

Données manquantes: résection complète lors de la dernière RTV (n=5 dont 3 cas ≥ pT2 et 2 cas < pT2);  
 type de CNA (n=6 dont 2 cas ≥ pT2 et 4 cas < pT2 )

G. Facteurs cliniques initiaux prédictifs de la régression tumorale (TRG)  
 La définition du caractère répondeur à la CNA par un score TRG  $\leq 2$  ne permet pas non plus de mettre en évidence de facteurs cliniques prédictifs de la réponse à la thérapeutique (Tableau 17).

Tableau 17: Analyse univariée des facteurs clinico-pathologiques associés à la régression tumorale

	TRG 1/2 (n = 47)	TRG 3 (n = 19)	p
<b>Age &lt; 60 ans</b> (n = 66)	11 (23,4%)	11 (40,7%)	0,07
<b>Sexe</b> (n = 66)			0,46
Homme	41 (87,2%)	15 (78,9%)	
Femme	6 (12,8%)	4 (21,1%)	
<b>Antécédents d'instillation endo-vésicale</b> (n = 66)			
BCG	5 (10,6%)	4 (21,1%)	0,27
Mitomycine	1 (2,1%)	0 (0%)	1
<b>Hydronéphrose</b> (n = 66)	14 (29,8%)	8 (42,1%)	0,33
<b>Présence de CIS sur la RTV</b> (n = 66)	14 (29,8%)	3 (16,7%)	0,35
<b>Tumeurs multifocales</b> (n = 58)	13 (31,7%)	3 (17,6%)	0,35
<b>Résection complète lors de la dernière RTV</b> (n = 61)	36 (81,8%)	9 (52,9%)	<b>0,048</b>
<b>Type de CNA</b> (n = 60)			0,18
MVAC	23 (54,8%)	14 (77,8%)	
Cisplatine/Gemcitabine	14 (33,3%)	4 (22,2%)	
Association à base de Carboplatine	5 (11,9%)	0	

Données manquantes: résection complète lors de la dernière RTV (n=5 dont 2 cas TRG3 et 3 cas TRG1/2);  
type de CNA (n=6 dont 1 cas TRG3 et 5 cas TRG1/2)

#### H. Variants morphologiques

Sur les 66 patients de notre cohorte, 33 avaient eu leur dernière RTV pré-chimiothérapie dans un centre extérieur différent du CHU de Toulouse. Pour 14 de ces 33 cas, le matériel tumoral (blocs FFPE et lames colorées) n'a pu être récupéré pour l'étude. Les 19 autres cas extérieurs nous ont été adressés. La relecture des lames colorées (H&E) à la recherche des variants morphologiques sur la dernière RTV pré chimiothérapie a donc été effectuée sur un total de 52 cas.

Parmi les cas relus, 48,1 % (n = 25/52) présentaient un variant morphologique tel que défini par l'OMS 2016 [5]. Cinquante-deux pourcent des patients présentant un variant morphologique sur la dernière RTV étaient répondeurs à la chimiothérapie contre 63 % des patients ne présentant pas de variants (p=0.42). On note donc une tendance non significative en faveur d'une meilleure réponse à la CNA en cas de carcinome urothélial ne présentant aucun variant morphologique (Tableau 18). Tous variants confondus, les tumeurs comportant un variant morphologique étaient équitablement réparties en répondeurs ou non-répondeurs (52% vs 48% respectivement).

Tableau 18: Réponse à la CNA en fonction de la présence d'un variant morphologique sur la dernière RTV pré-CNA.

Variant morphologique	Total (n=52)	pT<pT2 (n=30)	pT>pT2 (n=22)	
non	27 (51,9%)	17 (63%)	10 (37%)	p = 0,42
oui	25 (48,1%)	13 (52%)	12 (48%)	

De même, lorsque l'on analyse chaque variant morphologique séparément, on ne trouve pas d'association significative avec la réponse à la CNA, que l'on définisse la réponse par le stade ypT ou par le TRG (Tableau 19). Un variant épidermoïde était présent dans 21,2 % des cas. Lorsque la réponse à la CNA était définie par le stade ypT<pT2, la présence d'un variant épidermoïde était plus fréquente chez les patients non répondeurs. Trente-six virgule quatre pourcent de ces cas variants épidermoïdes étaient répondeurs à la CNA contre 63,6 % de non répondeurs (p = 0,17). Lorsque la réponse était définie par un score TRG < 3, on observait une distribution inverse des cas comportant un variant épidermoïde (avec 63.6% d'entre eux présentant une régression tumorale (TRG1/2) contre 36.4% ne montrant aucune régression).

Les cas présentant un variant micropapillaire étaient plus fréquemment répondeurs (71,4 % de répondeurs vs 28,6 % de non répondeurs ; p = 0.68). Concernant le variant glandulaire, on observait une tendance en faveur de la réponse à la CNA. Les autres variants (plasmocytoïde, sarcomatoïde, en nids, ou microkystique) étaient beaucoup moins fréquents, représentant entre 1.9% et 3,8 % des cas (Figure 37).

Tableau 19: Réponse à la CNA en fonction de la morphologie tumorale. Comparaison des deux modes de définition de la réponse (ypT<pT2 ou TRG1/2).

	Total (n=52)	pT<pT2 (n=30)	pT>pT2 (n=22)	p	TRG1/2 (n=47)	TRG3 (n=19)	p
CU sans variant	27 (51,9%)	17 (63%)	10 (37%)	0,42	19 (70,4%)	8 (29,6%)	0,85
V. Epidermoïde	11 (21,2%)	4 (36,4%)	7 (63,6%)	0,17	7 (63,6%)	4 (36,4%)	0,72
V. Glandulaire	9 (17,3%)	5 (55,5%)	4 (44,4%)	1	6 (66,7%)	3 (33,3%)	1
V. Micropapillaire	7 (13,5%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)	0,68	5 (71,4%)	2 (28,6%)	1
V. Plasmocytoïde	2 (3,8%)	2 (100%)	0	0,5	2 (100%)	0	1
V. Sarcomatoïde	2 (3,8%)	2 (100%)	0	0,5	2 (100%)	0	1
V. en nids	1 (1,9%)	0	1 (100%)	0,42	0	1 (100%)	0,31
V. microkystique	1 (1,9%)	0	1 (100%)	0,42	0	1 (100%)	0,31

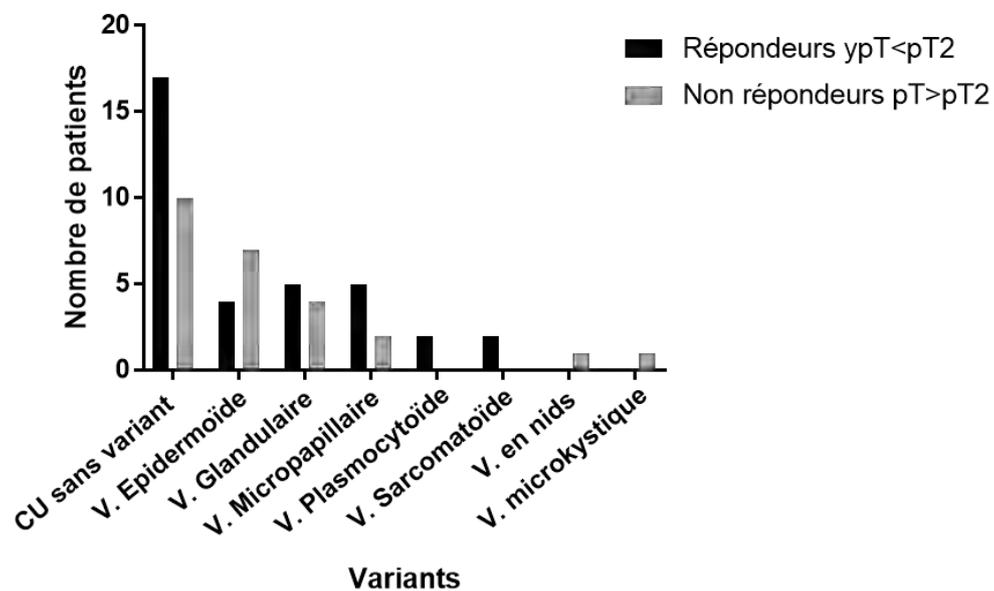


Figure 37: Nombre de patients répondeurs à la CNA en fonction des variants morphologiques.

#### I. Etude immunohistochimique

La construction des blocs de TMA a permis d'y inclure les 52 cas pour lesquels nous disposions de matériel tumoral FFPE issu des dernières RTV pré-CNA. Toutefois, pour deux de ces cas, le matériel tumoral était peu abondant et s'est épuisé, ce qui n'a pas permis d'analyser les marquages. L'étude immunohistochimique a donc été réalisée sur un total de 50 cas.

## 1. Phénotype immunohistochimique

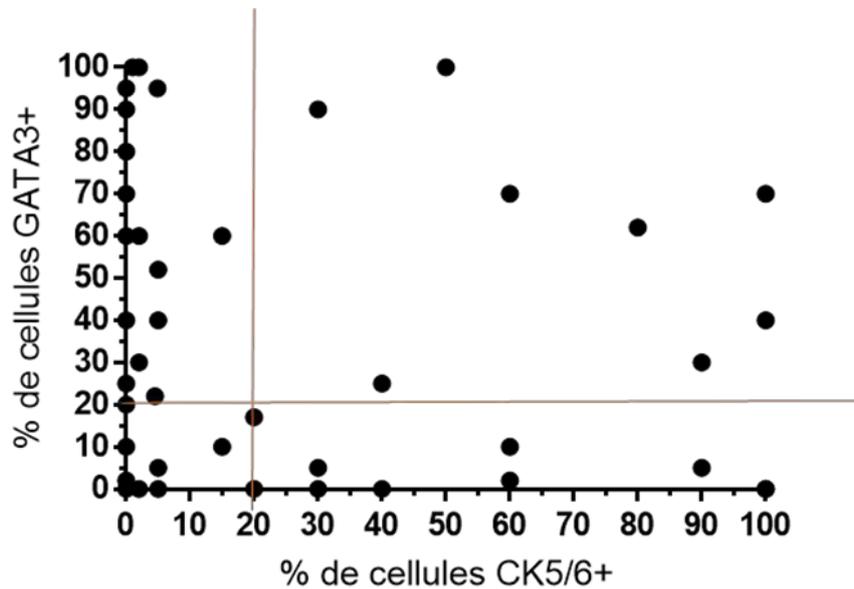


Figure 38: Marquages immunohistochimiques CK5/6 et GATA3, pourcentage de cellules marquées. Les lignes rouges représentent le seuil de positivité de 20%.

Nous n'avons pas observé de corrélation significative entre les marquages CK5/6 et GATA3 (Figure 38). Parmi les cas CK5/6 positifs, 57,9% étaient GATA 3 négatifs ( $n = 11/19$ ) ce qui correspond à un phénotype immunohistochimique basal. De même, 58% des cas CK5/6 négatifs, étaient fortement positifs pour GATA3 ( $n = 18/31$ ) ce qui correspond à un phénotype immunohistochimique luminal. Ces résultats montrent l'absence d'association significative entre les deux marqueurs ( $p = 0.86$ , coefficient de corrélation de Spearman  $r = -0.024$ ).

Les immunomarquages CK5/6 et GATA3 de trois tumeurs représentatives sont illustrés par les Figure 39, Figure 40 et Figure 41.

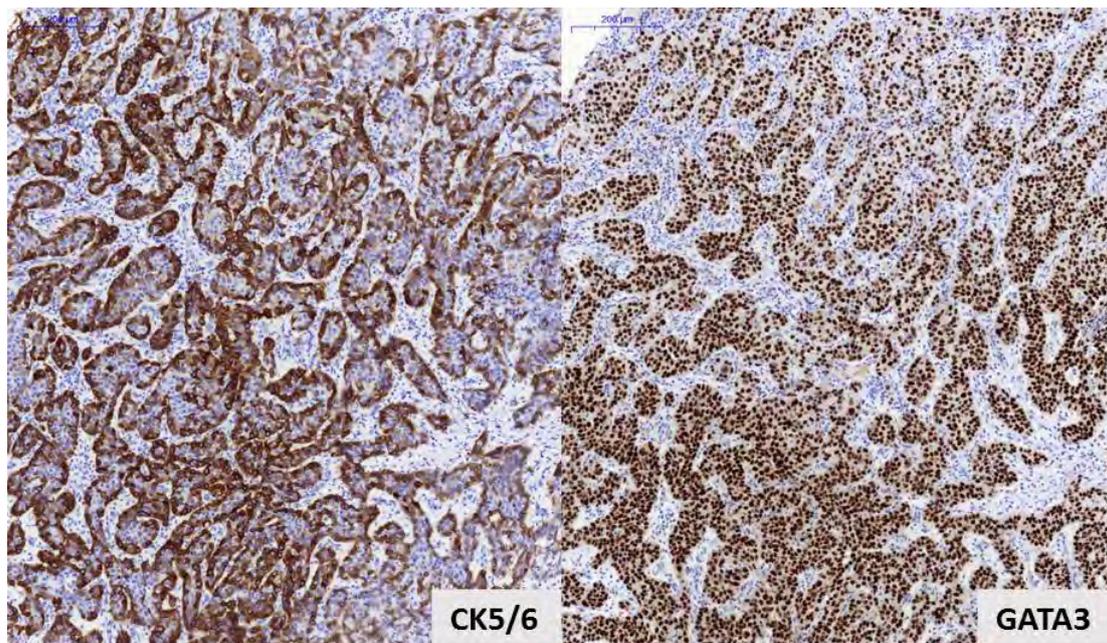


Figure 39: Exemple représentatif de cas "double positif" CK5/6 et GATA3 en IHC (Patient 185).

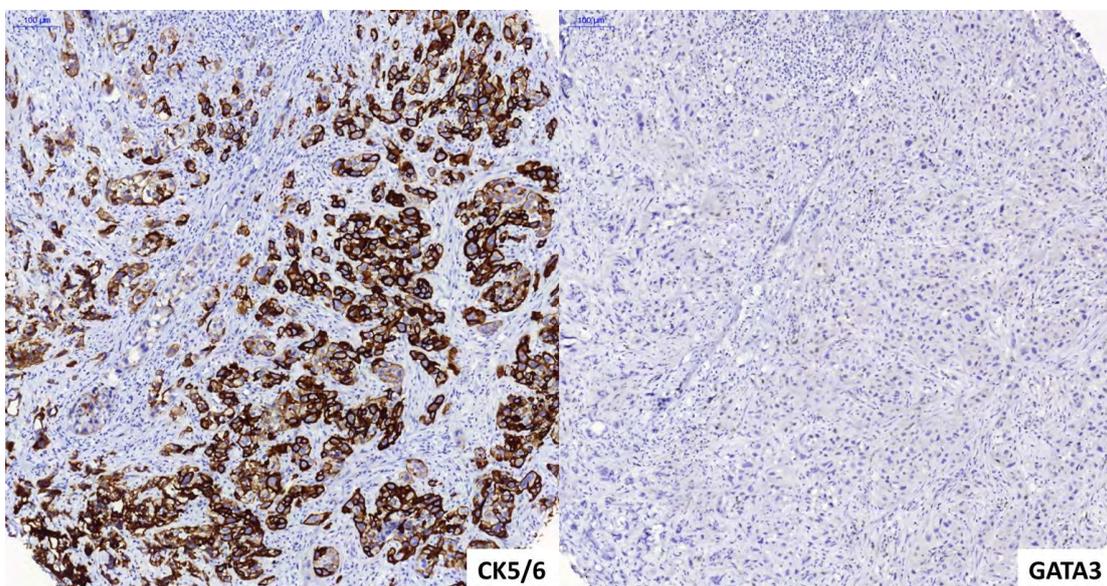


Figure 40: Exemple représentatif d'un profil CK5/6+ GATA3- en IHC (Patient 53).

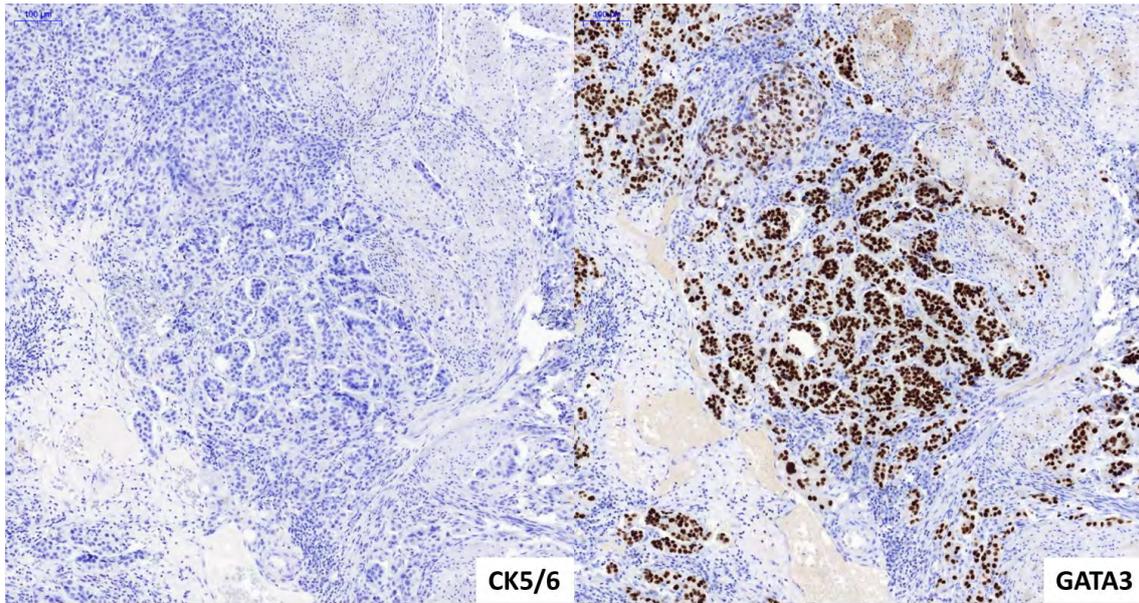


Figure 41: Exemple représentatif d'un profil CK5/6 - GATA3 + en IHC (Patient 108).

Il faut noter que pour chaque patient, deux zones tumorales représentatives et homogènes ont été sélectionnées pour les TMA. La présence d'un marquage positif (>20% de cellules marquées) sur au moins une des deux zones tumorales étudiées faisait retenir le cas comme positif. Nous avons observé une discordance de marquage entre les deux zones tumorales sélectionnées (pour au moins un des quatre marqueurs étudiés) dans 45,8 % des cas.

