



HAL
open science

Etude de l'immunité anti-tumorale et des altérations génomiques et protéiques sur une cohorte de tumeurs de vessie avec implication pronostique et théranostique

Constance Le Goux

► To cite this version:

Constance Le Goux. Etude de l'immunité anti-tumorale et des altérations génomiques et protéiques sur une cohorte de tumeurs de vessie avec implication pronostique et théranostique. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS528 . tel-03491870

HAL Id: tel-03491870

<https://theses.hal.science/tel-03491870v1>

Submitted on 18 Dec 2021

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

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

ED 394 – Physiologie Physiopathologie et Thérapeutique

**Etude de l'immunité anti-tumorale et des altérations génomiques
et protéiques sur une cohorte de tumeurs de vessie avec
implication pronostique et théranostique**

Par Constance Le Goux

Thèse de Sciences de Vie et Santé

Dirigée par le Professeur Diane Damotte

En collaboration avec les Pr Ivan Bièche et Dr Géraldine Pignot

Présentée et soutenue publiquement le 16 Décembre 2019

Devant un jury composé de :

*Pr Irani et Pr Allory (rapporteurs), Pr Bièche, Pr Compérat, Dr Lorient, Pr Pasmant,
Dr Pignot et Pr Damotte*



Table des matières

TABLE DES MATIERES	3
REMERCIEMENTS	4
RÉSUMÉ.....	7
ABSTRACT.....	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS	12
INTRODUCTION	14
I. HISTORIQUE ET EPIDEMIOLOGIE DU CANCER DE LA VESSIE	14
II. CLASSIFICATION <i>TNM</i> DES TUMEURS DE VESSIE	16
III. PRISE EN CHARGE DES TUMEURS DE VESSIE	20
III. 1. PRISE EN CHARGE DES TVNIM	20
III. 2. PRISE EN CHARGE DES TVIM.....	25
IV. CARCINOGENESE UROTHELIALE	29
IV.1. SCHEMA HISTORIQUE DE WU	29
VI.2. DONNEES DU TCGA (<i>The Cancer Genome Atlas</i>).....	30
VI.3. CLASSIFICATIONS MOLECULAIRES	34
V. CANCER DE VESSIE ET IMMUNOTHERAPIE	36
VI. RATIONNEL DU PROJET DE RECHERCHE	38
VII. TRAVAUX DE MASTER 2 (M2)	39
VIII. OBJECTIFS DE LA THESE DE SCIENCE.....	41
IX. MATERIEL ET METHODOLOGIE GENERALE	42
IX.1. PATIENTS ET ECHANTILLONS	42
IX.2. ANALYSE DE L'ADN	43
IX.3. RT-PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL.....	46
IX.4. VALIDATION PAR EXPRESSION PROTEIQUE SUR BLOCS DE TMA	50
IX.5. ANALYSE STATISTIQUE	51
IX.6. CARACTERISTIQUES DE LA COHORTE	52
RÉSULTATS	53
I. GENES DE L'IMMUNITE ANTI-TUMORALE	53
II. ONCOGENES ALTÉRÉS DANS LES TUMEURS DE VESSIE	62
INTERACTIONS ENTRE LES ALTÉRATIONS GÉNIQUES ET LE MICRO-ENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE	98
DISCUSSION GÉNÉRALE	103
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	114
RÉFÉRENCES	117
LISTE DES TABLEAUX	126
LISTE DES FIGURES.....	127
ANNEXES	129
ANNEXE 1. ARTICLE SUR PD-1, CTLA4/CD28 ET LEURS LIGANDS.....	130
ANNEXE 2. 3E ARTICLE ISSU DE LA COHORTE PUBLIE DURANT LES ANNEES DE THESE	137

REMERCIEMENTS

A ceux qui ont contribué à l'élaboration de cette thèse :

A ma directrice de thèse, le Professeur Diane Damotte : je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail et de vous être éloignée de vos organes de prédilection pour participer à ces travaux.

Au Professeur Ivan Bièche : merci pour ta patience, merci de m'avoir initiée au « chinois » que représentait initialement pour moi la recherche.

A Géraldine Pignot que j'admire tellement et que je considère comme ma grande sœur.

Au Professeur Yves Allory. Merci pour votre implication.

Aux Professeurs Mathilde Sibony, Benoît Terris, François Radvanyi et Nicolas Barry Delongchamps.

Aux Docteurs Véronique Matéo, Philippe Beuzeboc et Camille Serrate pour leur participation aux réunions de comité.

A Sophie Vacher, Anne Schnitzler, Walid Chemlali et François Lallemand.

A Béatrice, Brigitte et Patricia.

A l'équipe esthético-informatico-orthographique : Sara, ma mère, ma soeur et Christina.

Aux autres membres du jury :

Au Professeur Irani : ces quelques lignes sont pour moi l'occasion de vous remercier encore de m'avoir fait l'honneur de me prendre comme chef de clinique au sein de votre équipe. Merci pour votre gentillesse. Je garderai un excellent

souvenir de ces 2 années à Bicêtre. Merci enfin d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de recherche.

Aux Professeurs Eva Compérat et Eric Pasmant et au Docteur Yohann Lorient.

A David, mon compagnon, mon amoureux, mon complice, mon confident, mon ami, mon tout. Je suis heureuse et reconnaissante d'avoir croisé ta route et celle d'Aaron. J'ai hâte du futur avec vous.

A ma famille :

A ma mère qui est la plus dévouée des mamans. Merci pour tout ce que tu fais pour moi depuis toutes ces années.

A mon père pour son implication de chaque seconde ☺

A mon frère et ma sœur. Malgré nos embrouilles parfois dignes de celles des « Marseillais vs le Reste du monde », l'amour est bien là, c'est le plus important.

A mon grand-père chéri.

A JF et Nassiba : merci de supporter mes parents ☺

A mon parrain et ma marraine : je ne vous aurais pas mieux choisis !

A ma belle-famille de cœur : Marie-Kiki et Domi ; Nico et Eva, mes beaux.

A mes amis et tout particulièrement : ma Kiki, Pierrot ; Salomé, Thomas, Nala, Marine ; ma belle Ald et Benoît, Saralélouï, Lou, Fabie ; Tristan, Capu ; ma Jula et Amir, Bambou et Arthur, Louison, Debbie ; Grinzou, Ben, Bat, Susu et Maya, Fils et Laura ; Lior et Bibou, JB et Natacha.

A mes rencontres de l'internat, notamment : ma Débox ; Ipti, Francis ; Cédric, Arnaud, Julien ; Pr Hammoudi, Vincent, Thomas, Bastien, Julien, Rachid, Quentinou, Dr Tantay, Laura Ruscio ; Mahaut, M. Dousset, Marthe ; Poupou, Cécile « tu as des codes Cristal ? » ; Hakimou, Nicolas, Florence, Ali ; Samia et sa bonne humeur criarde ☺, Florence, Emmanuelle, Lisa ; Romain, Cobby, Mattieu, Quentin, M. Castier : « Toi tu fais une thèse de sciences ? Ah ba c'est la meilleure de l'année celle-là ! » ; M. Guillonneau, Jean-Alex, Jean-Youn, Philippe, Nathalie, Hanna Kinder bueno, Julia ; Simon et Alexandre Ingels.

A mes rencontres du clinicat, particulièrement : Sophie, Guillaume, Jonathan ; Pompotte, Valvule, Elo, Griny, Nico, Quentin, Soso, Claire, Alexandra, Titi, Beuz, Eliane ; les infirmier(e)s et secrétaires de KB avec qui j'ai travaillé durant ces 2 ans.

A Monsieur le Docteur Patrick Coloby qui me fait confiance pour la suite.

A Alex, qui brille tous les jours et pour toujours.

RÉSUMÉ

Le cancer de vessie représente la 6^{ème} cause de mortalité par cancer en France. Le manque de facteurs pronostiques individuels incite à chercher de nouveaux marqueurs théranostiques permettant également d'identifier des cibles thérapeutiques. Les analyses pangénomiques, comme celles du *TCGA (The Cancer Genome Atlas)*, ont permis d'identifier de nouvelles altérations génomiques qui seraient de potentiels biomarqueurs. L'émergence d'immunothérapie ciblant le verrou immunitaire (ICI) PD-1/PD-L1/CTLA4 a conduit des essais thérapeutiques pan-cancers parfois orientés par l'expression de PD-1/PD-L1 et de CTLA4 et de leurs ligands. Dans le cancer de vessie, l'immunothérapie est une approche ancienne avec la BCG-thérapie intra-vésicale pour les tumeurs de vessie non infiltrant le muscle (TVNIM). Les ICI ont montré de très bons résultats dans le cancer de vessie mais il n'est pas clairement identifié de marqueurs prédictifs de la réponse, que ce soit l'expression de PD-L1, l'évaluation de la charge mutationnelle ou les classifications moléculaires. Nos travaux s'inscrivent dans cet état des lieux. Nous souhaitons étudier l'implication de l'environnement immunitaire et son lien avec les altérations oncogéniques et corrélés ces résultats au pronostic et à la réponse au traitement par BCG-thérapie.

Matériel et méthodologie générale

Notre cohorte était constituée de 127 à 155 échantillons tumoraux (60/71 TVNIM et 67/84 tumeurs de vessie infiltrant le muscle (TVIM)) et de 15 à 21 échantillons de tissu vésical normal provenant de patients opérés entre 2002 et 2007 pour lesquels nous disposons des données cliniques et de matériel tissulaire analysable (prélèvements cryopréservés et fixés en formol).

L'analyse des mutations de l'ADN a porté sur les gènes *HRAS*, *FGFR3* et *PIK3CA* par technique *HRM* puis séquençage. L'expression des transcrits (ARNm) de 29 oncogènes candidats et de 33 gènes de l'immunité anti-tumorale a été évaluée par RT-PCR quantitative en temps réel. L'analyse de l'expression protéique a été effectuée en immunohistochimie sur pleines lames (PD-1, PD-L1,

CD8 et FOXP3) ou sur lames de *Tissue-Micro-Array (TMA)* (RXRA, FGFR3 et CCNE1). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SEM.

Résultats

Concernant les mutations ADN, 3 (2,9%) échantillons tumoraux étaient mutés pour *HRAS*, 28 (27.2%) pour *FGFR3* et 18 (14,2%) pour *PIK3CA*.

Concernant l'expression des gènes tumoraux et de l'immunité, pour les TVNIM, une analyse multivariée a permis d'identifier *RXRA*, *FGFR3*, le ratio *FOXP3/CD8* et *OX40L* comme facteurs pronostiques indépendants significativement corrélés à la survie sans récurrence ($p=0,0022$, $p=0,0069$, $p=0,016$ et $p=0,0039$ respectivement) et *RXRA* comme facteur pronostique indépendant associé à la survie sans progression vers l'infiltration du muscle ($p=0,0068$). Une signature d'expression des gènes *RXRA*, *FGFR3* et *CCNE1* a été identifiée comme facteur pronostique indépendant aussi bien en termes de survie sans récurrence qu'en termes de survie sans progression vers l'infiltration du muscle ($p=0,04$ et $p=0,047$ respectivement). Seule l'expression de *FGFR3* était corrélée à la réponse au traitement par BCG ($p=0,037$).

Pour les TVIM, une analyse multivariée a permis d'identifier la surexpression d'*ERCC2* comme étant un facteur pronostique indépendant significativement corrélé à la survie sans récurrence ($p=0,0011$) et *EGFR* et *E2F3* comme étant des facteurs pronostiques indépendants significativement corrélés à la survie globale ($p=0,035$ et $p=0,014$ respectivement). Une signature d'expression des gènes *OX40L*, *CD8* et *TIGIT* a été identifiée comme facteur pronostique indépendant aussi bien en termes de survie sans récurrence qu'en termes de survie globale ($p=0,0007$ et $p=0,007$ respectivement).

Il y avait une association significative entre l'expression des gènes (ARNm) et protéique (immunohistochimie) pour *FGFR3*, *PD-1*, *PD-L1*, *CD8* et *FOXP3* ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$ et $p=0,00000016$ et $p=0,00000093$ respectivement).

Conclusion

Notre étude a permis d'identifier des facteurs pronostiques différents dans les TVNIM et les TVIM. Dans les TVNIM, il s'agit de gènes liés à la cellule tumorale, dans les TVIM de gènes liés à l'environnement immunitaire. Ceci confirme la nécessité d'une prise en charge thérapeutique différente basée sur la biologie de la tumeur.

Mots-clés : cancer de vessie ; mutations ; qRT-PCR; immunohistochimie ;
marqueur moléculaire ; pronostic

ABSTRACT

Introduction

Bladder cancer is the sixth higher cause of cancer death in France. The lack of individual prognostic factors encourages the search for new theranostic markers also allowing to identify therapeutic targets. The genome-wide analyzes, like those of The Cancer Genome Atlas (TCGA), allow to identify new genomic alterations that could be potential biomarkers. The emergence of immune-targeting immunotherapy (ICI) PD-1/PD-L1/CTLA4 has led to pan-cancer therapeutic trials sometimes oriented by the expression of PD-1/PD-L1 and CTLA4 and their ligands. Regarding bladder cancer, immunotherapy is an old-fashioned approach with intra-vesical BCGtherapy for non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC). ICI give very good results in bladder cancer but there is no clear identification of predictive markers of response, whether in the expression of PD-L1, mutational load assessment or molecular classifications.

Our work is set in this situational analysis. We wanted to study the involvement of the immune environment and its link with oncogenic alterations and to correlate those results with the prognosis and the response to the treatment by BCGtherapy.

Material and general methodology

Our cohort consisted of 127 to 155 tumor specimens (60/71 NMIBC and 67/84 muscle-invasive bladder cancer (MIBC)) and 15/21 samples of normal bladder tissue from patients who received surgery between 2002 and 2007 for whom we established clinical data and analysable tissue material (cryopreserved and formalin-fixed specimens).

The analysis of DNA mutations dealt with the *HRAS*, *FGFR3* and *PIK3CA* genes by HRM technique then sequencing. Transcript expression (mRNA) of 29 candidate oncogenes and 33 genes of anti-tumor immunity were evaluated by real time quantitative RT-PCR. The analysis of protein expression was performed in immunohistochemistry on full slides (PD-1, PD-L1, CD8 and FOXP3) or Tissue-Micro-Array (TMA) slides (RXRA, CCNE1 and FGFR3). The statistical analysis was performed using the SEM software.

Results

Regarding DNA mutations, 3 tumor samples (2.9%) were mutated for *HRAS*, 28 (27.2%) for *FGFR3* and 18 (14.2%) for *PIK3CA*.