## 2. Marqueurs IHC et réponse à la CNA

### a) En fonction du stade TNM

La fréquence des différents marqueurs immunohistochimiques étudiés et leur association avec la réponse à la chimiothérapie est résumée dans le Tableau 20.

Tableau 20: Distribution des marqueurs immunohistochimiques étudiés en fonction de la réponse à la CNA définie par le stade ypT<pT2.

	Total	Répondeurs pT<pT2 (n=28)	Non répondeurs pT>pT2 (n=22)	p
CK5/6 +	19 (38%)	7 (36,8%)	12 (63,2%)	<b>0,04</b>
GATA3 +	26 (52%)	15 (57,7%)	11 (42,3%)	0,8
CK20 +	18 (36%)	14 (77,8%)	4 (22,2%)	<b>0,03</b>
CD44 +	14 (28%)	7 (50%)	7 (50%)	0,59
FGFR3+	2 (4%)	0	2 (100%)	0,19

Un marquage positif avec la cytokératine CK5/6 (marqueur basal) était présent dans 38% des cas. Cette positivité de CK5/6 était significativement plus fréquente chez les patients non répondeurs à la chimiothérapie. En effet, 63,2 % des cas CK5/6 positifs étaient non répondeurs contre 36,8 % de répondeurs ( $p=0,04$ ). A l'inverse, un marquage positif avec la CK20 (marqueur luminal) était significativement associé à une réponse à la chimiothérapie ( $p=0,03$ ). Concernant les autres marqueurs, aucune différence significative n'a été retrouvée. Le pourcentage de patients avec une positivité de GATA3 était plus important parmi les répondeurs (57,7 % vs 42,3 % ;  $p=0.8$ ). Le nombre de patients avec une tumeur CD44 positive était le même dans les deux groupes ( $p=0.59$ ).

On note que seuls deux cas présentaient une positivité avec l'anticorps anti FGFR3. Ces deux cas étaient non répondeurs à la chimiothérapie.

Les profils immunohistochimiques avec le couple d'anticorps CK5/6 et GATA3 sont résumés dans le Tableau 21.

Tableau 21: Association des marquages IHC CK5/6 et GATA3 et corrélation avec la réponse à la CNA.

	Total	Répondeurs pT<pT2 (n=28)	Non répondeurs pT>pT2 (n=22)	
<b>Profil Basal</b> (CK5/6+ et GATA3-)	11 (22%)	4 (36,4%)	7 (63,6%)	p = 0,19
<b>Profil Luminal</b> (CK5/6- et GATA3+)	39 (78%)	24 (61,5%)	15 (38,5%)	
ou (CK5/6 + et GATA3+)				
ou (CK5/6- et GATA3-)				
<b>Profil Basal</b> (CK5/6+ et GATA3-)	11 (22%)	4 (36,4%)	7 (63,6%)	p = 0,26
<b>Profil Luminal</b> (CK5/6- et GATA3+)	18 (36%)	12 (66,7%)	6 (33,3%)	
<b>Double positifs</b> (CK5/6 + et GATA3+)	8 (16%)	3 (37,5%)	5 (62,5%)	
<b>Double négatifs</b> (CK5/6- et GATA3-)	13 (26%)	9 (69,2%)	4 (30,8%)	

On note que 22% des cas (n=11/50) présentaient un profil de type basal (CK5/6 + / GATA3 -). Les 78 % de cas restants étant de type luminal ou « non basal ». Ces derniers comprenaient 13 cas « double négatifs » (26 %) et 8 cas « double positifs » (16%).

Aucun de ces profils n'était significativement associé à la réponse à la CNA. On note toutefois que les tumeurs de profil basal étaient plus souvent dans le groupe des non répondeurs à la CNA (63,6 % de non répondeurs vs 36,4 % de répondeurs ; p=0.19). A l'inverse le groupe des tumeurs « non basales » présentait une tendance en faveur de la réponse à la CNA (61,5 % de répondeurs vs 38,5 % de non répondeurs ; p=0,19).

La distribution de ces profils IHC et leur association à la réponse à la chimiothérapie est résumée dans la Figure 42.

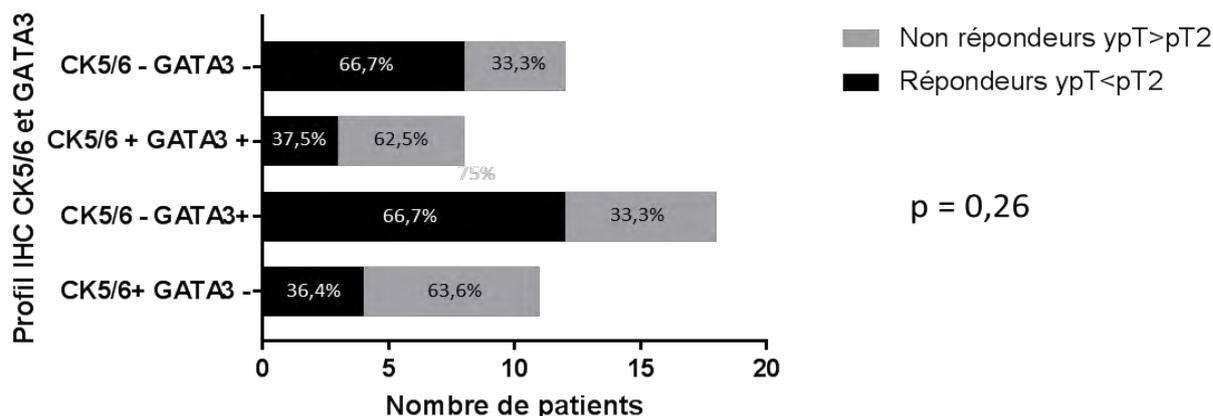


Figure 42: Distribution des patients répondeurs et non répondeurs à la CNA en fonction de leur profil IHC CK5/6 et GATA3.

b) En fonction du TRG

La répartition des différents marqueurs immunohistochimiques étudiés en fonction du grade TRG est résumée dans le Tableau 22

Tableau 22: Distribution des marqueurs immunohistochimiques étudiés en fonction de la réponse à la CNA définie par le TRG.

	Total	Répondeurs TRG 1/2 (n=35)	Non répondeurs TRG3 (n=15)	p
CK5/6 +	19 (38%)	11 (57,9%)	8 (42,1%)	0,16
GATA3 +	26 (52%)	19 (73%)	7 (27%)	0,62
CK20+	18 (36%)	16 (88,9%)	2 (11,1%)	0,02
CD44 +	14 (28%)	10 (71,4%)	4 (28,6%)	1
FGFR3+	2 (4%)	0	2 (100%)	0,08

Avec cette répartition des marqueurs immunohistochimiques en fonction du TRG on ne retrouve plus d'association significative entre le marquage CK5/6 positif et la réponse à la CNA. En effet, 42,1% des cas CK5/6 positifs étaient non répondeurs contre 57,9% de répondeurs (p=0,16). Pour le marquage CK20 positif, l'association avec la réponse à la CNA reste significative avec 88,9% des cas qui étaient répondeurs contre 11,1% de non répondeurs (p=0,02). Concernant les autres marqueurs, aucune différence significative n'a été retrouvée.

Si l'on observe la répartition des profils immunohistochimiques (CK5/6 et GATA3) en fonction du TRG (Figure 43 et Figure 44), on ne retrouve pas d'association significative avec la régression tumorale. Toutefois, on note que les cas de phénotype basal (CK5/6+ et GATA3-) apparaissent répartis différemment entre les répondeurs et les non répondeurs. Parmi ces 11 cas, 6 (54,5%)

présentaient une régression tumorale significative (TRG1 ou 2) et 5 (45,4%) ne présentaient pas de régression significative (TRG3) ( $p = 0,28$ ).

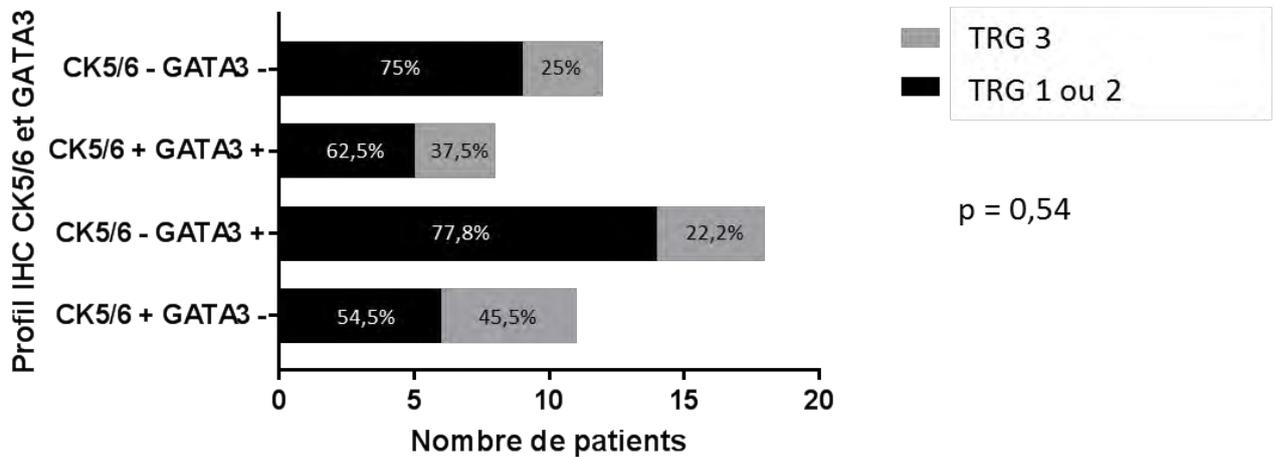


Figure 43: Distribution des profils IHC CK5/6 et GATA3 en fonction de la régression tumorale (TRG).

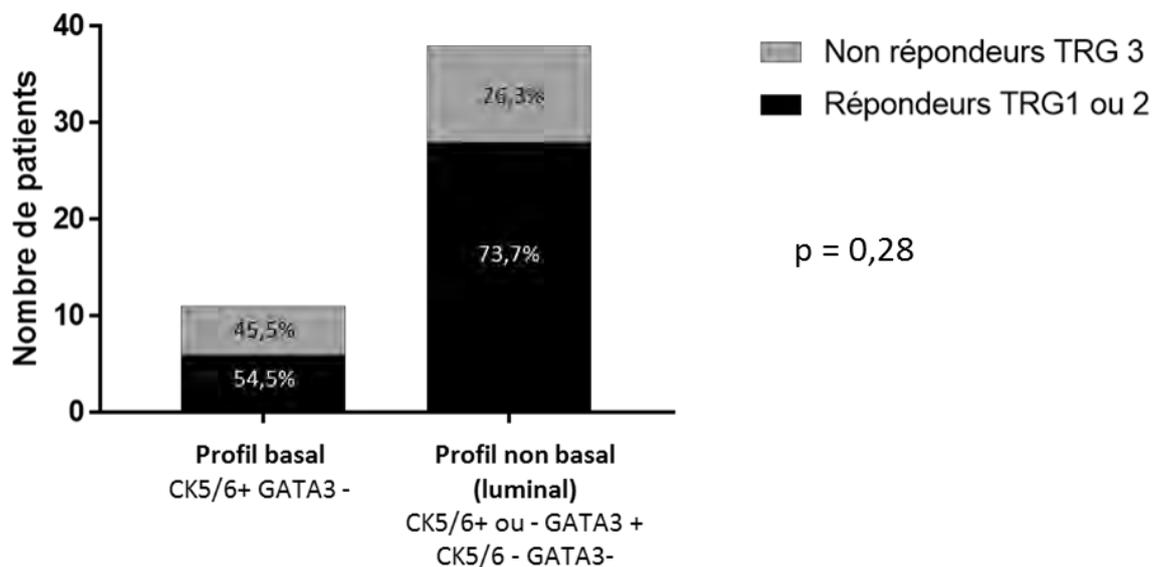


Figure 44: Distribution des profils IHC de type basal et "non basal" ou luminal en fonction du TRG.

### 3. Corrélation des profils IHC à la survie

Les courbes de survie sans récurrence du groupe basal (CK5/6+ et GATA3-) et non basal (CK5/6 + ou - et GATA3 +) sont montrées sur la Figure 45. On n'observe pas de différence entre les deux courbes. Les taux de survie à deux ans étaient de 58,3% (IC 95% [23 –82]) pour les patients du

groupe basal et de 65,5 % (IC 95 % [47,2–78,8]) pour ceux du groupe luminal ou non-basal (p = 0,40).

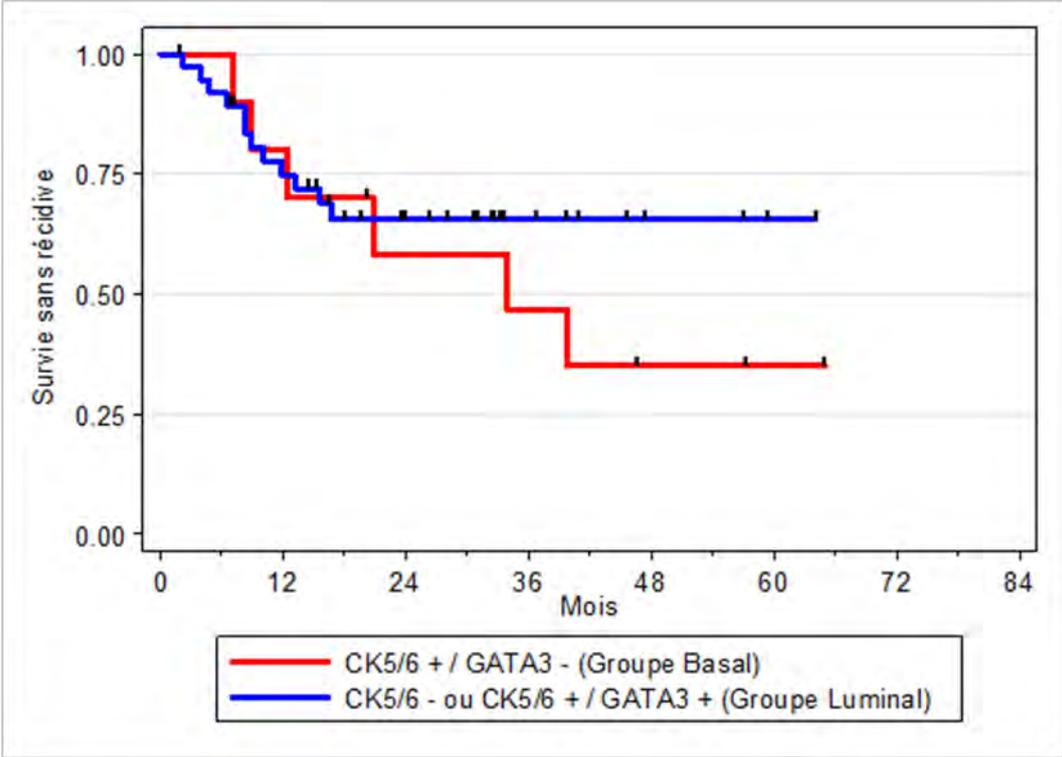


Figure 45: Survie sans récurrence en fonction du profil IHC CK5/6 et GATA3

## J. Résultats de biologie moléculaire

### 1. Extraction et qualification des ADN

Nous avons sélectionné un bloc tumoral représentatif pour chacune des tumeurs pour lesquelles nous disposons de matériel FFPE (issu des RTV pré-chimiothérapie). Cela représentait 50 cas. Dans 20% des cas ( $n = 10/50$ ), l'extraction d'ADN n'a pas été contributive du fait d'une quantité insuffisante. Sur les 40 cas (80%) où l'extraction d'ADN a été possible, seuls 14 (soit 35%) avaient un ADN de qualité suffisante pour être amplifiés par qPCR et ont été séquencés en NGS (Figure 46).

Pour 9 des cas non contributifs (n'ayant pu être analysé en NGS à partir du matériel FFPE), nous disposons de matériel tumoral cryo-préservé en tumorotheque. L'extraction de l'ADN de ces tumeurs cryo-préservées, a été contributive dans 77,8% des cas ( $n = 7/9$ ). Les 2 cas cryo-préservés non contributifs étaient des cas dont l'extraction n'avait déjà pas été possible à partir du matériel FFPE. Tous les ADN extraits à partir des cas cryo-préservés ( $n = 7$ ) étaient amplifiables en qPCR et donc qualifiés pour une analyse en NGS.

Au total, seuls 21 cas ont pu être séquencés et analysés en NGS sur le MiSeq Dx (Illumina) avec le panel INCa (Figure 46).

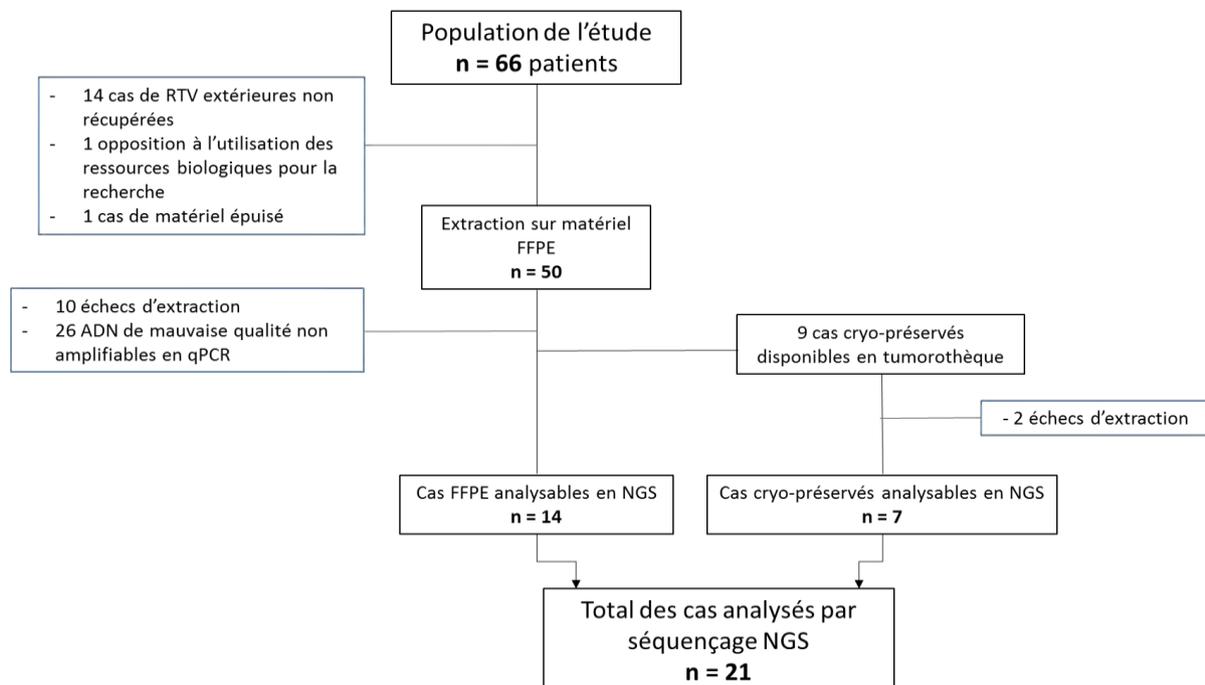


Figure 46: Etapes de la sélection des cas pour le séquençage NGS.