Regarding the expression of tumor genes and immunity, for NMIBC, a multivariate analysis enabled to identify *RXRA*, *FGFR3*, the *FOXP3/CD8* ratio and *OX40L* as independent prognostic factors significantly correlated with recurrence-free survival ($p=0.0022$, $p=0.0069$, $p=0.016$ and $p=0.0039$ respectively) and *RXRA* as an independent prognostic factor associated with progression-free survival to muscle infiltration ($p=0.0068$). An expression signature composed of *RXRA*, *FGFR3* and *CCNE1* has been identified as an independent prognostic factor in terms of both recurrence-free and progression-free survival to muscle infiltration ($p=0.04$ and $p=0.047$ respectively). Only alone the expression of *FGFR3* was correlated with response to BCG treatment ($p=0.037$).

For MIBC, a multivariate analysis enabled to identify overexpression of *ERCC2* as an independent prognostic factor significantly correlated with recurrence-free survival ($p=0.0011$) and *EGFR* and *E2F3* as independent prognostic factors significantly correlated with overall survival ($p=0.035$ and $p=0.014$ respectively). An expression signature composed of *OX40L*, *CD8* and *TIGIT* was identified as an independent prognostic factor in terms of both recurrence-free and overall survival ($p=0.0007$ and $p=0.007$ respectively).

There was a significant association between gene expression (mRNA) and protein (immunohistochemistry) for *FGFR3*, *PD-1*, *PD-L1*, *CD8* and *FOXP3* ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$ and $p=0.00000016$ and $p=0.00000093$ respectively).

Conclusion

Our study enabled to identify different prognostic factors in NMIBC and MIBC. In NMIBC, these are genes linked to the tumor cell, in MIBC these are genes related to the immune environment. This confirms the need for different therapeutic management based on tumor biology.

Key words: bladder cancer; DNA mutations; reverse transcription-PCR; immunohistochemistry; molecular marker; prognosis

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
AKT	AKT serine/threonine kinase 1
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARID1A	AT-rich interaction domain 1A
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BCG	Bacille de Calmette-Guérin
CCAFU	Comité de Cancérologie de l'Association Française d'Urologie
CCNE1	Cyclin E1
CDK2	Cyclin dependent kinase 2
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2B	Cyclin dependent kinase inhibitor 2B
CGH	Comparative Genomic Hybridization
Cis	Carcinome in situ (autre dénomination : Tis)
COX2	Cyclooxygenase 2b
Ct	Cycle threshold
Cp	Cycle point
CREBBP	CREB binding protein
dbEST	DatabaseEST
DIP2B	Disco interacting protein 2
E2F3	E2F transcription factor 3
E-cad	E-cadhérines
EGF	Epidermal growth factor
ERCC2	ERCC excision repair 2
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
G	Grade
HES	Hemalun Eosine Safran

HRM	High Resolution Melting
IHC	Immunohistochimie
IPC	Institut Paoli-Calmettes
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase 7
Mb	Mégabase
MIBC	Muscle-invasive bladder cancer
mTOR	mechanistic target of rapamycin
N+	Présence de métastase(s) ganglionnaire(s)
N-cad	N-cadhérines
NCOR1	Nuclear receptor corepressor 1
NMIBC	Non muscle-invasive bladder cancer
nr	Non-redundant GenBank
OS	Overall survival (iSurvie globale)
PFS	Progression-free survival (Survie sans progression vers l'infiltration du muscle)
TP53	Tumor protein p53 gene
PCR	Polymérase Chain Reaction
RFS	Recurrence-free survival (Survie sans récidence)
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
RTUV	Résection trans-urétrale de vessie
RXRA	Retinoid X receptor alpha
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
TBP	TATA box Binding Protein
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMA	Tissue-Micro-Array
Treg	Lymphocytes T régulateurs
TVIM	Tumeur de vessie infiltrant le muscle
TNM	Classification UICC : Tumor, Node, Metastasis
TVNIM	Tumeur de vessie non infiltrant le muscle
TVN	Tissu vésical normal
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

I. HISTORIQUE ET EPIDEMIOLOGIE DU CANCER DE LA VESSIE

La première description d'un polype de la vessie a été faite lors d'une taille vésicale pour calcul par Fabrice de Hilden en 1620. Cependant, la première description complète de la clinique des tumeurs de vessie a été celle réalisée par J-C-Félix Guyon en 1884. Son analyse de 13 observations a été l'objet des leçons publiées par fragments dans les « Annales des maladies des organes génitaux urinaires ». Les travaux de Guyon ont défini les bases des connaissances anatomopathologiques des tumeurs de vessie en apportant la notion d'infiltration de la paroi vésicale par la tumeur et en montrant que cette notion était en rapport direct avec l'évolution et le pronostic. Pathologie rare au début du XX^{ème} siècle, le cancer de la vessie est devenu avec l'industrialisation des pays occidentaux une problématique de santé publique. Avec 430 000 cas diagnostiqués dans le monde¹, le cancer de vessie est responsable de 150 000 décès par an. En France, 11 000 nouveaux cas de cancers de vessie sont diagnostiqués chaque année, principalement des carcinomes à cellules transitionnelles (également appelés carcinomes urothéliaux), et il représente la 6^{ème} cause de mortalité par cancer avec 4500 décès par an, soit 3% des décès par cancer. Il prédomine nettement chez l'homme (sex-ratio proche de 5). Son incidence a augmenté de plus de 25% chez l'homme et de plus de 9% chez la femme durant les 30 dernières années². L'explication de cette évolution épidémiologique repose principalement sur les facteurs de risques

environnementaux que sont le tabagisme, avec un effet carcinogène dose-dépendant, et les carcinogènes industriels (amines aromatiques, hydrocarbures aromatiques polycycliques)³. L'action des carcinogènes au contact des cellules urothéliales se traduit par l'accumulation d'un nombre croissant de mutations au fur et à mesure que l'exposition se prolonge. Ces mutations confèrent aux cellules urothéliales des propriétés d'invasivité, l'aptitude à la croissance hétérotopique et à l'autocrinie. Les tumeurs de vessie progressent ainsi en envahissant les différentes structures sous-jacentes à l'urothélium.

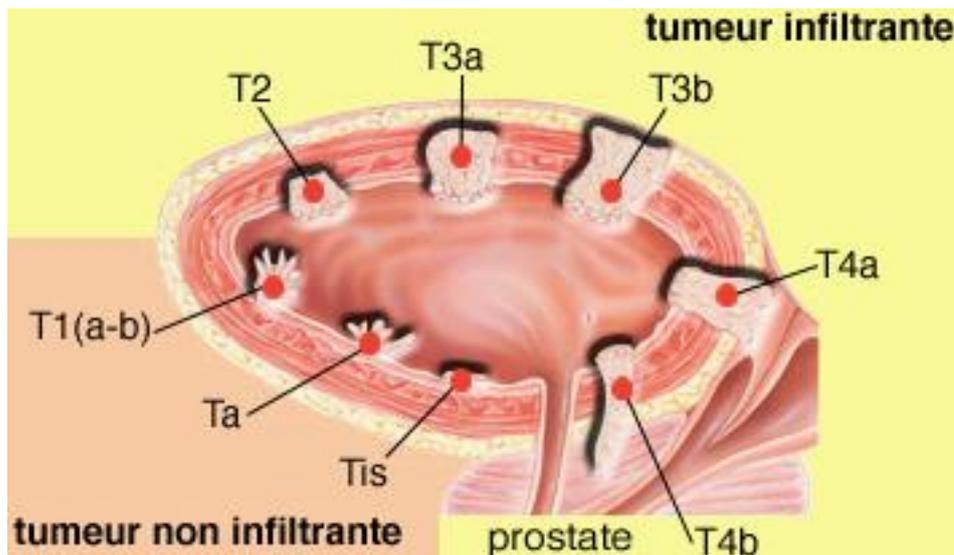
II. CLASSIFICATION *TNM* DES TUMEURS DE VESSIE