## 2. Séquençage NGS

Sur les 21 cas analysés, 43% (n=9/21) ne présentaient aucune mutation et 57% (n=12/21) étaient porteurs d'au moins une mutation sur l'un des 16 gènes ciblés par le panel INCa (Tableau 23).

La description des cas mutés avec les données phénotypiques associées est résumée dans le Tableau 23. Le détail des mutations est décrit en annexe 3.

Il s'agissait de mutations de gènes impliqués dans la voie RTK/RAS/PI3K. Quatre cas étaient mutés pour le gène FGFR3 et 4 cas pour le gène PI3KCA. Ce qui représente 33% des cas testés porteurs de mutation sur l'un ou l'autre de ces deux oncogènes.

Parmi les quatre cas FGFR3 mutés, 2 présentaient un phénotype immunohistochimique de type basal (CK5/6+ et GATA3-) et 2 présentaient un phénotype luminal (GATA3+ et CK5/6-). Deux de ces cas FGFR3 mutés étaient des carcinomes urothéliaux avec un variant morphologique de type épidermoïde sur la dernière RTV. Aucun des cas FGFR3 mutés n'étaient positif avec l'anticorps anti-FGFR3 en immunohistochimie. Concernant la réponse à la chimiothérapie, un seul de ces 4 cas mutés FGFR3 était répondeur à la CNA.

Les mutations retrouvées pour les quatre cas de phénotype immunohistochimique basal étaient 2 mutations du gène FGFR3, 2 mutations de PIK3CA et une mutation de HRAS.

Tous les autres cas séquencés étaient de phénotype luminal en immunohistochimie. Parmi ceux-ci, 9 étaient non-mutés, 2 étaient mutés FGFR3, 2 étaient mutés PI3KCA, 1 était muté HRAS, 1 était muté EGFR et 2 étaient mutés MET.

Tableau 23: Description phénotypique des cas séquencés en NGS.

N° patient	Gènes mutés	CK5/6	GATA3	variant épidermoïde	Groupe	Répondeur à la CNA
48	FGFR3	-	+	Non	Luminal	Non
107	FGFR3	+	-	Oui	Basal	Non
113	FGFR3	-	+	Non	Luminal	Non
146	FGFR3 + PI3KCA	+	-	Oui	Basal	Oui
161	PI3KCA	-	+	Non	Luminal	Oui
133	PI3KCA	+	-	Oui	Basal	Oui
185	PI3KCA	+	+	Non	Luminal	Oui
27	HRAS	+	-	Non	Basal	Oui
106	HRAS	-	+	Non	Luminal	Oui
132	EGFR	-	+	Non	Luminal	Oui
72	MET	-	+	Non	Luminal	Oui
104	MET	-	+	Non	Luminal	Oui
9	WT	-	-	Non	Double nég	Non
50	WT	-	-	Non	Double nég	Non
51	WT	-	-	Non	Double nég	Oui
35	WT	-	+	Non	Luminal	Oui
100	WT	-	+	Non	Luminal	Oui
111	WT	-	+	Non	Luminal	Oui
143	WT	-	+	Non	Luminal	Oui
156	WT	-	+	Non	Luminal	Oui
193	WT	+	+	Oui	Luminal	Oui

WT = Wild type

K. Résumé des caractéristiques morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires

1. Résumé de l'ensemble des caractéristiques de la cohorte

L'ensemble des caractéristiques de la cohorte étudiée (caractéristiques initiales, données morphologiques, immunohistochimiques, et résultats de biologie moléculaire ainsi que le stade TNM et le TRG post CNA sont résumés dans le Tableau 24.

Tableau 24: Résumé des caractéristiques de la cohorte.

RTV						IHC			BIOLOGIE MOLECULAIRE				PIECE DE CYSTECTOMIE					
Réséction complète dernière RTV	Anapath dernière RTV	CIS associé	Artéfacts d'électrocoagulation significatifs	VARIANT MORPHOLOGIQUE		CK5/6	GATA3	CK20	quantité ADN extrait en FFPE en ng	Ct qPCRADN FFPE	quantité ADN extrait en congel en ng	Ct qPCRADN cryopréservé	NGS mutations	Stade TNM	Score de régression TRG	TRG ganglions	VARIANT MORPHOLOGIQUE SUR PIECE	CIS associé
5	oui	pT2 HG	oui	oui	Gl + Mp	-	-	-						ypT3aN0R0	3	1a	non	oui
9	oui	pT2 HG	non	oui	non	-	-	-	6,2206	0	8,5618	22,96	WT	ypT3aN0R0	3	1a	non	Non
17	oui	pT2 HG	oui	non	non	NC	NC	NC						ypTisN2R0	2	3	non	Oui
19	non	pT2 HG	non	oui	non	+	-	-	5,2022	0				ypT4aN1R1	3	3	non	Non
26	oui	pT2 HG	non	NC	NC	NC	NC	NC						ypT1aN0R0	2	1b	non	Non
27	oui	pT2 HG	non	oui	non	+	-	-			13,3015	21,91	HRAS	ypT0N2R0	1	3	non	Non
30	non	pT2 HG	oui	oui	Mp + Mk	+	-	-	0,9348	0	0			ypT2bN0R0	3	1a	Mk	Oui
32	non	pT2 HG	non	oui	non	+	-	-	8,6298	0				ypT3aN0R0	3	1b	non	Non
37	non	pT2 HG	non	oui	non	-	+	+	1,1134	0				ypT3bN0M1	2	1a	Mk	Oui
46	oui	pT2 HG	non	oui	Gl	-	-	+	2,2059	0				ypT0N0R0	1	1a	non	Non
48	oui	pT2 HG	non	oui	non	-	+	-	3,8836	27,4			FGFR3	ypT4N2R1	3	3	non	Oui
49	oui	pT2 HG	oui	oui	E	+	-	-						ypT3bN0R0	3	1a	non	Non
50	oui	pT2 HG	non	oui	non	-	-	+	4,9106	0	12,4357	22,79	WT	ypT3bN2R0	3	3	non	Oui
51	non	pT2 HG	oui	oui	Pl	-	-	+	1,9608	0	5,3872	22,44	WT	ypT0N0R0	1	x	non	Non
53	oui	pT2 HG	non	oui	non	+	-	-	4,807	0				ypTisN0R0	1	1a	non	Oui
64	non	pT2 HG	non	oui	Gl	-	+	-	3,1648	0				ypT3aN0R0	3	1a	non	Non
72	oui	pT2 HG	oui	oui	non	-	+	-			4,4659	23,68	MET	ypTisN0R0	1	1b	non	Oui
83	oui	pT2 HG	non	NC	NC	NC	NC	NC						ypTisN0R0	1	1a	non	Oui
84	oui	pT2 HG	non	oui	non	+	-	-	6,4106	0				ypT4N1R0	2	3	E + S	Non
85	non	pT2 HG	non	non	non	-	+	+	4,0318	28,42			WT	ypT0N0R0	1	1a	non	Non
86	oui	pT2 HG	non	non	E	+	+	-	7,6646	0				ypT1aN0R0	2	1b	non	Non
91	oui	pT2 HG	non	oui	non	-	-	-	4,6182	0				ypT0N0R0	1	1a	non	Non
100	oui	pT2 HG	non	oui	Mp	-	+	+	5,168	29,02			WT	ypTisN0R0	1	1a	non	Oui
101	non	pT2 HG	non	oui	Gl	-	+	-	4,8184	28,47			PIK3CA	ypT3aN1R0	2	2	non	Non
102	oui	pT2 HG	non	oui	non	-	-	-	2,5992	0				ypTisN0R0	1	1b	non	Oui
104	oui	pT2 HG	non	non	non	-	+	+	7,904	25,31			MET	ypT0N0R0	1	1b	non	Non
106	oui	pT2 HG	non	non	non	-	+	+	2,0292	28,42			HRAS	ypT0N0R0	1	1a	non	Non
107	non	pT2 HG	non	oui	E	+	-	-	8,5842	0	4,7323	23,48	FGFR3	ypT4aN0R0	3	1a	E	Non
108	oui	pT2 HG	non	non	Mp	-	+	+	0,1406	0				ypTisN0R0	1	1a	non	Oui
111	oui	pT2 HG	non	non	non	-	+	-	1,3908	28,62			WT	ypT0N0R0	1	1a	non	Non
112	NC	pT2 HG	oui	oui	E	+	-	-						ypT3aN0R0	2	1a	E	Oui
113	NC	pT2 HG	non	non	non	-	+	-	9,1808	28,37			FGFR3	ypT3bN2R0	3	3	E	Non
117	non	pT2 HG	non	non	non	-	-	-						ypT0N0R0	1	1b	non	Non
119	oui	pT2 HG	oui	non	Gl + Pl + S	-	-	-	1,9952	0				ypT0N0R0	1	1a	non	Non
127	NC	pT2 HG	non	non	Mp	-	-	-	3,6556	0				ypT0N1R0	1	3	non	Non
129	NC	pT2 HG	oui	NC	NC	NC	NC	NC						ypT0N0R0	1	1a	non	Non
130	oui	pT2 HG	oui	oui	E	+	+	-	2,7176	0				ypT2N0R0	2	1a	non	Oui
131	NC	pT2 HG	non	oui	non	+	+	-						ypT2bN0R0	3	1a	Pl	Non
132	oui	pT2 HG	non	non	non	-	+	+	1,5732	29,42			EGFR	ypT0N0R0	1	1a	non	Non
133	oui	pT2 HG	non	oui	E	+	-	-	3,5991	0	11,433	22,56	PI3KCA	ypTaN0R0	1	1b	non	Non
139	non	pT2 HG	non	non	non	NC	NC	NC						ypT0N0R0	1	1a	non	Non
142	oui	pT2 HG	non	oui	E	-	+	-	1,3416	0				ypT2N0R0	3	1a	non	Non
143	oui	pT2 HG	non	non	non	-	+	+	3,1084	27,13			WT	ypTisN0R0	1	1a	non	Oui
146	non	pT2 HG	non	non	E + S	+	-	-	28,234	26,32			FGFR3 + PIK3CA	ypT0N0R0	1	1b	non	Non
147	oui	pT2 HG	non	oui	Gl + Mp	-	+	+	0,8702	0	0			ypTisN0R0	1	1b	non	Oui
149	oui	pT2 HG	non	oui	E + Nd	+	+	+						ypT3N0R0	3	1b	Mk + Nd	Non
152	oui	pT2 HG	non	oui	E	-	-	-	1,3201	0				ypT1aN0R0	1	1a	non	Oui
156	oui	pT2 HG	non	oui	non	-	+	-	1,5656	29,75			WT	ypT0N0R0	1	1a	non	Non
157	oui	pT4 HG	oui	non	non	-	-	-						ypTisN0R0	1	1a	non	Oui
158	oui	pT2 HG	non	NC	NC	NC	NC	NC						ypT3aN1R1	2	3	Gl + Pl	Non
159	oui	pT2 HG	non	NC	NC	-	-	-						ypT4N0R0	2	1b	non	Non
165	non	pT2 HG	non	oui	E	NC	NC	NC						ypT4 N0M0	3	1a	E	Non
166	oui	pT2 HG	oui	oui	Mp	-	+	+	0,9842	0				ypT0N0R0	1	1a	non	Non
167	oui	pT2 HG	non	NC	NC	NC	NC	NC						ypT3N0R0	3	1a	non	Oui
168	non	pT2 HG	non	NC	NC	NC	NC	NC						ypT3N1R0	3	3	non	Oui
169	oui	pT2 HG	non	NC	NC	NC	NC	NC						ypT0N0R0	1	1a	non	Non
173	oui	pT2HG	non	NC	NC	NC	NC	NC						ypT1N0R0	2	1a	non	Oui
176	oui	pT2 HG	non	NC	NC	NC	NC	NC						ypT1bN0R0	2	1a	S	Oui
179	oui	pT2HG	oui	NC	NC	NC	NC	NC						ypT0N0R0	1	1a	non	Non
181	non	pT2 HG	non	oui	non	+	+	-	0,8284	0				ypT3N1R0	3	3	non	Non
184	oui	pT2HG	oui	NC	NC	NC	NC	NC						ypTisN0R0	1	1b	non	Oui
185	non	pT2 HG	oui	oui	non	+	-	-	1,805	27,97			PIK3CA	ypT0N0R0	1	1a	non	Non
190	oui	pT2 HG	oui	NC	NC	NC	NC	NC						ypTisN0R0	1	1b	non	Oui
191	oui	pT2HG	non	oui	E	+	+	+	0,9006	0				ypT3aN0R0	2	1b	Pl	Non
193	oui	pT2HG	oui	oui	E + Gl	+	+	-	4,7994	26,44			WT	ypT0N0R0	1	1a	non	Non
194	oui	pT2 HG	non	NC	NC	NC	NC	NC						ypT2bN1R0	3	3	non	Non

(Mp : micropapillaire ; E : épidermoïde ; Mk :microkystique ; S : sarcomatide ; Pl : plasmocytoïde ; Gl : glandulaire ; NC : non connu ; WT : wild type ; Ct : cycle seuil ; TRG : grade de régression tumorale).

## 2. Données morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires

La Figure 47 résume les données morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires des 50 cas inclus dans les TMA. On note que les deux cas présentant un marquage positif avec l'anticorps anti FGFR3 ne correspondent pas aux cas mutés FGFR3 en biologie moléculaire. On observe également que tous les cas (sauf un) présentant un variant morphologique de type épidermoïde sont CK5/6 positifs en immunohistochimie. Quatre d'entre eux correspondent à des cas « doubles positifs » avec CK5/6 et GATA3. Les autres correspondent à des cas de phénotype basal (CK5/6+ et GATA3-).

On observe que sur les 18 cas CK20+, seuls 2 (soit 11%) présentent une positivité avec CK5/6. Soixante et un pourcent de ces cas CK20 positifs sont de phénotype luminal (CK5/6 - et GATA3+) et 27% sont « doubles négatifs ».

Parmi les cas positifs avec l'anticorps anti-CD44, 29% (n=4/14) sont « double négatifs » (CK5/6- et GATA3-), 43% (n=6/14) sont « double positifs » (CK5/6+ et GATA3+), 14% (n=2/14) sont de phénotype basal et 14% de phénotype luminal.



## VI. DISCUSSION

### 1. Réponse à la chimiothérapie

#### a) Réponse à la chimiothérapie : TNM vs TRG

Notre cohorte comportait 66 patients traités par CNA puis chirurgie pour un carcinome urothélial de haut grade, infiltrant le muscle (stade pT2 minimum). L'examen anatomopathologique des pièces de cystectomie a montré que 23 patients ont obtenu une réponse complète (pT0) après CNA, ce qui représente 34,8% des cas. Ce résultat est en accord avec la littérature. En effet, selon une récente méta-analyse, 28,6% des patients obtiennent un stade pT0 après CNA [122]. Dans notre étude, le taux de réponse global à la CNA (<pT2) était de 59,1 % (n = 39/66), concordant avec la littérature, où les taux de réponses rapportés varient entre 50% et 60 % [12], [113].

Toutes ces études ont défini la réponse à la chimiothérapie en se basant sur le stade ypTNM déterminé sur la pièce de cystectomie. En effet, on considère classiquement qu'un patient est répondeur si le stade de la tumeur résiduelle est strictement inférieur à pT2 [12], [89], [113], [123]. Mais d'autres approches sont possibles.

Dans notre travail, nous avons déterminé un score de régression tumorale (TRG) sur chacune des pièces de cystectomie, en nous basant sur la définition de *Fleischmann et al* [117]. Nos résultats montrent que 29,6% des patients classés comme non répondeurs (par leur stade ypT > ypT2), présentent une régression de plus de 50% de la surface tumorale initiale (=TRG2). Ceci signifie qu'en définissant la réponse à la CNA par un TRG < 3, près de 30% des patients sont requalifiés, et passent du statut de non répondeurs à celui de répondeurs. En définissant la réponse à la CNA par un TRG < 3, on obtenait donc un taux de 71,2% de réponse à la CNA (n=47/66).

#### b) Impact pronostique

Nous avons pu vérifier l'impact pronostique de la réponse histologique à la CNA (définie par le stade ypT<pT2) en montrant une augmentation de la survie sans récurrence à 2 ans, qui croît de 53,7% chez les patients non répondeurs à 73% chez les répondeurs (p=0,08) (Figure 34). En termes de survie globale, nos résultats montrent la même tendance, avec une survie globale à 2 ans de 77,3% dans le groupe des non répondeurs contre 87,2% chez les répondeurs (p=0,32). Ces résultats ne sont pas significatifs, ce qui est probablement dû au manque de puissance statistique de notre étude. *Gandhi et al* observaient une survie spécifique à 5 ans de 90,6 % chez les répondeurs *versus* 27,1 % chez les non répondeurs (p <0,01) [113]. De plus,

ils montraient que les patients non répondeurs à la CNA avaient une survie spécifique inférieure à leur groupe contrôle ne recevant pas de CNA. La valeur pronostique du « downstaging » final (<pT2) sur pièce de cystectomie a aussi été montrée par d'autres équipes comme *Petrelli et al* [122], [124].

Nous avons également montré l'impact pronostique du score de régression tumorale TRG. L'analyse des courbes de survie montre même une meilleure ségrégation des courbes avec le TRG qu'avec le stade ypT (Figure 35 et Figure 36). Les patients dont le TRG était inférieur ou égal à 2 (régression d'au moins 50% de la surface tumorale initiale) avaient un taux de survie sans récurrence à deux ans de 75.2% contre 41,7% pour ceux dont le TRG était égal à 3 ( $p = 0.008$ ). En termes de survie globale, la tendance était identique, sans atteindre la significativité (taux de survie globale de 86.9% vs 74% et  $p=0,11$ ). Les courbes de survie des patients avec une réponse intermédiaire (TRG 2) se situaient entre les deux extrêmes (Figure 35 et Figure 36). Nos résultats sont tout à fait comparables aux résultats de *Fleischmann et al* [117] et montrent que l'utilisation du TRG a une valeur pronostique supérieure à celle du stade ypT.

Dans leur étude, ayant inclus 56 patients, *Fleischmann et al* [117] ont défini le TRG en fonction du pourcentage de cellules tumorales viables résiduelles par rapport à la surface tumorale totale initiale (TRG1 : régression complète, TRG2 : >50 % de régression, TRG3 : <50 % de régression). Ce TRG était significativement corrélé à la survie globale et ressortait comme le seul facteur pronostique indépendant en analyse multivariée [117]. Tout récemment (USCAP 2017), une équipe canadienne [118] a également présenté son évaluation du TRG sur une cohorte de 121 patients traités par CNA puis cystectomie. Contrairement à *Fleischmann*, elle n'a pas retrouvé de corrélation avec la survie globale ou la survie sans récurrence. Dans leur série, seuls le stade ganglionnaire supérieur à pN0 et les marges chirurgicales positives avaient une valeur pronostique significative en analyse multivariée. Ces résultats discordants au sujet de la valeur pronostique du TRG peuvent s'expliquer par des différences dans les populations étudiées. La cohorte de *Fleischmann* a essentiellement intéressé des patients de stade avancé (30% de stades pT3/4 et 70% de cas métastatiques). Une autre explication possible est l'absence de standardisation dans la prise en charge macroscopique des pièces de cystectomie et dans l'évaluation microscopique de la régression tumorale. Or on sait que la réponse histopathologique est corrélée à la survie [122], [124]. Ce critère prend de plus en plus d'importance dans les essais thérapeutiques et est même souvent choisi comme critère de

jugement principal. L'utilisation du score TRG (à la place du stade ypTNM) nécessitera donc de faire au préalable un effort de standardisation. Cet effort a été fait en sénopathologie, où les pathologistes ont établi des recommandations précises sur la façon de prendre en charge les pièces de mastectomie post-CNA et d'évaluer la régression tumorale [125]. Ces recommandations précisent notamment la nécessité de disposer des renseignements utiles au moment de la prise en charge macroscopique (notion de traitement néoadjuvant, localisation de la tumeur...) et l'importance d'un échantillonnage exhaustif du lit tumoral

## 2. Facteurs cliniques prédictifs de la réponse à la CNA

Quelle que soit la définition de la réponse à la CNA utilisée, nous n'avons pas retrouvé de facteur clinique prédictif de la réponse à la CNA. Il n'y avait pas de différence pour l'âge, le sexe, le type de chimiothérapie, la multifocalité, la présence d'une hydronéphrose, la présence de CIS associé sur la RTV ou les antécédents d'instillations endo-vésicales. Le seul paramètre montrant une différence significative entre les répondeurs et les non répondeurs était la réalisation d'une RTV complète avant la CNA. En effet, les patients ayant eu une RTV complète étaient significativement plus nombreux chez les répondeurs que chez les non répondeurs (83,8% vs 58,3% ;  $p = 0,02$ ). Ceci ne peut pas être considéré comme un réel facteur prédictif de la chimiosensibilité et a pu constituer un facteur de confusion.

L'équipe du MDA de *Culp et al* [126] a récemment établi un score clinique pour la stratification des patients avant CNA. Il s'agissait d'évaluer la valeur prédictive de différents critères cliniques, scanographiques et anatomopathologiques. Ce score classe en « haut risque » les patients ayant un stade clinique T3b-T4a, une hydronéphrose, des invasions lympho-vasculaires, ou un variant histologique péjoratif (micro-papillaire ou neuroendocrine). Les patients n'ayant aucun de ces critères sont classés en « bas risque ». Leurs résultats montrent que les patients classés en « bas risque » avant la CNA et la chirurgie ont un meilleur pronostic que les « hauts risques », et ce même s'ils se voient surclassés en haut risque après la chirurgie. Leur pronostic reste également meilleur que les patients passant de la classe « haut risque » avant chirurgie à la classe « bas risque » après chirurgie. Cette stratégie de stratification du risque avant chimiothérapie pourrait permettre d'épargner la CNA, et les toxicités qui y sont associées, aux patients de bas risque moins susceptibles d'en bénéficier. Dans une publication de janvier 2017 [127], *Von Rundstedt* a confirmé les résultats de *Culp et al* [126] en évaluant ce score clinique sur une cohorte rétrospective de 166 patients. La

validation d'une telle stratégie en prospectif nécessiterait de pouvoir comparer des patients traités et non traités par chimiothérapie, ce qui semble aujourd'hui difficile à envisager étant donné que l'utilisation de la CNA est désormais bien intégrée dans la prise en charge des patients, et est recommandée par toutes les guidelines. Par ailleurs cette stratégie ne prend pas du tout en compte toutes les données plus récentes sur les profils moléculaires intrinsèques des carcinomes urothéliaux.

a) *Le downstaging est-il une conséquence de la CNA ou de la RTV ?*

Dans un travail de thèse précédent [128], nous avons comparé cette même cohorte de patients traités par cystectomie et CNA (CR + CNA) avec un groupe de patients traités par cystectomie radicale seule (CR). Nous avons montré une augmentation significative du taux de réponse complète dans le groupe ayant reçu la CNA (34,8% vs 12,9% ;  $p = 0,001$ ). La proportion de patients ayant présenté un « downstaging » ( $<pT2$ ) était également significativement plus élevée dans le groupe CNA + CR (59,1% vs 20,4% ;  $p < 0,001$ ). Ces résultats sont similaires à ceux de l'étude du SWOG [85] qui a retrouvé un taux de réponse complète de 38% après CNA par MVAC contre 15% dans le groupe contrôle ( $p < 0,001$ ).

La présence de patients avec un stade  $pT0$  dans le groupe n'ayant pas reçu de CNA, pose la question du rôle de la RTV pré-CNA, et notamment de son caractère complet ou non. En effet, au début des années 2000, *Nielsen et al* [129] avaient montré (dans une cohorte sans CNA) une amélioration significative de la survie sans récurrence chez les patients ayant pu bénéficier d'une RTV complète, comparés à ceux dont la RTV n'avait pas permis de downstaging.

De même, dans notre série, nous avons noté que les patients ayant eu une RTV complète étaient significativement plus nombreux chez les répondeurs que chez les non répondeurs (83,8% vs 58,3% ;  $p = 0,02$ ). Ceci a pu constituer un facteur de confusion dans la recherche de facteurs prédictifs de la réponse à la CNA. Il en résulte donc une question : Parmi les patients en réponse complète, combien le sont uniquement grâce à la RTV ? *Brant A et al* [130] ont tenté de répondre à cette question et ont estimé que parmi les patients ayant reçu une CNA, la proportion de ceux dont le « downstaging » est dû à la RTV est de 38% (IC95% 27 – 55%) [130].

Pour ces patients en réponse grâce à la RTV, la CNA a-t-elle alors une réelle utilité ? L'étude de *Rosenblatt et al* [123] apporte une réponse à cette question en montrant que lorsque l'on compare les patients en réponse complète ( $pT0$ ) ayant reçu de la CNA, à ceux (également  $pT0$ )

n'en ayant pas reçu, on observe une diminution de 31,1% du risque de décès à 5 ans. On peut donc raisonnablement conclure que la CNA apporte un bénéfice supplémentaire aux patients, même si la RTV a déjà permis une exérèse complète de la tumeur primitive. Ce bénéfice peut notamment s'expliquer par l'action de la chimiothérapie sur la maladie micro-métastatique.

b) *Modifications histologiques : CNA vs RTV*

Il demeure que pour identifier plus facilement des marqueurs prédictifs de réponse à la CNA, il serait utile de pouvoir discerner les patients qui ont répondu à la chimiothérapie de ceux qui sont en réponse uniquement grâce à la RTV.

Dans des proliférations malignes non urothéliales telles que les sarcomes, les adénocarcinomes œsogastriques ou les carcinomes ovariens, la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante est évaluée par la surface de tumeur viable restante comparée à la surface tumorale totale initiale estimée [131]–[134]. Les patients chez lesquels il n'existe plus ou peu de tumeur résiduelle, sont considérés comme répondeurs. Mais la vessie constitue un site particulier et unique car le traitement chirurgical par cystectomie radicale est précédé d'une résection trans-urétrale (RTV) rendant plus difficile l'évaluation de la réponse spécifique à la chimiothérapie. Pour affirmer la réponse histologique à la chimiothérapie néoadjuvante il faudrait alors pouvoir prendre en compte (et soustraire) les effets de la RTV. Le travail de *Hui Jun Wang* [135] sur les modifications histologiques associées à la CNA ou à la RTV a mis en évidence un chevauchement important des aspects observés sur des pièces de cystectomie de patients en réponse après une RTV seule ou une CNA. Les modifications histologiques étudiées (fibrose, réaction myofibroblastique, inflammation, calcifications, nécrose ou présence de macrophages spumeux) se sont avérées non spécifiques de la RTV ou de la CNA. Dans leur étude, les seules différences significatives étaient la hyalinisation de la paroi vésicale et les modifications des ganglions lymphatiques, qui étaient retrouvées uniquement dans le groupe des patients répondeurs à la CNA. Toutefois, ces aspects n'étaient présents que dans 67% des cas de réponse à la CNA [135].

De même, dans notre travail, nous avons tenté de différencier les remaniements tissulaires granulomateux, d'allure cicatricielle, des remaniements fibreux plutôt attribuables à la chimiothérapie. Les premiers étaient observés dans 63% des cas et les seconds dans 54% des cas. Nos résultats montrent que, lorsque l'on définit la réponse à la CNA par un TRG < 3, la fibrose post-chimiothérapie et les remaniements cicatriciels attribuables à la chirurgie sont

plus fréquemment observés chez les patients répondeurs que chez les non répondeurs (70,8% vs 31,6% ;  $p = 0,01$  et 79,2% vs 42,1% ;  $p = 0,01$  respectivement). Cette différence n'était pas significative lorsque la réponse était définie par un stade  $ypT < pT2$ .

Pour évaluer avec certitude la part respective de la régression post chimiothérapie et post-chirurgie, la comparaison avec une population n'ayant pas reçu de CNA sera nécessaire.

### 3. Variants morphologiques

#### a) Morphologie mixte, tous variants confondus

Dans notre cohorte, 48,1% ( $n=25/52$ ) des cas comportaient un variant morphologique avant traitement par CNA et 51,9% étaient de morphologie urothéliale pure. Le taux de tumeurs présentant un variant morphologique était plus élevé que les taux rapportés dans la littérature qui sont situés autour de 20% des cas [136]. Quel que soit le critère utilisé pour définir la réponse histologique à la chimiothérapie ( $pT < 2$  ou  $TRG < 3$ ), nous avons noté une tendance en faveur d'une meilleure réponse à la CNA chez les patients présentant un carcinome urothélial pur sans aucun variant morphologique. En effet, 63% d'entre eux ( $n=17/27$ ) étaient répondeurs contre 37% ( $n=10/27$ ) de non répondeurs, tandis que dans le groupe des patients avec un variant morphologique, 48% ( $n=12/25$ ) étaient répondeurs contre 52% ( $n=13/25$ ) de non répondeurs à la CNA. Ces données n'étaient pas significatives ( $p=0,42$ ). Ces résultats sont concordants avec les données de la littérature qui ont montré une meilleure chimiosensibilité des carcinome urothéliaux purs comparés aux cas de morphologie mixte présentant un variant morphologique [49], [137], [138]. A l'inverse, le groupe du SWOG (*Scosyrev et al*) a montré que la présence d'un variant épidermoïde ou glandulaire n'était pas corrélée à la chimiorésistance et pouvait même constituer un argument en faveur de la prescription d'une CNA [136].

#### b) Variants épidermoïdes

Dans notre étude, 21,2% des cas ( $n=11/52$ ) présentaient un contingent tumoral de morphologie épidermoïde (ou malpighienne). Parmi ceux-ci, 36,4% ( $n=4/11$ ) étaient répondeurs à la CNA ( $ypT < pT2$ ) et 63,6% ( $n=7/11$ ) étaient non répondeurs ( $p=0,17$ ). Mais si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus lorsque l'on définit la réponse à la chimiothérapie par un  $TRG < 3$ , on ne retrouve pas la même tendance. En effet, avec cette définition, on retrouve 63,6% de répondeurs ( $TRG < 3$ ) et 36,4% de non répondeurs ( $TRG \geq 3$ ). Cette opposition est à mettre en perspective avec les données contradictoires publiées à ce sujet. En effet, certaines équipes ont montré qu'une différenciation malpighienne était

associée à une moins bonne réponse à la CNA [47], [49]. D'un autre côté, on sait que les tumeurs de type basal sont enrichies en variant de type épidermoïde ou sarcomatoïde [12]–[14]. Or, plusieurs groupes ont affirmé que ces tumeurs de type basal étaient plus chimiosensibles [13]. Dans l'étude de *Choi*, la moitié des cas du groupe luminal et du groupe basal étaient répondeurs à la CNA [111]. L'impact pronostique du variant épidermoïde n'est donc pas clairement établi.

#### 4. Immunohistochimie

a) *Application pratique des groupes moléculaires : choix des marquages IHC étudiés et définition des seuils de positivité.*

Comme en sénopathologie, et dans le but de pouvoir appliquer la découverte des groupes moléculaires en routine, la recherche d'un panel de biomarqueurs immunohistochimiques (utilisable sur un matériel FFPE), permettant une classification simple dans les groupes luminal et basal est en cours d'étude. En effet, les sous types moléculaires intrinsèques se distinguent par une expression variable des marqueurs de différenciation urothéliale. Le groupe basal est caractérisé par une expression élevée des kératines de haut poids moléculaire que sont CK14, CK5, CK6 et CD44, exprimées par les cellules basales de l'urothélium normal. En revanche, le groupe luminal présente une forte expression des uroplakines ainsi que des cytokératines de bas poids moléculaire comme la CK20, ce qui est caractéristique des cellules les plus superficielles de l'urothélium normal comme les cellules ombrelles [139].

Cependant, la revue de la littérature, à la recherche des anticorps et des seuils de positivité précédemment utilisés, montre qu'il n'existe pas de consensus sur la façon d'évaluer les différents marquages. Les seuils de positivité utilisés, varient de 5% à 30% de cellules marquées pour GATA3 et de 5% à 20% pour la CK20 [55], [56]. De même pour l'évaluation du marquage par la CK5/6, les seuils de positivité varient de 5% à 70% de cellules marquées [55], [140].

De plus, concernant les anticorps discriminants, les différentes équipes ayant travaillé sur ce sujet n'ont pas toutes retenu les mêmes marqueurs. L'équipe de *Choi et al* [12] montrait qu'un marquage positif par les anticorps anti-CK20, CK5/6, CD44 et EGFR caractérisait les tumeurs basales. L'équipe de *Sjödahl et al* [14] retenait un panel comportant les anticorps anti CK14, CK5, EGFR, CK20, P-cadherine et HER2, ainsi que des marqueurs du cycle tels que CCNB1, CCND1 et Ki67. Dans une mise au point publiée dans les annales de pathologie, *Compérat et al* ne retenaient que les marqueurs CK5/6, CK20 et GATA3 [141]. Enfin, la conférence de

consensus de Madrid [73] concluait qu'un marquage positif par les anticorps anti-CK5/6 ou CK14, associé à une absence de marquage par les anticorps anti-FOXA1 ou GATA3 permettait de caractériser le groupe basal/épidermoïde-like.

Le travail de l'équipe du MDA [50] réalisé à l'aide de TMA sur une série de 76 tumeurs (à partir de pièces de cystectomie FFPE) a identifié un nombre limité de marqueurs immunohistochimiques utiles. Des marquages immunohistochimiques ont été réalisés en sélectionnant un panel de 15 anticorps choisis à partir des profils d'expression génique précédemment décrits. Leur sélection comprenait six marqueurs luminaux (GATA3, CK18, CK20, uroplakine II, cycline D1 et HER2), trois marqueurs basaux (CK5/6, CK14 et p63) et six marqueurs pour le groupe « p53-like » (p16, Bcl2, SMA, myosine, calponine et desmine). Il est apparu que les marqueurs sélectionnés pour le sous-type « p53-like » ne marquent que les cellules du stroma, et que cette signature est donc probablement à mettre en lien avec la présence de nombreuses cellules stromales. Le groupe appelé « p53-like » par *Choi* ne constituerait donc pas un véritable sous-type intrinsèque de carcinome urothélial.

La suite de leur étude conclut qu'avec seulement deux anticorps (GATA3 et CK5/6) et un seuil de positivité à 20 % de cellules marquées, on peut classer correctement les tumeurs urothéliales en tumeurs basales ou luminales avec une spécificité de 91% [50]. Les tumeurs basales étant de phénotype CK5/6 positif et GATA3 négatif, et les tumeurs de type luminal étant de phénotype GATA3 positif et CK5/6 négatif (Tableau 25).

Ces résultats ont justifié le choix du seuil de positivité et des anticorps que nous avons retenus pour l'étude notre cohorte.

Tableau 25: Profil immunohistochimique des tumeurs urothéliales basales et luminales (selon Dadhania et al- 2016)

Anticorps		Profil Basal		Profil Luminal
CK5/6	+		-	
GATA3	-		+	

b) Phénotypes IHC

Dans notre série, l'étude immunohistochimique a pu être menée sur 50 cas.

Dans notre cohorte, 38% des cas étaient positifs avec l'anticorps anti-CK5/6 (n=19/50), 52% des cas étaient GATA3 positifs (n=26/50), 36% étaient CK20 positifs, et 28% étaient CD44 positifs. Ces taux de positivité correspondent aux taux précédemment décrits par les autres équipes. En effet, dans la littérature, GATA3 est positif dans 50 à 90% des CU [55], CK20 est positif dans 25 à 67% des tumeurs et CK5/6 dans 35 à 60% des cas [51].