Le pronostic reste largement corrélé au stade et au degré de différenciation de ces tumeurs. La classification *TNM* du cancer de vessie a progressivement été affinée pour correspondre au mieux au pronostic des tumeurs de vessie. La classification actuelle est celle de l'*AJCC* 2009⁴ (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Classification *TNM* (2009)

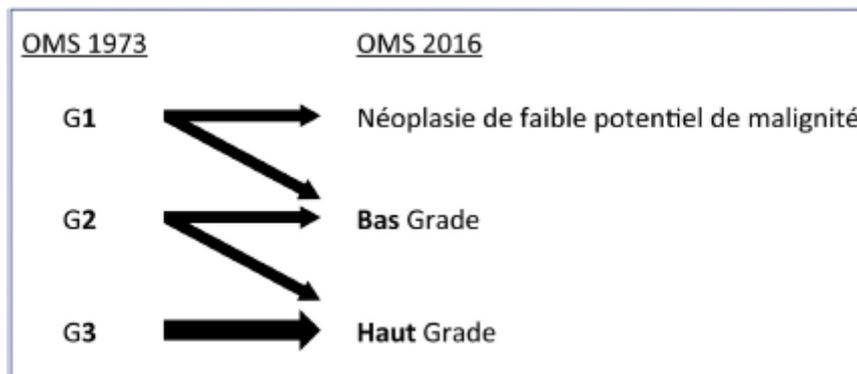
T = tumeur primitive	Tx	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
	T0	Pas de signe de tumeur primitive
	Ta	Carcinome de type papillaire non infiltrant
	Tis (=Cis)	Carcinome <i>in situ</i>
	T1	Tumeur envahissant le tissu conjonctif sous-épithélial
	T2 • T2a • T2b	Tumeur envahissant la musculature Tumeur envahissant la musculature superficielle (moitié interne) Tumeur envahissant la musculature profonde (moitié externe)
	T3 • T3a • T3b	Tumeur envahissant le tissu péri-vésical Atteinte microscopique Atteinte macroscopique (masse extra-vésicale)
T4 • T4a • T4b	Tumeur envahissant les organes ou structures de voisinage Prostate, vésicules séminales, vagin ou utérus Paroi pelvienne ou paroi abdominale	
N = ganglions lymphatiques régionaux	Nx	Renseignements insuffisants pour classer l'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux
	N0	Pas d'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux
	N1	Atteinte d'un seul ganglion lymphatique pelvien
	N2	Atteinte de multiples ganglions lymphatiques pelviens
	N3	Atteinte d'un (ou plusieurs) ganglion(s) lymphatique(s) iliaque(s) primitif(s)
M = métastases à distance	Mx	Métastases à distance non évaluables
	M0	Absence de métastase à distance
	M1	Présence de métastase(s) à distance

Figure 1 : Représentation des tumeurs de vessie selon le stade T



Dans les années 1970, parallèlement aux progrès scientifiques permettant d'appréhender les mécanismes de la progression des tumeurs de vessie, une classification histologique en 3 grades est proposée par l'OMS⁵ pour permettre de regrouper les cellules cancéreuses selon une estimation de la rapidité de la croissance tumorale, basée sur l'étude microscopique des caractéristiques des cellules. Cette classification a fait l'objet de révisions une première fois en 2004^{6,7} ; la version publiée en 2016 est celle dont l'usage est actuellement recommandé en anatomopathologie⁸ (**Figure 2**).

Figure 2 : Grade des tumeurs de vessie d'après les recommandations du CCAFU⁸



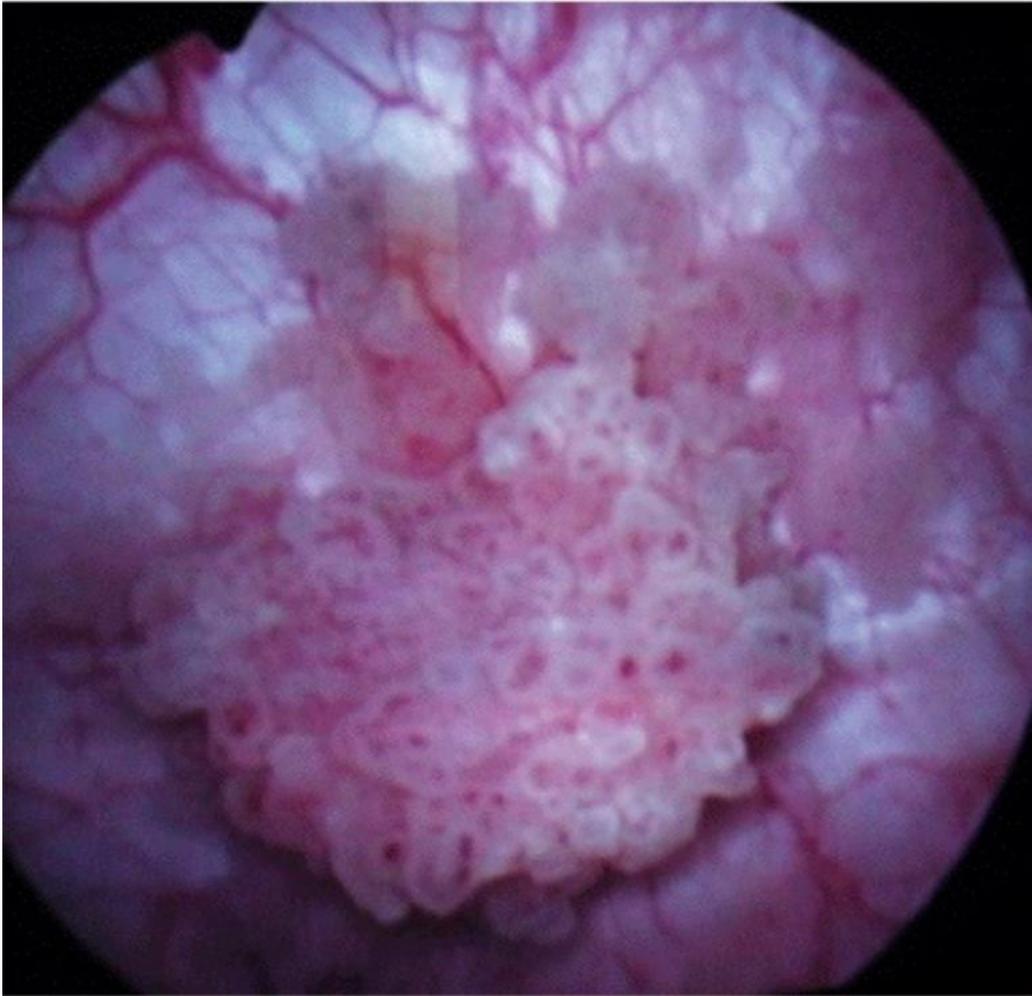
III. PRISE EN CHARGE DES TUMEURS DE VESSIE

Actuellement, leur traitement est basé sur la distinction entre les tumeurs de vessie non infiltrant le muscle (TVNIM) et les tumeurs de vessie infiltrant le muscle (TVIM).

III. 1. PRISE EN CHARGE DES TVNIM

Les études épidémiologiques rapportent que, dans les pays occidentaux, 70% des nouveaux cas de tumeur de vessie sont diagnostiqués au stade de TVNIM (50% pTa, 20% pT1)⁹. Les TVNIM peuvent avoir deux évolutions différentes qui peuvent s'associer : récurrence sur le mode non infiltrant et progression vers une tumeur infiltrant le muscle. Les principaux facteurs prédictifs concernant la récurrence sont le nombre de tumeurs et leur taille. Ceux concernant la progression vers l'infiltration du muscle sont le stade T, le grade et la présence de Cis associé. La majorité des TVNIM (80%) est bien différenciée et de bas grade. Le pronostic est alors favorable avec un risque de récurrence à 5 ans d'environ 31%, de progression à 5 ans de 1% et de décès spécifique à 10 ans de l'ordre de 5 à 12%¹⁰. A l'inverse, les TVNIM de haut grade et de stade élevé (pT1) ou le Cis, sont de plus mauvais pronostic. Le risque de récurrence à 5 ans peut aller jusqu'à 78%, le risque de progression à 5 ans est alors de 45% et le risque de décès spécifique à 10 ans de 36%. Les TVNIM sont traitées par résection trans-urétrale endoscopique de vessie (résection du polype tumoral par les voies naturelles).

Figure 3 : Vue endoscopique d'une tumeur de vessie



Figures 4 : Résection trans-urétrale de vessie

Figure 4a : Représentation d'une résection trans-urétrale de vessie

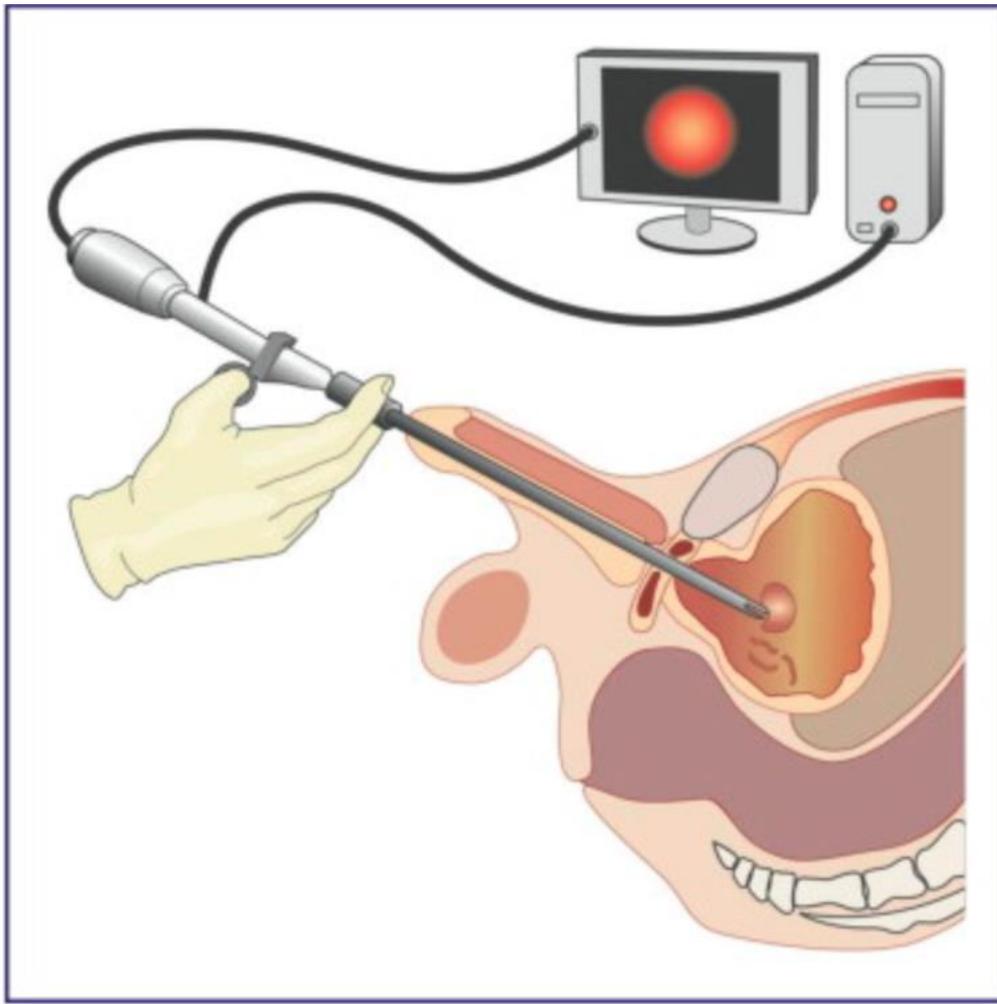
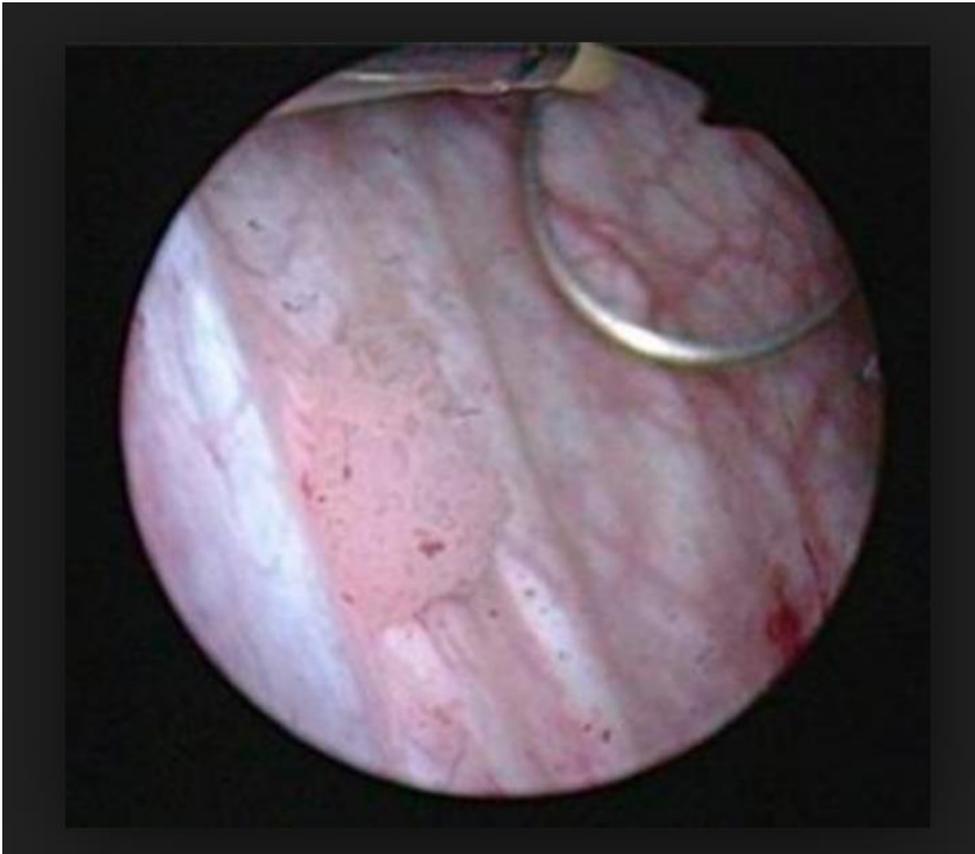
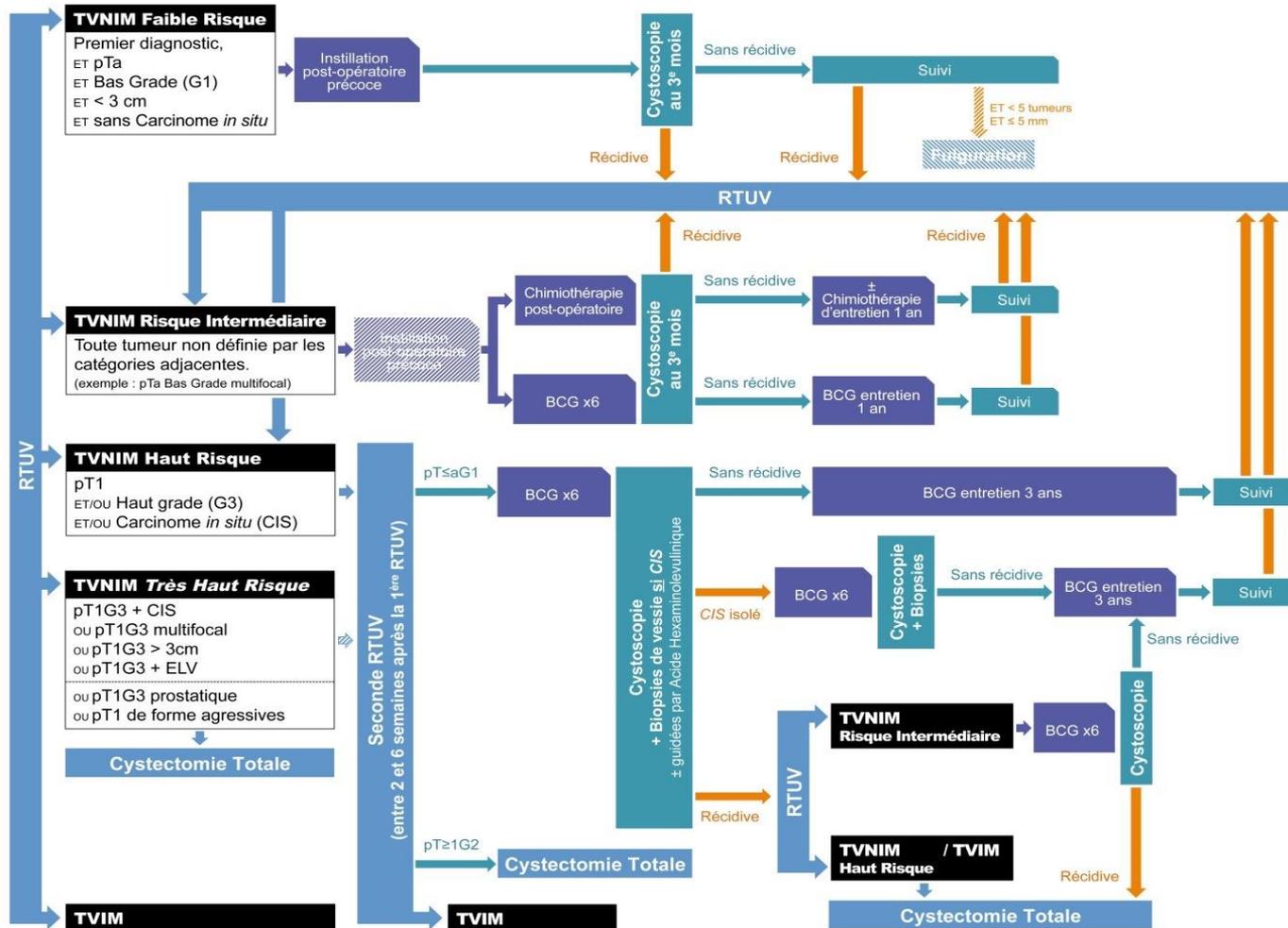