Par ailleurs, le marquage par l'anticorps FGFR3 n'a été retrouvé positif que dans 4% des cas (n=2/50) ce qui est nettement inférieur aux 40% de cas marqués décrits par *Tomlinson* dans les stades pT2 et plus [120], ou les 45% de *Rodriguez* [142]. Cette discordance peut être en rapport avec l'intensité du marquage et le seuil de positivité.

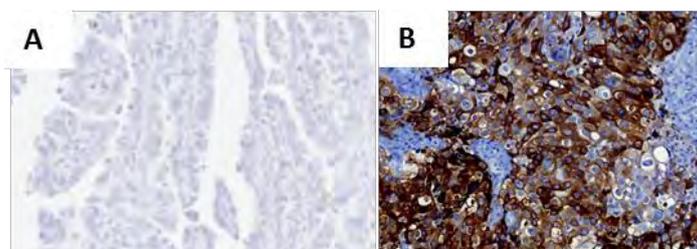


Figure 48: Exemple d'immunomarquages FGFR3+. A: d'après Rodriguez [142]; B: Notre IHC FGFR3+

c) Valeur prédictive des profils IHC

(1) Marqueurs analysés individuellement en univarié

En analyse univariée, et en définissant la réponse à la CNA par le stade ypT<pT2, la positivité de l'anticorps anti-CK5/6 était significativement corrélée à la réponse à la CNA. Avec une proportion de non répondeurs significativement plus élevée (63,2% vs 36,8% ; p=0,04). Mais en définissant la réponse par le TRG< 3, la tendance était inverse, avec 57,9% de répondeurs et 42,1% de non répondeurs (p=0,16).

A l'inverse, parmi les 18 cas CK20 positifs, la proportion de répondeurs restait significativement plus élevée que celle des non répondeurs quel que soit le critère utilisé pour définir la réponse à la CNA (Avec pT<pT2 : 77,8% vs 22,2% ; p=0,02 et avec TRG< 3 : 88,9% vs 11,1% ; p=0,02).

CK5/6 étant un marqueur basal, et CK20 un marqueur luminal, nos résultats suggèrent que les tumeurs lumineuses seraient plus chimiosensibles que les basales. Ceci va dans le sens des

données du SWOG [136] et souligne à nouveau les contradictions publiées à ce sujet [12] [13], [14].

(2) Analyse des associations de marquages

L'analyse des marquages par le couple CK5/6 et GATA3 (Figure 38) montre tout d'abord que contrairement aux résultats attendus, nous n'observons pas de corrélation entre les marquages CK5/6 et GATA3 ( $p = 0.86$ , coefficient de corrélation de Spearman  $r = -0,024$ ). Parmi les cas CK5/6 positifs, 57,9% étaient GATA 3 négatifs ( $n=11/19$ ) ce qui correspond à un phénotype basal. Cinquante-huit pourcent des cas CK5/6 négatifs, étaient fortement positifs pour GATA3 ( $n=18/31$ ) ceci correspondant à un phénotype luminal. Si on déplace le seuil de positivité de GATA3 et de CK5/6 à 70% de cellules marquées, comme rapporté par l'équipe de *Tregnago AC et al* (abstract n°1060 USCAP 2017, [140]) cela ne permet pas d'obtenir de meilleure corrélation ( $r = -0.07$  et  $p = 0.60$ ).

En analysant les associations de marquages, nous avons retrouvé 11 cas (22%) de phénotype basal (CK5/6 + et GATA3 -). Selon *Dadhania et al* [50], les 39 cas restants (78%) sont à considérer comme appartenant au groupe luminal. Cette répartition correspond à celle retrouvée dans les précédentes études. En effet, le taux de cas classés dans le groupe basal varie entre 13% à 44% [12], [14], [15], [50].

Lorsque la réponse à la CNA est définie par le stade  $ypT < pT2$  (Tableau 21 et Figure 42), les 11 cas de phénotype basal se répartissent en 4 cas (36,4%) répondeurs à la CNA, et 7 cas (63,6%) non répondeurs ( $p=0,19$ ). L'analyse en fonction du TRG montre une modification de cette répartition (Figure 43 et Figure 44), avec 6 cas (54,5%) répondeurs et 5 (45,4%) non répondeurs ( $p=0,28$ ).

La répartition des cas de phénotype luminal était inverse, avec une proportion de répondeurs qui restait supérieure à celle des non répondeurs quel que soit le critère utilisé pour définir la réponse à la CNA. En effet, dans ce groupe de phénotype luminal, on retrouvait 61,5% de répondeurs et 38,5% de non répondeurs en définissant la réponse par le stade pT ( $p=0,19$ ), et 73,7% de répondeurs contre 26,3% de non répondeurs en la définissant par le TRG ( $p=0,28$ ).

Comme le suggérait l'analyse en univarié, la tendance observée est donc en faveur d'une meilleure chimiosensibilité du groupe luminal et d'une relative chimiorésistance du groupe de phénotype basal.

Dans leur abstract, *Tregnago et al* rapportent des résultats comparables aux nôtres avec deux fois plus de cas de phénotype basal (CK5/6+ et GATA3-) parmi les non répondeurs à la CNA [140].

Du fait des faibles effectifs analysés, ces résultats n'atteignent pas le seuil de significativité et ne nous permettent pas de conclure quant à la chimiosensibilité des groupes basal et luminal. Par ailleurs, nous n'avons pas fait de comparaison avec des patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie néoadjuvante, ce qui nous empêche de conclure quant au caractère prédictif ou pronostique de ces phénotypes immunohistochimiques.

## 5. Biologie moléculaire

### a) Mutations mises en évidence en NGS

Les données du TCGA (The Cancer Genome Atlas ; Figure 17), obtenues à partir du séquençage de 131 tumeurs invasives, montraient une moyenne de 302 mutations exoniques différentes, 204 erreurs du nombre de copies et 22 réarrangements chromosomiques par tumeur. Ces mutations comprenaient des mutations récurrentes dans 32 gènes drivers connus. Les carcinomes urothéliaux montrent donc un taux de mutations très élevé, surpassé uniquement par les tumeurs pulmonaires [15]. En pratique, les tumeurs vésicales montrent une grande hétérogénéité mutationnelle, mais la charge mutationnelle des sous types luminal et basal est comparable [15]. Cependant, certaines mutations sont plus fréquemment retrouvées dans un sous-type moléculaire que dans l'autre. Les mutations de FGFR3 sont plus fréquentes dans le sous-type luminal alors que les mutations de TP53 et RB1 sont associées aux tumeurs basales [12], [15].

Afin de voir si nous retrouvions cette association entre les mutations de FGFR3 et le groupe luminal, nous les avons recherchées par séquençage NGS, avec le panel INCa disponible au laboratoire (incluant les 3 exons d'intérêts du gène FGFR3).

Dans notre travail, seuls 21 cas (31,8 %) ont pu être séquencés en NGS. Parmi eux, 12 présentaient au moins une mutation sur l'un des 16 gènes que comprend le panel INCa. Le faible nombre de cas testés, et la variété des mutations retrouvées ne nous permet pas de les corréler à la survie ou à la réponse à la chimiothérapie.

Nous avons identifié 19% de cas FGFR3 mutés (n=4/21), ce qui correspond aux fréquences rapportées par *Knowles MA et al* avec entre 5 et 20% de mutations somatiques du gène FGFR3

dans les TVIM [61]. Dans leur série de RTV de stade  $\geq$  pT2, *Pouessel et al* retrouvaient 30% (n=8/27) de cas mutés FGFR3 [143]. On note que sur les 4 mutations de FGFR3 identifiées, deux étaient dans des tumeurs de phénotypes immunohistochimique basal et deux dans des tumeurs lumineales. FGFR3 ne semble donc pas synonyme de tumeur de type luminal.

Notre technique de séquençage NGS permet de mettre en évidence toutes les mutations ponctuelles du gène FGFR3. Dans près de 40% des TVIM [61], ce gène FGFR3 présente d'autres altérations, comme des amplifications ou des translocations, ne pouvant pas être mises en évidence par notre technique. Ceci peut être une des raisons pour lesquelles, dans les cas de phénotype luminal, le taux d'altérations du gène FGFR3 retrouvé est plus faible que dans la littérature [12], [15]. Les cas de type luminal que nous avons identifiés comme wild type pourraient peut-être correspondre à des cas de translocation ou d'amplification du gène FGFR3.

b) *Qualité de l'ADN et nécessité de cryopréservation*

Nos résultats montrent les difficultés rencontrées pour extraire un ADN en quantité et de qualité suffisante pour les analyses de biologie moléculaire. Dans notre étude, le rendement final de l'extraction d'ADN à partir du matériel FFPE n'était que de 28% (n=14/50), tandis que le rendement obtenu à partir des tumeurs cryopréservées était de 78% (n=7/9).

Nous ne disposions que de 9 échantillons congelés en tumorotheque. Parmi ces cas cryopréservés, les 2 cas non contributifs étaient également non contributifs sur le matériel FFPE. Dans les deux cas, c'est la quantité insuffisante de matériel tumoral qui n'a pas permis l'extraction.

Ces données permettent de souligner toute l'importance de la prise en charge pré analytique des prélèvements et de leurs conditions de stockage [144]. En effet, des tissus FFPE peuvent tout à fait être utilisés pour des analyses NGS [121]. Mais on sait que la qualité de l'ADN est altérée par la fixation et est même inversement corrélée au temps de stockage des blocs FFPE [121], [145]. Dans leur étude sur la qualité des acides nucléiques extraits à partir de matériel FFPE, *Hedegaard et al* ont effectué du séquençage NGS. Leur taux de succès pour la préparation des librairies à partir de l'ADN génomique était de 29.5% [121]. Ce taux est proche des 28% que nous avons obtenu à partir de nos échantillons FFPE. Les auteurs de cette étude ont aussi noté que la préparation d'une librairie à partir de l'ADN génomique était paradoxalement plus difficile qu'à partir de l'ARN. En effet, la fixation par le formol peut non

seulement induire une fragmentation de l'ADN mais aussi une modification des bases nucléiques (transition de la cytosine en thymine et de la guanine en adénine). Ces modifications gênent ensuite l'amplification de l'ADN par la polymérase. Or, la préparation d'une librairie pour le séquençage NGS comporte une étape d'amplification.

Le meilleur rendement obtenu à partir des échantillons congelés doit nous inciter, à chaque fois que cela est possible, à prélever et cryo-préserver un échantillon des RTV suspects d'être des TVIM. En effet, les avancées de la recherche ne pourront s'appliquer en pratique courante que si le matériel tumoral disponible permet ces analyses.

#### 6. Hétérogénéité tumorale

Nous avons réalisé notre travail d'évaluation immunohistochimique de l'expression de marqueurs basaux (CK5/6 et CD44) et luminaux (GATA3 et CK20) en nous aidant de la réalisation préalable de TMA. Ces TMA ont été préparés à partir des blocs FFPE issus des RTV pré-CNA. Deux zones tumorales homogènes et représentatives de chacun des cas ont été sélectionnées. Pour chaque marqueur immunohistochimique évalué, la positivité était retenue dès que le pourcentage de cellules marquées dépassait le seuil de positivité dans un des deux échantillons du TMA. Cette technique a également été utilisée par *Choi* [12] ou par *Dadhania* [50] pour déterminer les marqueurs et les seuils discriminants dans la classification des CU. Cette méthode induit un biais non négligeable en masquant en partie l'hétérogénéité tumorale.

Nous avons noté une discordance de marquage entre les deux zones tumorales sélectionnées, pour au moins un des anticorps étudiés, dans 45,8% des cas. Aucun lien entre cette discordance et la morphologie n'a pu être établi. De même, l'évaluation semi quantitative des artefacts d'électrocoagulation n'a pas permis de corréliser ces discordances à la qualité du matériel examiné. Ceci montre bien l'hétérogénéité tumorale et la variabilité que l'on peut observer en fonction des zones tumorales choisies au sein d'une même tumeur.

L'hétérogénéité intra tumorale est une notion familière au pathologiste. Les cellules cancéreuses au sein d'une même tumeur montrent une diversité morphologique et une expression variable de marqueurs moléculaires. Il existe donc un certain degré de mosaïcisme tumoral. Un article publié dans le *New England Journal of Medicine*, en 2012 [146] est venu enrichir notre compréhension des mécanismes oncogéniques et de l'hétérogénéité tumorale. L'objectif de l'équipe de *Charles Swanton* était de tester si une seule biopsie était

suffisante pour identifier les altérations génétiques caractérisant une tumeur. En travaillant sur des cancers du rein, ils ont notamment pu montrer que la signature transcriptionnelle des échantillons prélevés chez un même patient diffère en fonction de la localisation de ces derniers. Les conclusions de cette étude sont sans ambiguïté. Premièrement, le prélèvement d'une seule biopsie ne permet d'identifier qu'une fraction des mutations mises en évidence par l'analyse de l'ensemble de la tumeur. Dans les CU, il a notamment été montré qu'on ne retrouve pas les mêmes mutations de FGFR3 entre les contingents superficiel et invasif d'une même tumeur [143]. Deuxièmement, une classification pronostique basée sur le profil transcriptionnel défini à partir d'un seul échantillon peut être biaisée et conduire à des prédictions erronées.

#### 7. Définition des groupes moléculaires

Les équipes ayant travaillé sur la description des groupes moléculaires dans la vessie ont décrit des groupes différents [12]–[15]. Les travaux publiés à ce sujet sont résumés dans le Tableau 26. L'équipe de *Choi* a identifié trois groupes intrinsèques dans les TVIM : un basal, un luminal et un « p53-like » [12]. Le *TCGA* a quant à lui utilisé une technique de RNAseq et identifié quatre groupes distincts (clusters I à IV avec un cluster III enrichi en marqueurs basaux et des clusters I et II en marqueurs luminaux)[15]. Un troisième groupe, de l'université de North Carolina (UNC), a analysé de larges métadonnées publiques [13] et a conclu à l'existence de deux groupes intrinsèques majeurs l'un basal et l'autre luminal.

Tableau 26: Résumé des travaux publiés sur les classifications moléculaires dans les carcinomes urothéliaux

Publications/Equipes / Année	Nombre de cas/cohorte	Technique Utilisée	Méthode d'Analyse	Nombre de groupes identifiés	Noms des Groupes et description
<b>Choi W&amp; al/ MDA /2014</b>	<b>196</b> Dont - 73 RTV congelées : discovery cohort - 57 FFPE : validation cohorte (dont 34 cas traités par CNA)	Whole genome expression profiling (Puces HT12-V3 et V4 Illumina)	Non supervisée	3	- Basal - Luminal - P53-Like
<b>TCGA/ 2014</b>	<b>408</b>	RNAseq (Hiseq)	Non supervisée	4	- Cluster I - Cluster II - Cluster III - Cluster IV
<b>Damrauer &amp; al / UNC/ 2014</b>	Métadonnées publiques n=262 et cohorte de validation n=49	Whole genome gene expression profiling (Puces HT12 Illumina)	Non supervisée	2	- Basal (+ claudin law) - Luminal
<b>Sjödahl &amp; al / Lund (Suède) / 2012</b>	<b>308</b> RTV fraîches	Whole genome gene expression profiling (Puces HT12-V3 Illumina)	Non supervisée	5	- Urobasal A - SCCL (squamous cell cancer like) - Genomically unstable - Urobasal B - Infiltrated

La validation de ces groupes moléculaires en tant que marqueurs pronostiques et/ou prédictifs de la réponse à la chimiothérapie, à travers de larges essais cliniques prospectifs nécessite avant tout l'obtention d'un vrai consensus sur leur définition.

Dans un travail de synthèse, publié fin 2016, et reprenant les principales cohortes précédemment étudiées par *Choi* [12], *Sjodahl* [14] ou le TCGA [15], comprenant au total 937 échantillons de tumeurs vésicales (tissu frais cryo-préservé mais également sur des échantillons FFPE), *Dadhanian et al* [50] ont permis de simplifier les choses en ne retenant que deux groupes : luminal et basal.

Dans leur étude, la signature p53 était retrouvée à la fois au sein du groupe des tumeurs basales et des tumeurs lumbales. Par ailleurs, ils ne retrouvaient pas, pour ce groupe, l'impact pronostique péjoratif décrit par *Choi* [12].

Les analyses de survie effectuées dans cette étude confirmaient aussi que les tumeurs de types luminal et basal ont une évolution clinique différente. Les tumeurs basales sont plus agressives et sont associées à une survie plus courte que les tumeurs lumineales.

L'identification de la signature « p53-like » présente néanmoins un intérêt. En effet, ce groupe, correspondant au cluster II du TCGA ou au sous-type « infiltré » de *Sjodahl*, a été décrit comme étant chimio-résistant. De surcroit, les données d'un récent essai clinique de phase 2 montrent que, dans ce groupe, on obtient un meilleur bénéfice clinique avec l'anticorps anti-PDL1 atezolizumab. Il serait alors utile de pouvoir distinguer ces patients au moment de les sélectionner pour une chimiothérapie néoadjuvante ou une autre thérapie adjuvante comme l'immunothérapie. Malheureusement, à l'heure actuelle, nous ne disposons pas de marqueur immunohistochimique spécifique nous permettant de l'isoler.

Une faible fraction (4 à 16 %) de tumeurs dites « double-négatives » caractérisées par un faible niveau d'expression des marqueurs luminaux et basaux a également été identifiée. Ces cas apparaissent similaires au groupe des tumeurs « Claudin-Low » dans le sein [147].

*a) Variation dans la définition des groupes et signatures moléculaires : Analyse supervisée ou non-supervisée*

Toutes ces études réalisées à partir de puces micro-array, ont utilisé un mode d'analyse dit « non supervisé » (aussi appelé découverte de classes). Le principe de ces analyses non supervisées est d'utiliser exclusivement les données d'expression génique pour catégoriser les tumeurs. Les tumeurs sont ainsi regroupées en groupes homogènes en termes d'expression. Or, lorsque l'on utilise une analyse non supervisée, le choix de l'algorithme utilisé pour la classification hiérarchique est arbitraire, ainsi que le choix du nombre de classes découvertes [148]. Les méthodologistes considèrent donc que le rôle de l'analyse non supervisée est limité et qu'une stratégie dite supervisée, basée sur l'évolution des patients, est plus pertinente [149], [150]. Mais ce mode d'analyse supervisée n'est pas sans poser quelques problèmes. On observe en effet une instabilité des signatures trouvées. L'inclusion d'un nouveau patient dans la cohorte dite « découverte » (utilisée pour décrire les groupes) étant susceptible de modifier la classification.