Figure 4b : Vue endoscopique d'une anse de résecteur



Afin de réduire le risque de récurrence ou d'évolution vers l'infiltration du muscle, un traitement adjuvant par instillations endo-vésicales de mitomycine C ou BCG est pratiqué dans certains cas¹⁰. Dans d'autres cas, une cystectomie peut être proposée pour ces TVNIM. Les propositions thérapeutiques sont adaptées aux risques de récurrence et de progression.

Figure 5 : Algorithme de prise en charge des TVNIM d'après les recommandations du CCAFU⁸



III. 2. PRISE EN CHARGE DES TVIM

Elles représentent 30 % des cas au diagnostic. Celles-ci peuvent résulter de l'évolution d'une TVNIM mais, le plus souvent, il s'agit de tumeurs infiltrant le muscle d'emblée. Elles sont métastatiques d'emblée au diagnostic dans 7% des cas. La survie à 5 ans est de l'ordre de 80% si la tumeur ne dépasse pas le plan musculaire (\leq pT2b). Elle chute à moins de 30% en cas d'atteinte de la graisse péri-vésicale (pT3) et à environ 5% lorsqu'il existe des métastases (N+, M+)¹¹.

L'arsenal thérapeutique concernant ces tumeurs comporte notamment la chirurgie et la chimiothérapie et plus rarement la radiothérapie dans le cadre d'une radio-chimiothérapie concomitante.

L'exérèse chirurgicale (cystoprostatectomie chez l'homme, pelvectomie antérieure chez la femme) avec dérivation urinaire associée à un curage ganglionnaire est la pierre angulaire du traitement. Elle est proposée pour les patients opérables, c'est-à-dire porteurs d'une tumeur extirpable avec un état général compatible avec cette chirurgie¹². Cependant, les données pronostiques des TVIM opérées restent décevantes, hypothétiquement à cause de micro-métastases non traitées par la chirurgie. Ce sont ces micro-métastases que vise à éradiquer la chimiothérapie néo-adjuvante proposée avant cystectomie totale. Dans la littérature, des études, dont 2 randomisées de grande envergure, ont montré l'impact de la chimiothérapie néo-adjuvante à base de cisplatine sur la survie^{13,14}. Cette chimiothérapie à base de cisplatine ne peut être délivrée que si la fonction rénale et l'état général du patient sont satisfaisants. Le traitement par chimiothérapie adjuvante réalisé après la cystectomie a pour objectif de compléter une chirurgie qui n'aurait pas été microscopiquement complète et de prolonger la survie du patient. Peu d'études randomisées ont évalué l'intérêt

d'une chimiothérapie adjuvante et toutes ont été limitées à de petites cohortes. Au vu de l'ensemble de ces études¹⁴⁻¹⁷, la chimiothérapie adjuvante peut être indiquée en cas de tumeur à haut risque de récurrence sur les données de l'analyse anatomopathologique, notamment en cas de stades pT3 ou pT4, du statut ganglionnaire N+ et des marges chirurgicales positives. A l'instar de la chimiothérapie néo-adjuvante, cette chimiothérapie adjuvante ne peut pas être réalisée si la fonction rénale est altérée ou si l'état général du patient ne le permet pas sachant qu'environ 30% des patients ne sont pas en état de recevoir cette chimiothérapie en raison des complications post-opératoires¹⁸.

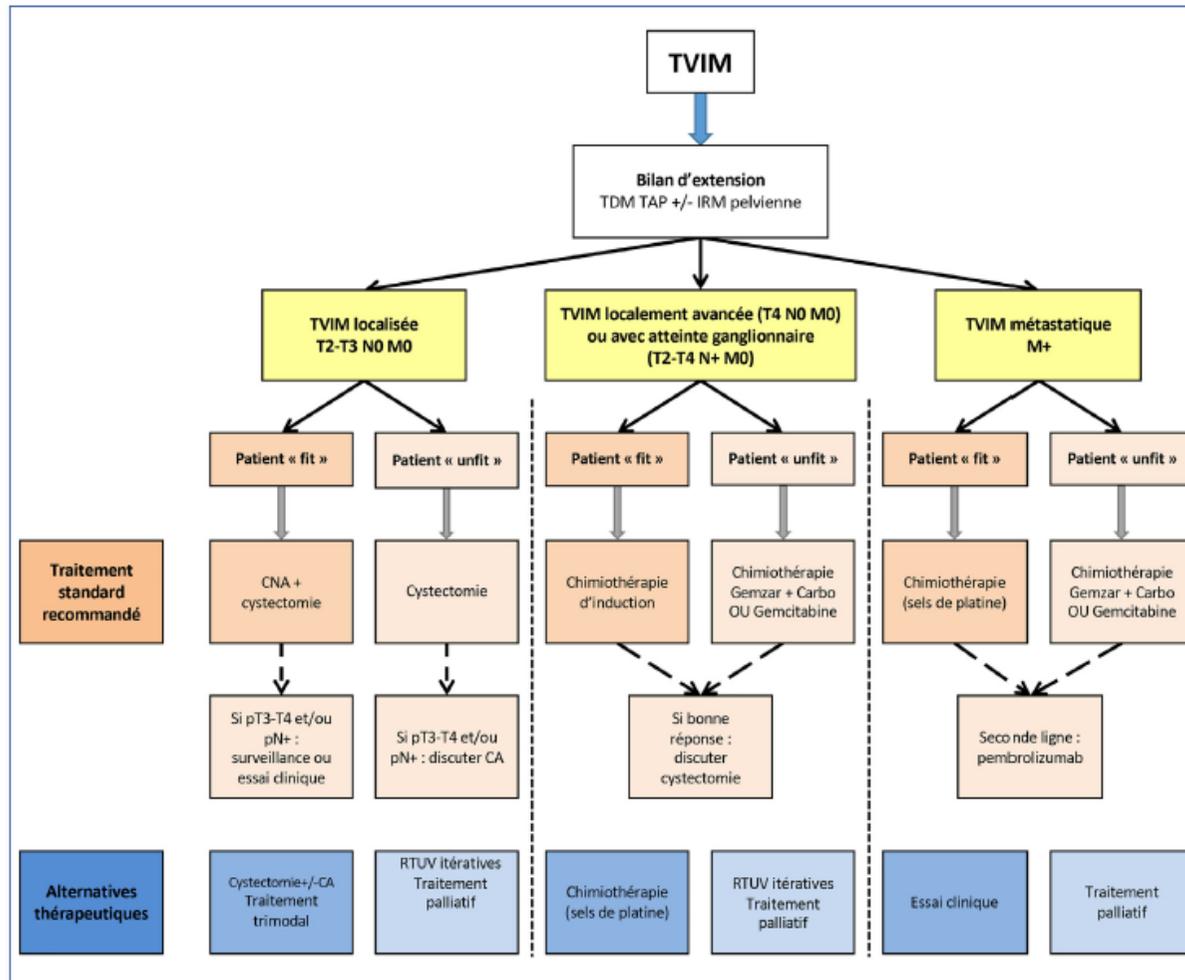
Pour les TVIM localement avancées (pT4) ou lorsqu'il y a un doute sur un envahissement ganglionnaire (N+), on considère que le patient n'est pas opérable d'emblée. Il est alors préconisé de réaliser une chimiothérapie première dite d'« induction » à base de cisplatine avec les mêmes contraintes que pour le traitement néo-adjuvant (état général et fonction rénale satisfaisants)^{19,20}. Elle vise à obtenir l'opérabilité du malade mais son bénéfice potentiel ne peut être extrapolé à partir des études concernant la chimiothérapie néo-adjuvante réalisée chez des patients d'emblée opérables. Au total, il n'existe pas de protocole exact sur le traitement des TVIM localement avancées ou N+ ni sur la conduite à tenir après la chimiothérapie d'induction. Le CCAFU propose de réaliser une cystectomie totale complémentaire si la réponse à la chimiothérapie première est jugée satisfaisante sur le scanner de réévaluation⁸.

Quel que soit le stade auquel elle est prescrite pour traiter les TVIM, la chimiothérapie à base de cisplatine est admise comme étant la référence^{21,22}. Les traitements chimiothérapiques proposés pour les TVIM métastatiques ne permettent d'obtenir que de faibles taux de réponse (inférieurs à 30%).

Dans un essai de phase III, l'immunothérapie par pembrolizumab a démontré un bénéfice en survie globale chez les patients métastatiques en 2e ligne après chimiothérapie²³. Il vient d'obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) et est en attente du remboursement qui permettra son utilisation dans cette indication.

Le Comité de Cancérologie de l'Association Française d'Urologie (CCAFU) propose un algorithme de prise en charge pour les TVIM⁸.

Figure 6 : Algorithme de prise en charge des TVIM d'après les recommandations du CCAFU⁸



IV. CARCINOGENESE UROTHELIALE

IV.1. SCHEMA HISTORIQUE DE WU

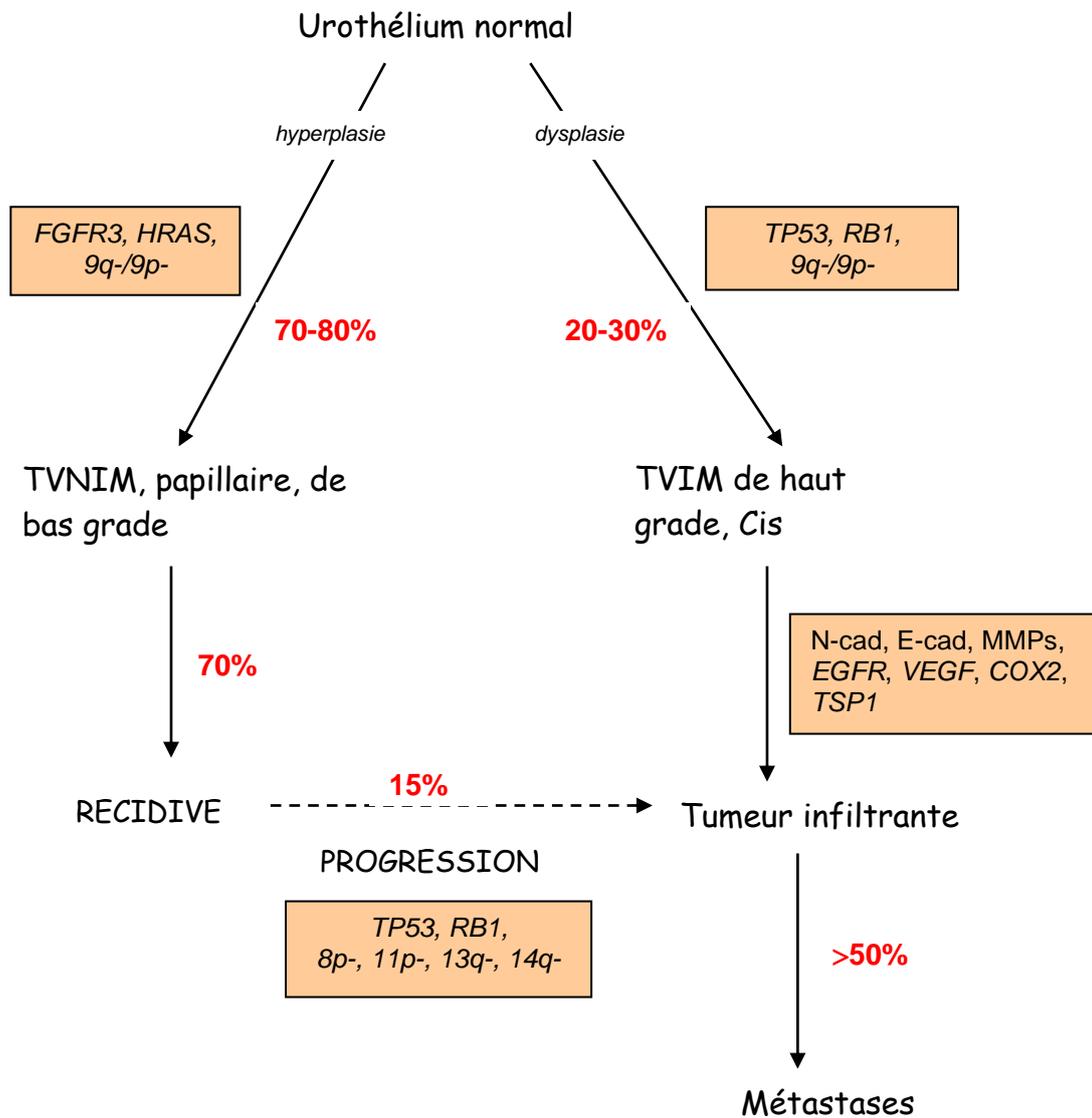
Historiquement, le modèle de progression des carcinomes urothéliaux suggérait que l'oncogenèse pourrait se faire selon 2 voies moléculaires distinctes, caractérisées par des altérations génétiques et épigénétiques, aboutissant à des tumeurs différentes dans leurs aspects histopathologiques et dans leur potentiel évolutif (**Figure 7**).