À titre de comparaison, dans le cancer du sein, 7 signatures pronostiques différentes ont été identifiées en utilisant une stratégie supervisée [151]. Il a été montré que la liste des gènes

découverte par cette méthode est très instable [148]. La signature moléculaire n'est donc pas unique et dépend très fortement des patients sélectionnés dans la cohorte utilisée pour la découvrir. Chaque cohorte de patients aboutit à une liste de gènes différente et donc à une signature différente. On sait également que, toujours dans le cancer du sein, les différentes signatures disponibles peuvent conduire à des prédictions discordantes [68]. *Fan et al* ont comparé, sur une même base de données, les résultats de cinq signatures publiées dans le cancer du sein. Ils aboutissent à une discordance de 50 %. [68]. Ceci conduit à une situation absurde dans laquelle choisir un test pronostique plutôt qu'un autre est équivalent à jeter une pièce « à pile ou face ».

L'ensemble de ces données critiques concernant les signatures moléculaires et les méthodes d'analyse statistique ayant conduit à leur description, ainsi que le recul dont nous disposons dans le domaine du cancer du sein montre bien la difficulté de prédire l'évolution du cancer ou la réponse au traitement. La pathologie cancéreuse, et particulièrement les cancers urothéliaux, représentent une maladie très hétérogène. Les conclusions de ces essais basés sur les technologies micro-array, à la recherche de signatures moléculaires pronostiques ou prédictives de réponse au traitement sont probablement trop optimistes et le concept d'une signature unique pose question. L'objectif devrait plutôt être d'intégrer l'ensemble des données cliniques, anatomopathologiques et moléculaires sans chercher à les opposer ou à privilégier un unique facteur.

#### 8. Perspectives : autres biomarqueurs

Dernièrement, les défauts du système de réparation des dommages à l'ADN (DNA damage repair - DDR) ont été identifiés comme représentant un mécanisme important de sensibilité à la chimiothérapie cytotoxique [98]. Le cisplatine en particulier, qui est à la base de toutes les CNA prescrites dans le CU, est un agent alkylant qui provoque notamment la fragmentation de l'ADN. Plusieurs études évoquent des gènes du système de réparation de l'ADN comme BRCA1 en tant que biomarqueurs de la chimiosensibilité [98], [152]. Ces études ont montré une meilleure réponse à la chimiothérapie lorsque les tumeurs présentaient un plus grand nombre d'altérations dans les gènes du système de réparation de l'ADN, ce qui est probablement lié à l'accumulation de dommages à l'ADN induits par la chimiothérapie. Selon ces données, les mutations des gènes du DDR pourraient donc servir de marqueurs prédictifs de réponse à la chimiothérapie par cisplatine. Ces biomarqueurs ne peuvent toutefois pas

encore être utilisés pour sélectionner les patients, en effet les études ayant testé le rôle de ces gènes comportent de nombreuses limitations (un faible nombre de patients et des protocoles de chimiothérapie hétérogènes). Ces biomarqueurs candidats requièrent donc de plus larges études prospectives comparant des patients traités et non traités par chimiothérapie afin de définir s'ils ont un réel rôle prédictif. Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours (Biomarker Identification for Bladder Cancer Patients NCT02053662).

D'autre part, des mutations de récepteurs tyrosine kinases, de voies de signalisation intracellulaires comme la voie PI3K/AKT/mTOR, de régulateurs du cycle cellulaire, ou de marqueurs immuns ont un rôle significatif dans la progression du cancer de la vessie [153]. Des thérapies ciblant ces altérations sont en cours de développement [153].

Parmi les molécules ciblant les récepteurs tyrosine kinases, les inhibiteurs pan-FGFR ont donné des résultats encourageants chez les patients porteurs de mutations activatrices de FGFR [154].

Chez Les patients montrant une surexpression de HER2, les résultats pré-cliniques avec le trastuzumab conjugué avec DM1 sont également prometteurs [101].

## VII. CONCLUSION

Notre cohorte comportait 66 patients traités par chimiothérapie néo-adjuvante avant cystectomie pour un carcinome urothélial de haut grade, infiltrant le muscle (stade pT2 minimum). L'examen anatomopathologique des pièces de cystectomie a montré que notre taux de réponse global à la CNA (<pT2) était de 59,1 % (n = 39/66). En utilisant un score de régression tumorale (TRG) et en définissant la réponse à la CNA par un TRG < 3, on obtenait un taux de réponse de 71,2% (n=47/66). De plus, l'analyse des courbes de survie montrait une meilleure ségrégation des courbes avec le TRG qu'avec le stade ypT. Par ailleurs, si on définissait la réponse à la CNA par un TRG < 3, la fibrose post-chimiothérapie et les remaniements cicatriciels attribuables aux RTV antérieures (qui font partie intégrante de la prise en charge des patients suivis pour TVIM), étaient plus fréquemment observés chez les patients répondeurs que chez les non répondeurs. Élément non significatif quand la réponse était définie par un stade ypT<pT2.

Le carcinome urothélial pur, sans aucun variant morphologique, avait une meilleure réponse à la CNA, qu'elle soit définie par un pT< 2 ou un TRG< 3.

Dans la littérature, les tumeurs basales sont décrites plutôt de phénotype CK5/6 positif et GATA3 négatif et sont enrichies en variant de type épidermoïde. Notre série comportait 11 cas (22%) de phénotype basal (CK5/6 + et GATA3 -). Lorsque la réponse à la CNA était définie par le stade ypT<pT2, ces cas de phénotype basal comportaient 63,6% de non répondeurs (p=0,19), alors qu'avec le score TRG, le taux de non répondeurs était de 45.4 % (p=0,28). De même, pour nos patients avec un variant de type épidermoïde, le pourcentage de non répondeurs à la CNA, évalués par ypT≥pT2, était de 63,6%, contrairement à l'évaluation par le TRG, qui retrouvait 63,6% de ... répondeurs (TRG < 3).

En revanche, la répartition des cas de phénotype luminal montrait une proportion de répondeurs qui restait supérieure à celle des non répondeurs, quel que soit le critère choisi pour définir la réponse à la CNA.

Dans notre travail, seuls 21/66 cas (31,8 %) ont pu être séquencés en NGS. Nous avons identifié 19% de cas FGFR3 mutés (n=4/21). Deux étaient des tumeurs de phénotype immunohistochimique basal et deux des tumeurs lumineuses. FGFR3 muté ne semble donc pas synonyme de tumeur de type luminal. Le rendement final de l'extraction d'ADN à partir du

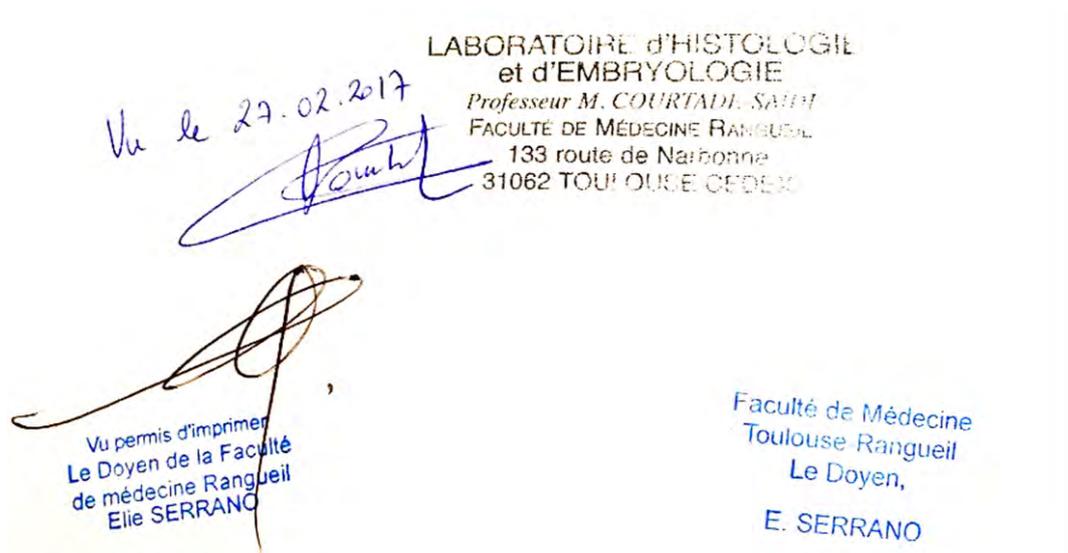
matériel FFPE n'était que de 28%, tandis que le rendement obtenu à partir des tumeurs cryopréservées était de 78%.

Le score de régression tumorale TRG permet donc de mieux identifier la réponse thérapeutique post CNA microscopique chez les patients présentant un carcinome urothélial infiltrant le muscle. Son utilisation a même une valeur pronostique supérieure à celle du stade ypT.

L'absence de variant morphologique et le phénotype luminal sont associés à une réponse favorable à la chimiothérapie. De plus, les données contradictoires concernant la réponse au traitement du variant épidermoïde et des tumeurs de type basal sont représentatives des données publiées à ce sujet, et montrent l'absence de valeur prédictive clairement établie.

Pour les études en biologie moléculaire, le meilleur rendement obtenu à partir des échantillons congelés doit nous inciter à toujours prélever et cryo-préserver une partie du matériel tumoral issu des RTV.

Enfin, l'immunohistochimie, avec un double marquage CK5/6 et GATA3 réalisé sur les RTV avant CNA, s'avère pertinente pour appréhender les patients susceptibles de mieux répondre à la thérapeutique.



## VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M. E. Goossens *et al.*, "International pooled study on diet and bladder cancer: the bladder cancer, epidemiology and nutritional determinants (BLEND) study: design and baseline characteristics," *Arch. Public Health Arch. Belg. Santé Publique*, vol. 74, p. 30, 2016.
- [2] A. M. Kamat *et al.*, "Bladder cancer," *The Lancet*.
- [3] "Cancer of the Urinary Bladder - SEER Stat Fact Sheets." [Online]. Available: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html>. [Accessed: 28-Dec-2016].
- [4] C. Pfister *et al.*, "[CCAFU Recommendations 2013: Bladder carcinoma]," *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.*, vol. 23 Suppl 2, pp. S105-125, Nov. 2013.
- [5] I. A. for R. on Cancer, *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*, 4th Revised edition. International Agency for Research on Cancer, 2016.
- [6] J. P. Stein *et al.*, "Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 19, no. 3, pp. 666–675, Feb. 2001.
- [7] P. Zehnder *et al.*, "Unaltered oncological outcomes of radical cystectomy with extended lymphadenectomy over three decades," *BJU Int.*, vol. 112, no. 2, pp. E51-58, Jul. 2013.
- [8] Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration, "Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration," *Eur. Urol.*, vol. 48, no. 2, pp. 202-205; discussion 205-206, Aug. 2005.
- [9] Advanced Bladder Cancer Meta-analysis Collaboration, "Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 361, no. 9373, pp. 1927–1934, Jun. 2003.
- [10] J. Alfred Witjes *et al.*, "Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer," *Eur. Urol.*, Jun. 2016.
- [11] M. Babjuk *et al.*, "EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016," *Eur. Urol.*, Jun. 2016.
- [12] W. Choi *et al.*, "Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy," *Cancer Cell*, vol. 25, no. 2, pp. 152–165, Feb. 2014.
- [13] J. S. Damrauer *et al.*, "Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 8, pp. 3110–3115, Feb. 2014.
- [14] G. Sjö Dahl *et al.*, "Toward a molecular pathologic classification of urothelial carcinoma," *Am. J. Pathol.*, vol. 183, no. 3, pp. 681–691, Sep. 2013.
- [15] Cancer Genome Atlas Research Network, "Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma," *Nature*, vol. 507, no. 7492, pp. 315–322, Mar. 2014.
- [16] R. D. P. FAAA, A. W. V. P. FAAA, A. W. M. M. M. B. F. FRCR, R. Tibbitts, and P. Richardson, *Gray's Atlas of Anatomy, 2e*, 2 edition. Churchill Livingstone, 2014.
- [17] "Voies urinaires basses." [Online]. Available: <http://www.embryology.ch/francais/turinary/urinbasse01.html#cloisonnement>. [Accessed: 03-Dec-2016].
- [18] V. Molinié, M. Sibony, P. Camparo, and A. Vieillefond, *Pathologie des voies urinaires excrétrices*. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson, 2008.
- [19] "Fact Sheets by Population." [Online]. Available: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx). [Accessed: 01-Feb-2017].
- [20] Z. Kirkali *et al.*, "Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis," *Urology*, vol. 66, no. 6 Suppl 1, pp. 4–34, Dec. 2005.
- [21] P. Colin *et al.*, "Environmental factors involved in carcinogenesis of urothelial cell carcinomas of the upper urinary tract," *BJU Int.*, vol. 104, no. 10, pp. 1436–1440, Nov. 2009.

- [22] M. P. Zeegers, F. E. Tan, E. Dorant, and P. A. van Den Brandt, "The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies," *Cancer*, vol. 89, no. 3, pp. 630–639, Aug. 2000.
- [23] M. P. Zeegers, G. M. Swaen, I. Kant, R. A. Goldbohm, and P. A. van den Brandt, "Occupational risk factors for male bladder cancer: results from a population based case cohort study in the Netherlands," *Occup. Environ. Med.*, vol. 58, no. 9, pp. 590–596, Sep. 2001.
- [24] M. R. Abern, A. M. Dude, M. Tsivian, and C. L. Coogan, "The characteristics of bladder cancer after radiotherapy for prostate cancer," *Urol. Oncol.*, vol. 31, no. 8, pp. 1628–1634, Nov. 2013.
- [25] M. N. El-Bolkainy, N. M. Mokhtar, M. A. Ghoneim, and M. H. Hussein, "The impact of schistosomiasis on the pathology of bladder carcinoma," *Cancer*, vol. 48, no. 12, pp. 2643–2648, Dec. 1981.
- [26] C. M. Mueller, N. Caporaso, and M. H. Greene, "Familial and genetic risk of transitional cell carcinoma of the urinary tract," *Urol. Oncol.*, vol. 26, no. 5, pp. 451–464, Oct. 2008.
- [27] R. Davis *et al.*, "Diagnosis, evaluation and follow-up of asymptomatic microhematuria (AMH) in adults: AUA guideline," *J. Urol.*, vol. 188, no. 6 Suppl, pp. 2473–2481, Dec. 2012.
- [28] A. Wallmeroth, U. Wagner, H. Moch, T. C. Gasser, G. Sauter, and M. J. Mihatsch, "Patterns of metastasis in muscle-invasive bladder cancer (pT2-4): An autopsy study on 367 patients," *Urol. Int.*, vol. 62, no. 2, pp. 69–75, 1999.
- [29] N. Tanaka *et al.*, "Metastatic behavior of upper tract urothelial carcinoma after radical nephroureterectomy: association with primary tumor location," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 21, no. 3, pp. 1038–1045, Mar. 2014.
- [30] B. J. Schmitz-Dräger *et al.*, "Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: the WHO/ICUD consensus," *Urol. Int.*, vol. 94, no. 1, pp. 1–24, 2015.
- [31] *The Paris System for Reporting Urinary Cytology | Dorothy L. Rosenthal | Springer.*
- [32] M. Helenius, E. Brekkan, P. Dahlman, M. Lönnemark, and A. Magnusson, "Bladder cancer detection in patients with gross haematuria: Computed tomography urography with enhancement-triggered scan versus flexible cystoscopy," *Scand. J. Urol.*, vol. 49, no. 5, pp. 377–381, 2015.
- [33] E. Compérat, P. Conort, M. Rouprêt, P. Camparo, and C. Mazerolles, "[Pathologic diagnosis and management of flat lesions of urothelium detected with aminolevulinic acid (Hexvix®)]," *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.*, vol. 21, no. 3, pp. 157–165, Mar. 2011.
- [34] D. Zaak *et al.*, "Endoscopic detection of transitional cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid: results of 1012 fluorescence endoscopies," *Urology*, vol. 57, no. 4, pp. 690–694, Apr. 2001.
- [35] E. Montanari, J. de la Rosette, F. Longo, A. Del Nero, and P. Laguna, "Narrow-band imaging (NBI) and white light (WLI) transurethral resection of the bladder in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer," *Arch. Ital. Urol. Androl. Organo Uff. Soc. Ital. Ecogr. Urol. E Nefrol.*, vol. 84, no. 4, pp. 179–183, Dec. 2012.
- [36] S. Gogalic *et al.*, "Validation of a protein panel for the non-invasive detection of recurrent non-muscle invasive bladder cancer," *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.*, pp. 1–27, Dec. 2016.
- [37] R. Kandimalla *et al.*, "A 3-plex methylation assay combined with the FGFR3 mutation assay sensitively detects recurrent bladder cancer in voided urine," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 19, no. 17, pp. 4760–4769, Sep. 2013.
- [38] V. Breen *et al.*, "A holistic comparative analysis of diagnostic tests for urothelial carcinoma: a study of Cxbladder Detect, UroVysion® FISH, NMP22® and cytology based on imputation of multiple datasets," *BMC Med. Res. Methodol.*, vol. 15, p. 45, May 2015.
- [39] R. Chou *et al.*, "Urinary Biomarkers for Diagnosis of Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis," *Ann. Intern. Med.*, vol. 163, no. 12, pp. 922–931, Dec. 2015.
- [40] R. Vikram, C. M. Sandler, and C. S. Ng, "Imaging and staging of transitional cell carcinoma: part 1, lower urinary tract," *AJR Am. J. Roentgenol.*, vol. 192, no. 6, pp. 1481–1487, Jun. 2009.

- [41] S. Verma *et al.*, "Urinary bladder cancer: role of MR imaging," *Radiogr. Rev. Publ. Radiol. Soc. N. Am. Inc.*, vol. 32, no. 2, pp. 371–387, Apr. 2012.
- [42] F. K. Mostofi, C. J. J. Davis, and I. A. Sesterhenn, *Histological Typing of Urinary Bladder Tumours*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [43] J. I. Epstein, "The new World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) classification for TA, T1 bladder tumors: is it an improvement?," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 47, no. 2, pp. 83–89, Aug. 2003.
- [44] J. N. Eble and I. A. for R. on Cancer, *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. IARC, 2004.
- [45] H. Miyamoto, J. S. Miller, D. A. Fajardo, T. K. Lee, G. J. Netto, and J. I. Epstein, "Non-invasive papillary urothelial neoplasms: the 2004 WHO/ISUP classification system," *Pathol. Int.*, vol. 60, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2010.
- [46] L. H. Sobin, M. K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, Eds., *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7 edition. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2009.
- [47] J. E. Martin, B. J. Jenkins, R. J. Zuk, J. P. Blandy, and S. I. Baithun, "Clinical importance of squamous metaplasia in invasive transitional cell carcinoma of the bladder," *J. Clin. Pathol.*, vol. 42, no. 3, pp. 250–253, Mar. 1989.
- [48] A. Akdaş and L. Türkeri, "The impact of squamous metaplasia in transitional cell carcinoma of the bladder," *Int. Urol. Nephrol.*, vol. 23, no. 4, pp. 333–336, 1991.
- [49] C. J. Logothetis *et al.*, "Cisplatin, cyclophosphamide and doxorubicin chemotherapy for unresectable urothelial tumors: the M.D. Anderson experience," *J. Urol.*, vol. 141, no. 1, pp. 33–37, Jan. 1989.
- [50] V. Dadhania *et al.*, "Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use," *EBioMedicine*, Aug. 2016.
- [51] M. B. Amin, K. Trpkov, A. Lopez-Beltran, D. Grignon, and Members of the ISUP Immunohistochemistry in Diagnostic Urologic Pathology Group, "Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the bladder lesions: report from the International Society of Urologic Pathology consensus conference," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 38, no. 8, pp. e20–34, Aug. 2014.
- [52] O. Kaufmann, J. Volmerig, and M. Dietel, "Uroplakin III is a highly specific and moderately sensitive immunohistochemical marker for primary and metastatic urothelial carcinomas," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 113, no. 5, pp. 683–687, May 2000.
- [53] S. C. Smith *et al.*, "Uroplakin II outperforms uroplakin III in diagnostically challenging settings," *Histopathology*, vol. 65, no. 1, pp. 132–138, Jul. 2014.
- [54] A. Chang *et al.*, "Utility of GATA3 immunohistochemistry in differentiating urothelial carcinoma from prostate adenocarcinoma and squamous cell carcinomas of the uterine cervix, anus, and lung," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 36, no. 10, pp. 1472–1476, Oct. 2012.
- [55] G. P. Paner *et al.*, "Immunohistochemical evaluation of novel and traditional markers associated with urothelial differentiation in a spectrum of variants of urothelial carcinoma of the urinary bladder," *Hum. Pathol.*, vol. 45, no. 7, pp. 1473–1482, Jul. 2014.
- [56] Y. Liang, J. Heitzman, A. M. Kamat, C. P. Dinney, B. Czerniak, and C. C. Guo, "Differential expression of GATA-3 in urothelial carcinoma variants," *Hum. Pathol.*, vol. 45, no. 7, pp. 1466–1472, Jul. 2014.
- [57] D. G. Davis *et al.*, "GATA-3 and FOXA1 expression is useful to differentiate breast carcinoma from other carcinomas," *Hum. Pathol.*, vol. 47, no. 1, pp. 26–31, Jan. 2016.
- [58] J. K. McKenney and M. B. Amin, "The role of immunohistochemistry in the diagnosis of urinary bladder neoplasms," *Semin. Diagn. Pathol.*, vol. 22, no. 1, pp. 69–87, Feb. 2005.
- [59] L. P. Kunju, R. Mehra, M. Snyder, and R. B. Shah, "Prostate-specific antigen, high-molecular-weight cytokeratin (clone 34betaE12), and/or p63: an optimal immunohistochemical panel to distinguish poorly differentiated prostate adenocarcinoma from urothelial carcinoma," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 125, no. 5, pp. 675–681, May 2006.

- [60] A. S. Baras *et al.*, "Identification and Validation of Protein Biomarkers of Response to Neoadjuvant Platinum Chemotherapy in Muscle Invasive Urothelial Carcinoma," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0131245, 2015.
- [61] M. A. Knowles and C. D. Hurst, "Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 15, no. 1, pp. 25–41, Jan. 2015.
- [62] B. W. G. van Rhijn *et al.*, "Molecular grade (FGFR3/MIB-1) and EORTC risk scores are predictive in primary non-muscle-invasive bladder cancer," *Eur. Urol.*, vol. 58, no. 3, pp. 433–441, Sep. 2010.
- [63] S. F. Shariat *et al.*, "Prognostic value of P53 nuclear accumulation and histopathologic features in T1 transitional cell carcinoma of the urinary bladder," *Urology*, vol. 56, no. 5, pp. 735–740, Nov. 2000.
- [64] M. R. Kalantari and H. Ahmadnia, "P53 overexpression in bladder urothelial neoplasms: new aspect of World Health Organization/International Society of Urological Pathology classification," *Urol. J.*, vol. 4, no. 4, pp. 230–233, 2007.
- [65] S. F. Shariat *et al.*, "p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 22, no. 6, pp. 1014–1024, Mar. 2004.
- [66] C. M. Perou *et al.*, "Molecular portraits of human breast tumours," *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 747–752, Aug. 2000.
- [67] J. E. Visvader, "Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis," *Genes Dev.*, vol. 23, no. 22, pp. 2563–2577, Nov. 2009.
- [68] C. Fan *et al.*, "Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 355, no. 6, pp. 560–569, Aug. 2006.
- [69] A. A. Alizadeh, D. T. Ross, C. M. Perou, and M. van de Rijn, "Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns," *J. Pathol.*, vol. 195, no. 1, pp. 41–52, Sep. 2001.
- [70] D. J. McConkey, W. Choi, and C. P. N. Dinney, "Genetic subtypes of invasive bladder cancer," *Curr. Opin. Urol.*, vol. 25, no. 5, pp. 449–458, Sep. 2015.
- [71] D. Lindgren *et al.*, "Combined gene expression and genomic profiling define two intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 9, pp. 3463–3472, May 2010.
- [72] J.-P. Volkmer *et al.*, "Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 6, pp. 2078–2083, Feb. 2012.
- [73] S. P. Lerner *et al.*, "Bladder Cancer Molecular Taxonomy: Summary from a Consensus Meeting," *Bladder Cancer*, vol. 2, no. 1, pp. 37–47.
- [74] S. Cambier *et al.*, "EORTC Nomograms and Risk Groups for Predicting Recurrence, Progression, and Disease-specific and Overall Survival in Non-Muscle-invasive Stage Ta-T1 Urothelial Bladder Cancer Patients Treated with 1-3 Years of Maintenance Bacillus Calmette-Guérin," *Eur. Urol.*, vol. 69, no. 1, pp. 60–69, Jan. 2016.
- [75] H. W. Herr, "The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumors," *J. Urol.*, vol. 162, no. 1, pp. 74–76, Jul. 1999.
- [76] A. M. Kamat and S. Porten, "Myths and mysteries surrounding bacillus Calmette-Guérin therapy for bladder cancer," *Eur. Urol.*, vol. 65, no. 2, pp. 267–269, Feb. 2014.
- [77] J. A. Witjes *et al.*, "EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines," *Eur. Urol.*, vol. 65, no. 4, pp. 778–792, Apr. 2014.
- [78] F. C. von Rundstedt *et al.*, "Usefulness of transurethral biopsy for staging the prostatic urethra before radical cystectomy," *J. Urol.*, vol. 193, no. 1, pp. 58–63, Jan. 2015.
- [79] A. Aziz *et al.*, "Prediction of 90-day mortality after radical cystectomy for bladder cancer in a prospective European multicenter cohort," *Eur. Urol.*, vol. 66, no. 1, pp. 156–163, Jul. 2014.
- [80] G. Gakis *et al.*, "ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Radical cystectomy and bladder preservation for muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder," *Eur. Urol.*, vol. 63, no. 1, pp. 45–57, Jan. 2013.

- [81] B. C. Baumann *et al.*, "Development and Validation of Consensus Contouring Guidelines for Adjuvant Radiation Therapy for Bladder Cancer After Radical Cystectomy," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 96, no. 1, pp. 78–86, Sep. 2016.
- [82] J. P. Christodouleas *et al.*, "Optimizing bladder cancer locoregional failure risk stratification after radical cystectomy using SWOG 8710," *Cancer*, vol. 120, no. 8, pp. 1272–1280, Apr. 2014.
- [83] M. D. Galsky, J. Domingo-Domenech, J. P. Sfakianos, and B. S. Ferket, "Definitive Management of Primary Bladder Tumors in the Context of Metastatic Disease: Who, How, When, and Why?," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, Aug. 2016.
- [84] Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration, "Adjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration," *Eur. Urol.*, vol. 48, no. 2, pp. 189–199; discussion 199–201, Aug. 2005.
- [85] H. B. Grossman *et al.*, "Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 349, no. 9, pp. 859–866, Aug. 2003.
- [86] International Collaboration of Trialists *et al.*, "International phase III trial assessing neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: long-term results of the BA06 30894 trial," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 16, pp. 2171–2177, Jun. 2011.
- [87] H. von der Maase *et al.*, "Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 18, no. 17, pp. 3068–3077, Sep. 2000.
- [88] E. R. Plimack *et al.*, "Accelerated methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin is safe, effective, and efficient neoadjuvant treatment for muscle-invasive bladder cancer: results of a multicenter phase II study with molecular correlates of response and toxicity," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 32, no. 18, pp. 1895–1901, Jun. 2014.
- [89] T. K. Choueiri *et al.*, "Neoadjuvant dose-dense methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin with pegfilgrastim support in muscle-invasive urothelial cancer: pathologic, radiologic, and biomarker correlates," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 32, no. 18, pp. 1889–1894, Jun. 2014.
- [90] H. B. Zaid *et al.*, "Trends in the utilization of neoadjuvant chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer: results from the National Cancer Database," *Urology*, vol. 83, no. 1, pp. 75–80, Jan. 2014.
- [91] E. E. F. van de Putte *et al.*, "Neoadjuvant induction dose-dense MVAC for muscle invasive bladder cancer: efficacy and safety compared with classic MVAC and gemcitabine/cisplatin," *World J. Urol.*, vol. 34, no. 2, pp. 157–162, Feb. 2016.
- [92] D. Esrig *et al.*, "Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 331, no. 19, pp. 1259–1264, Nov. 1994.
- [93] F. L. Chang and M. D. Lai, "Various forms of mutant p53 confer sensitivity to cisplatin and doxorubicin in bladder cancer cells," *J. Urol.*, vol. 166, no. 1, pp. 304–310, Jul. 2001.
- [94] A. S. Sarkis *et al.*, "Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 13, no. 6, pp. 1384–1390, Jun. 1995.
- [95] J. Watanabe *et al.*, "Clinical evaluation of p53 mutations in urothelial carcinoma by IHC and FASAY," *Urology*, vol. 63, no. 5, pp. 989–993, May 2004.
- [96] P. W. Cooke, N. D. James, R. Ganesan, A. Burton, L. S. Young, and D. M. Wallace, "Bcl-2 expression identifies patients with advanced bladder cancer treated by radiotherapy who benefit from neoadjuvant chemotherapy," *BJU Int.*, vol. 85, no. 7, pp. 829–835, May 2000.
- [97] G. Iyer *et al.*, "Correlation of DNA damage response (DDR) gene alterations with response to neoadjuvant (neo) dose-dense gemcitabine and cisplatin (ddGC) in urothelial carcinoma (UC)," *J. Clin. Oncol.*, vol. 34, no. suppl; abstr 5011, 2016.

- [98] E. R. Plimack *et al.*, “Defects in DNA Repair Genes Predict Response to Neoadjuvant Cisplatin-based Chemotherapy in Muscle-invasive Bladder Cancer,” *Eur. Urol.*, vol. 68, no. 6, pp. 959–967, Dec. 2015.
- [99] C. P. N. Dinney *et al.*, “Novel neoadjuvant therapy paradigms for bladder cancer: results from the National Cancer Center Institute Forum,” *Urol. Oncol.*, vol. 32, no. 8, pp. 1108–1115, Nov. 2014.
- [100] B. A. Mooso, R. L. Vinall, M. Mudryj, S. A. Yap, R. W. deVere White, and P. M. Ghosh, “The role of EGFR family inhibitors in muscle invasive bladder cancer: a review of clinical data and molecular evidence,” *J. Urol.*, vol. 193, no. 1, pp. 19–29, Jan. 2015.
- [101] T. Hayashi *et al.*, “Targeting HER2 with T-DM1, an Antibody Cytotoxic Drug Conjugate, is Effective in HER2 Over Expressing Bladder Cancer,” *J. Urol.*, vol. 194, no. 4, pp. 1120–1131, Oct. 2015.
- [102] D. E. Hansel, E. Swain, R. Dreicer, and R. R. Tubbs, “HER2 overexpression and amplification in urothelial carcinoma of the bladder is associated with MYC coamplification in a subset of cases,” *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 130, no. 2, pp. 274–281, Aug. 2008.
- [103] B. A. Carneiro, J. J. Meeks, T. M. Kuzel, M. Scaranti, S. A. Abdulkadir, and F. J. Giles, “Emerging therapeutic targets in bladder cancer,” *Cancer Treat. Rev.*, Nov. 2014.
- [104] A. Morales, D. Eidinger, and A. W. Bruce, “Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the Treatment of Superficial Bladder Tumors,” *J. Urol.*, vol. 197, no. 2, Supplement, pp. S142–S145, Feb. 2017.
- [105] P. Sharma and J. P. Allison, “The future of immune checkpoint therapy,” *Science*, vol. 348, no. 6230, pp. 56–61, Apr. 2015.
- [106] B. A. Inman *et al.*, “PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression,” *Cancer*, vol. 109, no. 8, pp. 1499–1505, Apr. 2007.
- [107] J. E. Rosenberg *et al.*, “Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 387, no. 10031, pp. 1909–1920, May 2016.
- [108] E. R. Plimack *et al.*, “Safety and activity of pembrolizumab in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-012): a non-randomised, open-label, phase 1b study,” *Lancet Oncol.*, Jan. 2017.
- [109] P. Sharma *et al.*, “Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial,” *Lancet Oncol.*, Jan. 2017.
- [110] C. Massard *et al.*, “Safety and Efficacy of Durvalumab (MEDI4736), an Anti-Programmed Cell Death Ligand-1 Immune Checkpoint Inhibitor, in Patients With Advanced Urothelial Bladder Cancer,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 34, no. 26, pp. 3119–3125, Sep. 2016.
- [111] W. Choi *et al.*, “Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer,” *Nat Rev Urol*, vol. 11, no. 7, pp. 400–410, Jul. 2014.
- [112] E. A. Eisenhauer *et al.*, “New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1),” *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 45, no. 2, pp. 228–247, Jan. 2009.
- [113] N. M. Gandhi *et al.*, “Gemcitabine and cisplatin neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive urothelial carcinoma: Predicting response and assessing outcomes,” *Urol. Oncol.*, vol. 33, no. 5, p. 204.e1-7, May 2015.
- [114] G. Sonpavde *et al.*, “Quality of pathologic response and surgery correlate with survival for patients with completely resected bladder cancer after neoadjuvant chemotherapy,” *Cancer*, vol. 115, no. 18, pp. 4104–4109, Sep. 2009.
- [115] F. M. Vecchio *et al.*, “The relationship of pathologic tumor regression grade (TRG) and outcomes after preoperative therapy in rectal cancer,” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 62, no. 3, pp. 752–760, Jul. 2005.
- [116] R. Langer, K. Ott, M. Feith, F. Lordick, J.-R. Siewert, and K. Becker, “Prognostic significance of histopathological tumor regression after neoadjuvant chemotherapy in esophageal

- adenocarcinomas," *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc*, vol. 22, no. 12, pp. 1555–1563, Dec. 2009.
- [117] A. Fleischmann, G. N. Thalmann, A. Perren, and R. Seiler, "Tumor regression grade of urothelial bladder cancer after neoadjuvant chemotherapy: a novel and successful strategy to predict survival," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 38, no. 3, pp. 325–332, Mar. 2014.
- [118] F. Brimo, "Pathologic prognostic factors in radical cystectomy post Neoadjuvant Chemotherapy."
- [119] S. Senol *et al.*, "Relation of stem cell markers ALDH1 and CD44 with clinicopathological factors in urothelial carcinomas of urinary bladder," *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 8, no. 3, pp. 4195–4203, Mar. 2015.
- [120] D. C. Tomlinson, O. Baldo, P. Harnden, and M. A. Knowles, "FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer," *J. Pathol.*, vol. 213, no. 1, pp. 91–98, Sep. 2007.
- [121] J. Hedegaard *et al.*, "Next-Generation Sequencing of RNA and DNA Isolated from Paired Fresh-Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples of Human Cancer and Normal Tissue," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 5, May 2014.
- [122] F. Petrelli, A. Coinu, M. Cabiddu, M. Ghilardi, I. Vavassori, and S. Barni, "Correlation of pathologic complete response with survival after neoadjuvant chemotherapy in bladder cancer treated with cystectomy: a meta-analysis," *Eur. Urol.*, vol. 65, no. 2, pp. 350–357, Feb. 2014.
- [123] R. Rosenblatt *et al.*, "Pathologic downstaging is a surrogate marker for efficacy and increased survival following neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy for muscle-invasive urothelial bladder cancer," *Eur. Urol.*, vol. 61, no. 6, pp. 1229–1238, Jun. 2012.
- [124] H. Zargar *et al.*, "Final Pathological Stage after Neoadjuvant Chemotherapy and Radical Cystectomy for Bladder Cancer-Does pT0 Predict Better Survival than pTa/Tis/T1?," *J. Urol.*, vol. 195, no. 4 Pt 1, pp. 886–893, Apr. 2016.
- [125] E. Provenzano *et al.*, "Standardization of pathologic evaluation and reporting of postneoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: recommendations from an international working group," *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc*, vol. 28, no. 9, pp. 1185–1201, Sep. 2015.
- [126] S. H. Culp *et al.*, "Refining patient selection for neoadjuvant chemotherapy before radical cystectomy," *J. Urol.*, vol. 191, no. 1, pp. 40–47, Jan. 2014.
- [127] F.-C. von Rundstedt, D. A. Mata, O. N. Kryvenko, A. A. Shah, I. Jhun, and S. P. Lerner, "Utility of Clinical Risk Stratification in the Selection of Muscle-Invasive Bladder Cancer Patients for Neoadjuvant Chemotherapy: A Retrospective Cohort Study," *Bladder Cancer*, vol. 3, no. 1, pp. 35–44, Jan. 2017.
- [128] A. Gryn, "Chimiothérapie néoadjuvante pour carcinome urothélial de vessie infiltrant le muscle : complications post opératoires, résultats oncologiques et sélection des patients. Sous la direction du Pr Eric Huyghe." Thèse de doctorat en médecine. Université Toulouse III., Oct-2016.
- [129] M. E. Nielsen *et al.*, "Recurrence-free survival after radical cystectomy of patients downstaged by transurethral resection," *Urology*, vol. 70, no. 6, pp. 1091–1095, Dec. 2007.
- [130] A. Brant *et al.*, "Pathologic response in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: Is therapeutic effect owing to chemotherapy or TURBT?," *Urol. Oncol.*, vol. 35, no. 1, p. 34.e17-34.e25, Jan. 2017.
- [131] D. R. Lucas *et al.*, "Histologic alterations from neoadjuvant chemotherapy in high-grade extremity soft tissue sarcoma: clinicopathological correlation," *The Oncologist*, vol. 13, no. 4, pp. 451–458, Apr. 2008.
- [132] S. Thies and R. Langer, "Tumor regression grading of gastrointestinal carcinomas after neoadjuvant treatment," *Front. Oncol.*, vol. 3, p. 262, Oct. 2013.
- [133] B. Khandakar *et al.*, "Tumour morphology after neoadjuvant chemotherapy as a predictor of survival in serous ovarian cancer: an experience from a tertiary care centre in India," *Malays. J. Pathol.*, vol. 37, no. 2, pp. 115–121, Aug. 2015.

- [134] R. Rajan, F. J. Esteva, and W. F. Symmans, "Pathologic changes in breast cancer following neoadjuvant chemotherapy: implications for the assessment of response," *Clin. Breast Cancer*, vol. 5, no. 3, pp. 235–238, Aug. 2004.
- [135] H. J. Wang, S. Solanki, S. Traboulsi, W. Kassouf, and F. Brimo, "Neoadjuvant chemotherapy-related histologic changes in radical cystectomy: assessment accuracy and prediction of response," *Hum. Pathol.*, vol. 53, pp. 35–40, Jul. 2016.
- [136] E. Scosyrev *et al.*, "Do mixed histological features affect survival benefit from neoadjuvant platinum-based combination chemotherapy in patients with locally advanced bladder cancer? A secondary analysis of Southwest Oncology Group-Directed Intergroup Study (S8710)," *BJU Int.*, vol. 108, no. 5, pp. 693–699, Sep. 2011.
- [137] V. K. Pokuri *et al.*, "Predictors of Complete Pathologic Response (pT0) to Neoadjuvant Chemotherapy in Muscle-invasive Bladder Carcinoma," *Clin. Genitourin. Cancer*, vol. 14, no. 1, pp. e59–65, Feb. 2016.
- [138] E. Kastritis *et al.*, "The outcome of advanced or recurrent non-squamous carcinoma of the uterine cervix after platinum-based combination chemotherapy," *Gynecol. Oncol.*, vol. 99, no. 2, pp. 376–382, Nov. 2005.
- [139] M. Castillo-Martin, J. Domingo-Domenech, O. Karni-Schmidt, T. Matos, and C. Cordon-Cardo, "Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis," *Urol. Oncol.*, vol. 28, no. 4, pp. 401–408, Aug. 2010.
- [140] A. C. Tregnago, "Immunohistochemical characterization of Basal and Luminal phenotypes in muscle invasive bladder urothelial carcinomas (MIBC) treated with neoadjuvant chemotherapy (NAC)," *abstract USCAP 2017.*, no. 1060, 2017.
- [141] E. Compérat, A. Furudoi, J. Varinot, and N. Rioux-Leclercq, "Carcinome urothélial: des classifications histologiques et moléculaires vers un traitement adéquat," *Ann. Pathol.*, vol. 36, no. 4, pp. 275–278, Aug. 2016.
- [142] A. Rodriguez-Vida *et al.*, "Complexity of FGFR signalling in metastatic urothelial cancer," *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol*, vol. 8, p. 119, Oct. 2015.
- [143] D. Pouessel *et al.*, "Tumor heterogeneity of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutations in invasive bladder cancer: implications for perioperative anti-FGFR3 treatment," *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 27, no. 7, pp. 1311–1316, Jul. 2016.
- [144] INCa, "Conservation et utilisation des échantillons tumoraux en cancérologie – actualisation 2011 des indications et recommandations aux tumorothèques, collection Référentiels et Recommandations, INCa, Boulogne-Billancourt." .
- [145] T. Galissier *et al.*, "Biobanking of Fresh-Frozen Human Adenocarcinomatous and Normal Colon Tissues: Which Parameters Influence RNA Quality?," *PloS One*, vol. 11, no. 4, p. e0154326, 2016.
- [146] M. Gerlinger *et al.*, "Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing," *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, no. 10, pp. 883–892, Mar. 2012.
- [147] J. Kardos *et al.*, "Claudin-low bladder tumors are immune infiltrated and actively immune suppressed," *JCI Insight*, vol. 1, no. 3, p. e85902, Mar. 2016.
- [148] S. Koscielny, "Critical review of microarray-based prognostic tests and trials in breast cancer," *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, vol. 20, no. 1, pp. 47–50, Feb. 2008.
- [149] A. Dupuy and R. M. Simon, "Critical review of published microarray studies for cancer outcome and guidelines on statistical analysis and reporting," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 99, no. 2, pp. 147–157, Jan. 2007.
- [150] S. Michiels, S. Koscielny, and C. Hill, "Interpretation of microarray data in cancer," *Br. J. Cancer*, vol. 96, no. 8, pp. 1155–1158, Apr. 2007.
- [151] C. Sotiriou and M. J. Piccart, "Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care?," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 7, pp. 545–553, Jul. 2007.
- [152] A. Font *et al.*, "BRCA1 mRNA expression and outcome to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in bladder cancer," *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 22, no. 1, pp. 139–144, Jan. 2011.

- [153] G. J. Netto and L. J. Tafe, "Emerging Bladder Cancer Biomarkers and Targets of Therapy," *Urol. Clin. North Am.*, vol. 43, no. 1, pp. 63–76, Feb. 2016.
- [154] J. Taberero *et al.*, "Phase I Dose-Escalation Study of JNJ-42756493, an Oral Pan-Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 33, no. 30, pp. 3401–3408, Oct. 2015.

## IX. ANNEXES

Annexe 1: blocs de RTV tumoraux sélectionnés pour la réalisation des TMA.

N° Bloc	Lot de charg.	N° Bloc TMA
14R.69	3	1E
13R956	3	B
13R15557	3	2A/2B
13R.20541	3	R3 + H
13R.16588	3	A
12R15614	2	B
12R11689	2	O
12R16318	2	2a
12R.17526	2	I
12R.13340	2	B
11R8510	2	B
11R7683	2	A
11R7088	2	A
11R4666	2	A
11R19582	2	A
11R18889	2	D
11R14872	2	C
10R7351	1	A
10R4966	1	B
10R16284	1	A
10R13574	1	B
10R1113	1	O
09R12230	1	D
09R11626	1	B
09R10883	1	C
15T019786	3	2
15T025787	3	3
13R5587	3	B
14R349	1	T
14R008795	3	2
14T003979	3	1 ET 3
16T028830	4	AQ1
16T031397	4	1
16T028831	4	1
16T028833	4	1
16T029163	4	O
16T031404	4	1
16T029158	4	1
13R013592	4	G
16T028823	4	AQ3
16T028822	4	1
16T028825	4	D
16T031402	4	1
16T028835	4	O
16T028837	4	1
16T031408	4	1
16T028642	4	B
16T028838	4	A
16T030576	4	A
16T028828	4	A

Annexe 2: N°Diamic des cas et blocs choisis pour l'extraction de l'ADN (cas FFPE et cas Cryopréservés en tumorothèque).  
Quantité d'ADN extrait en ng et Ct obtenu en qPCR.

	Lieu de stockage des blocs	bloc pour extraction ADN	Qté ADN/FFPE	ADN/FFPE amplifiable en qPCR ?	Qté ADN /Congelé	ADN/congélation amplifiable en qPCR ?	Ct qPCR
14B.66	3	1A	1,3416	0			
13R956	3	H	8,5842	0	4,7323	1	23,48
13R15557	3	1BC	0				
13R29541	3	A	1,3201	0			
13R16598	3	B	0,8702	0	0		
12R12868	2	1a	1,9952	0			
12R17226	2	0	2,5992	0			
12R1631A	2	2b	4,8184	1			28,47
12R17526	2	G	3,5991	0	11,433	1	22,56
12R13940	2	A	2,7176	0			
11R8516	2	A	1,9608	0	5,3872	1	23,44
11R7689	2	C	3,1648	0			
11R7091	2	B	4,9106	0	12,4357	1	22,79
11R4968	2	B	2,2059	0			
11R15582	2	D	6,4106	0			
11R18889	2	K	4,0318	1			
11R14872	2	A	4,6182	0			
10R7351	1	F	0		13,3015	1	21,91
10R496	1	g	5,2022	0			
10R16284	1	A	0				
10R13574	1	B	0		4,4659	1	23,68
10R117	1	0	0				
09R12290	1	C	8,6298	0			
09R11626	1	D	6,2206	0	8,5618	1	22,96
09R10281	1	D	0,9348	0	0		
15T19706	3	4	0,8284				
15T125757	3	4	1,805	1			27,97
13R5387	3	C	0,9842				
14R068795	3	1	0,9006				
14R103978	3	2	4,7994	1			26,44
16T128830	4	A01	1,1134				
16T131397	4	2	5,168	1			29,02
16T128831	4	1	7,904	1			25,31
16T128833	4	1	3,8836	1			
16T129157	4	0	2,0292	1			28,42
16T131404	4	3	0,1406				
16T128158	4	1	1,3908	1			
11R113152	4	*	0	0			
16T128823	4	A01	4,807	0			
16T128822	4	4	9,1808	1			
16T128825	4	J	28,234	1			
16T131402	4	2	0				
16T128835	4	0	7,6646				
16T128837	4	1	3,6556	0			
16T131408	4	1	0				
16T128842	4	C	1,5732	1			29,42
16T128833	4	A	1,5656	1			29,75
16T128876	4	C	3,1084	1			27,13
16T128878	4	E	0				

Lieux de stockage des blocs FFPE : 1 : Réserve CHU Rangueil ; 2 : Archives Logidos ; 3 : Archives IUCT ; 4 : Cas extérieurs.

Chaque ADN est qualifié en qPCR et une valeur de Ct est déterminée, elle doit être inférieure à un Ct seuil (préalablement déterminé avec un ADN standard (ADN commercial dont on connaît la qualité). Au-delà de ce seuil, l'échantillon ne peut être séquençé en NGS sur le panel INCA.

Annexe 3: Description des mutations et variants retrouvés en séquençage NGS avec le panel INCA.

npat	gène	variant	protéin	FA	profondeur
9	WT				
27	HRAS	c.445C>T	p.R149W	3,9	2440
40	FGFR3	c.746C>T	p.S249F	22	200
50	WT				
51	WT				
72	MET	c.1039G>A	p.A347T	51	4850
85	WT				
100	WT				
101	PIK3CA	c.1633G>A	p.E545K	20,5	820
104	MET	c.229G>A	p.D77N	3,4	12420
106	HRAS	c.290+3G>C	splicing	19,90%	1600
107	FGFR3	c.1117A>T	p.S373C	30	2230
111	WT				
113	FGFR3	c.746C>T	p.S249F	28	68
132	EGFR	c.2257C>G	p.P753A	4,15	5400
132	EGFR	c.2185G>A	p.G729R	11,3	3000
133	PIK3CA	c.1645G>C	p.D549H	11,4	8250
143	WT				
146	PIK3CA	c.1624G>A	p.E542K	23,8	2200
146	FGFR3	c.1156T>C	p.F386L	56	3600
146	FGFR3	c.796G>A	p.V266M	7,2	180
156	WT				
185	PIK3CA	c.1633G>A	p.E545K	12,45	5600
193	WT				

Anticorps	Description
<b><u>Marqueurs basaux</u></b>	
<b>CK5/6</b>	Les cytokératines sont des polypeptides fibreux de 7 à 11nm de diamètre. Il s'agit de composants du cytosquelette des cellules épithéliales. Elles sont considérées comme des marqueurs de différenciation épithéliale. 20 types distincts ont été identifiés. La CK5 est un type basique de cytokératine de poids moléculaire élevé, exprimé dans les couches de cellules basales, intermédiaires et superficielles des épithéliums stratifiés ainsi que des épithéliums transitionnels, des épithéliums complexes, des cellules mésothéliales et des mésothéliomes. La CK5 n'est pas présente dans les épithéliums simples et dans les cellules non épithéliales. La CK6 est également un type basique de cytokératine de poids moléculaire élevé, exprimée dans l'épithélium squameux proliférant.
<b>CD44</b>	Les molécules d'adhésion CD44 sont un groupe de glycoprotéines transmembranaires ubiquitaires retrouvées sur les cellules épithéliales et mésenchymateuses. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire ayant un rôle de récepteur de surface pour l'acide hyaluronique. Ces récepteurs ont un rôle dans l'adhérence cellulaire, les interactions cellules-substrat et la migration cellulaire. En pathologie vésicale, les différents variants de CD44 semblent jouer un rôle important dans la cancérogenèse et dans le processus métastatique des tumeurs. Dans l'urothélium normal, l'expression de CD44 est observée seulement au niveau des cellules basales, alors que dans les atypies réactionnelles il est souvent hyper exprimé avec un marquage de toutes les cellules dans 60% des cas. Pour les tumeurs superficielles, l'expression de CD44 serait corrélée à un stade avancé et au grade(100).
<b><u>Marqueurs luminaux</u></b>	
<b>CK20</b>	Marqueur épithélial de 46 kDa. Il s'agit d'une protéine des filaments intermédiaires du cytosquelette ayant d'abord été mise en évidence dans l'épithélium gastrique, intestinal, urothélial et dans les cellules de Merkel.
<b>GATA3</b>	GATA3 est un facteur de transcription membre de la famille des protéines GATA caractérisées par un domaine conservé de type « zinc-finger », d'adhésion à l'ADN. Ces protéines nucléaires reconnaissent des séquences ADN consensus dans les promoteurs de leur gènes cibles et activent ou répriment leur transcription.
<b>FGFR3</b>	Le récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes FGFR3 est une glycoprotéine composée de 3 domaines : un domaine extra membranaire de type immunoglobuline, un domaine trans membranaire et un domaine de type tyrosine kinase dépendant. L'anticorps FGFR3-B9 (SC- 13121) utilisé est de type anticorps monoclonal de souris reconnaissant la partie extracellulaire du récepteur (acides aminés 25 à 124) humain.

---

## **Etude des caractéristiques morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires de carcinomes urothéliaux infiltrant le muscle, traités par chimiothérapie néoadjuvante.**

---

### **RESUME :**

Objectifs : Le traitement de référence des tumeurs urothéliales infiltrant le muscle combine actuellement une chimiothérapie néo adjuvante (CNA) à base de cisplatine suivie d'une cystectomie radicale. Seul un tiers des patients obtient une réponse complète après CNA et aucun biomarqueur prédictif fiable ne permet de sélectionner ces patients avant traitement.

Notre objectif était d'identifier des facteurs prédictifs de réponse à la chimiothérapie à l'aide d'outils disponibles en routine, ainsi que d'évaluer l'utilisation d'un score de régression tumorale (TRG) sur les pièces de cystectomie.

Matériels et méthodes : Une cohorte de patients traités par chimiothérapie néoadjuvante avant cystectomie pour un carcinome urothélial de haut grade, infiltrant le muscle a été analysée. Une recherche de variants morphologiques, des marquages immunohistochimiques avec les anticorps anti-CK5/6 et GATA3, ainsi qu'un séquençage ciblé en NGS avec le panel INCa ont été réalisés sur le matériel tumoral issu des RTV pré-CNA. La réponse thérapeutique a été évaluée à la fois par le stade ypTNM et par un score de régression tumorale TRG, sur les pièces de cystectomie post-CNA.

Résultats : Notre cohorte comportait 66 patients. Le taux de réponse globale à la CNA (avec stade ypT < pT2) était de 59,1 % (n = 39/66) et de 71,2% (n = 47/66) si on définissait la réponse par un TRG < 3. Onze cas (22%) étaient de phénotype basal (CK5/6 + et GATA3 -), dont 63,6% étaient non répondeurs si la réponse à la CNA était définie par un stade ypT < pT2 (p=0,19), contre 45.4 % si elle était définie par un TRG < 3 (p=0,28). Les cas de variant épidermoïde, comportaient 63,6% de stade ypT ≥ pT2, contre 36,4% de TRG 3 (ou non répondeurs avec l'évaluation par le TRG). La répartition des cas de phénotype luminal [(CK5/6 + ou – et GATA3+) ou (CK5/6- et GATA3-)] était de 61,5% de stade ypT < pT2 (p=0,19) contre 73,7% de TRG < 3 (p=0,28).

Conclusion : Le score de régression tumorale TRG évalué sur pièce de cystectomie permet de mieux identifier la réponse thérapeutique post CNA. Il a une valeur pronostique supérieure à celle du stade ypT. L'absence de variant morphologique et le phénotype luminal sont associés à une réponse favorable à la chimiothérapie. Le double marquage immunohistochimique CK5/6 et GATA3 sur les RTV avant CNA s'avère pertinent pour appréhender les patients susceptibles de mieux répondre à la chimiothérapie.

---

**TITRE EN ANGLAIS** : Study of morphological, immunohistochemical and molecular characteristics of muscle invasive bladder cancers treated by neoadjuvant chemotherapy.

---

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE** : Médecine spécialisée : Anatomie et cytopathologie

---

**MOTS-CLÉS** : Carcinome urothélial, chimiothérapie néoadjuvante, grade de régression tumorale, biomarqueurs, classification moléculaire.

---

### **INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :**

Université Toulouse III-Paul Sabatier  
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,  
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

---

**Directrice de thèse** : Dr Marie-Laure QUINTYN-RANTY