La première voie (gauche de la figure 7) est celle de l'hyperplasie papillaire. Les tumeurs qui en résultent sont papillaires, non infiltrant le muscle et de bas grade. Environ 70% de ces tumeurs récidiveront au cours de leur évolution mais seulement 15% évolueront vers l'infiltration du muscle vésical. Ces tumeurs présentent dans 30 à 40% des cas des mutations au niveau du gène *HRAS* et dans 70% des cas au niveau du gène *FGFR3*.

La 2^{ème} voie de signalisation (droite de la figure 7) correspond à celle des tumeurs invasives et de haut grade. Le Cis et la dysplasie sévère peuvent faire le lit de ces tumeurs. Plus de la moitié de ces tumeurs comportent des anomalies structurelles et fonctionnelles des gènes suppresseurs de tumeurs *TP53* et/ou *RB1* ainsi que des délétions au niveau du chromosome 9²⁴. L'invasion et le potentiel métastatique résultent, entre autres, de l'altération de différents facteurs du micro-environnement tumoral.

Figure 7 : Les 2 voies de signalisation de la carcinogénèse urothéliale

Reproduit d'après Wu X-R. : « *Urothelial tumorigenesis : a tale of divergent pathways* »²⁵



VI.2. DONNEES DU TCGA (*The Cancer Genome Atlas*)

Le développement de la biologie moléculaire appliquée aux tumeurs a permis la mise en évidence des altérations génétiques (et épigénétiques) somatiques dans les tumeurs de vessie et a été une étape essentielle vers la compréhension des mécanismes moléculaires de la carcinogénèse vésicale. Le nombre d'altérations génomiques semble particulièrement important, les tumeurs vésicales arrivant en 3^{ème} position en termes de taux de mutations (environ 7,7 par Mégabase) après

les mélanomes (10/Mb) et les cancers du poumon (8/Mb). Récemment, les données d'analyses pangénomiques, comme celles du *TCGA* ont permis d'identifier, au sein des TVIM, de nouvelles altérations génomiques potentiellement utilisables comme marqueurs en cancérologie clinique²⁶⁻³⁰. En effet, certaines pourraient être utiles aux évaluations diagnostiques et pronostiques, à l'appréciation de la réponse au traitement et ouvrent actuellement la voie vers de nouvelles approches thérapeutiques³¹⁻³⁴. Cependant, l'étude du *TCGA* en 2015 ne portait que sur les TVIM et il n'existe que peu de données comparatives entre TVNIM et TVIM, la littérature concernant ces altérations dans les TVNIM étant pauvre, probablement en raison des contraintes associées aux procédures d'échantillonnage inhérentes aux TVNIM.

✓ **Délétions et mutations activatrices / Gènes suppresseurs de tumeur**

Selon l'analyse du *TCGA* sur des TVIM, 30 régions ont été identifiées comme porteuses de délétions focales. Parmi celles-ci, les délétions sur le chromosome 9 sont les remaniements génétiques les plus fréquents dans les tumeurs de vessie et sont mises en évidence dès les premiers stades et grades des carcinomes urothéliaux. Au niveau du bras long du chromosome 9, plusieurs régions (9q21, 9q22, 9q31, 9q33, 9q34) sont candidates pour contenir des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans l'oncogenèse vésicale. La région 9q34 par exemple contient le gène suppresseur de tumeurs *TSC1* (*tuberous sclerosis gene 1*) qui régule négativement la voie anti-apoptotique AKT/mTOR. Le bras court du chromosome 9 et plus particulièrement le locus 9p21 est aussi une région importante. En effet, il contient des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, en particulier les gènes *CDKN2A* et *CDKN2B*, qui codent pour des protéines inhibitrices du cycle cellulaire (p14, p15 et p16). Ce locus 9p21

serait délété dans près de 47% des tumeurs de vessie infiltrantes, selon les données du *Cancer Genome Atlas*²⁶.

Parmi les autres régions fréquemment délétées, on peut noter :

- le bras court du chromosome 8 (8p), avec plusieurs gènes potentiellement candidats : le gène *EXTL3* (*exostoses like 3 gene*), le gène *PRLTS* (*PDGF receptor beta like tumor suppressor*), et le gène *WRN* (*WRN RecQ like helicase*) codant pour une hélicase et dont les mutations germinales sont responsables du syndrome de Werner, caractérisé par un vieillissement accéléré et la prédisposition à de nombreux cancers.
- la région 13q14.2 contenant le gène *RB1* et également muté dans 13% des cas.
- plusieurs régions contenant des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la régulation du remodelage de la chromatine : la région 1p36.11 avec le gène *ARID1A*, la région 16p13.3 avec le gène *CREBBP*, la région 17p12 avec le gène *NCOR1*.
- la région 17p13.1 contenant le gène *TP53* et également mutée dans 20 à 50% des cas³⁴.
- les régions 2q22.1 (contenant le gène *LRP1B*), 2q34 (contenant le gène *IKZF2*), 3p14.2 (contenant le gène *FHIT*) ou bien encore 6p25.3 (contenant le gène *FOXQ1*).

Plus récemment, les analyses par séquençage d'exomes ou de génomes entiers, ont permis d'identifier de nouveaux gènes suppresseurs de tumeurs montrant de forts taux de mutations et intervenant majoritairement dans les mécanismes de régulation épigénétique, notamment dans le remodelage de la chromatine, et jusqu'alors inconnus dans la carcinogénèse urothéliale vésicale : *KDM6A* (*UTX*), *CREBBP*, *EP300*, *ARID1A*, mais aussi *CHD6*, *MLL*, *NCOR1*, *MLL2* et *MLL3*.

✓ Gains de matériel et mutations activatrices / Oncogènes

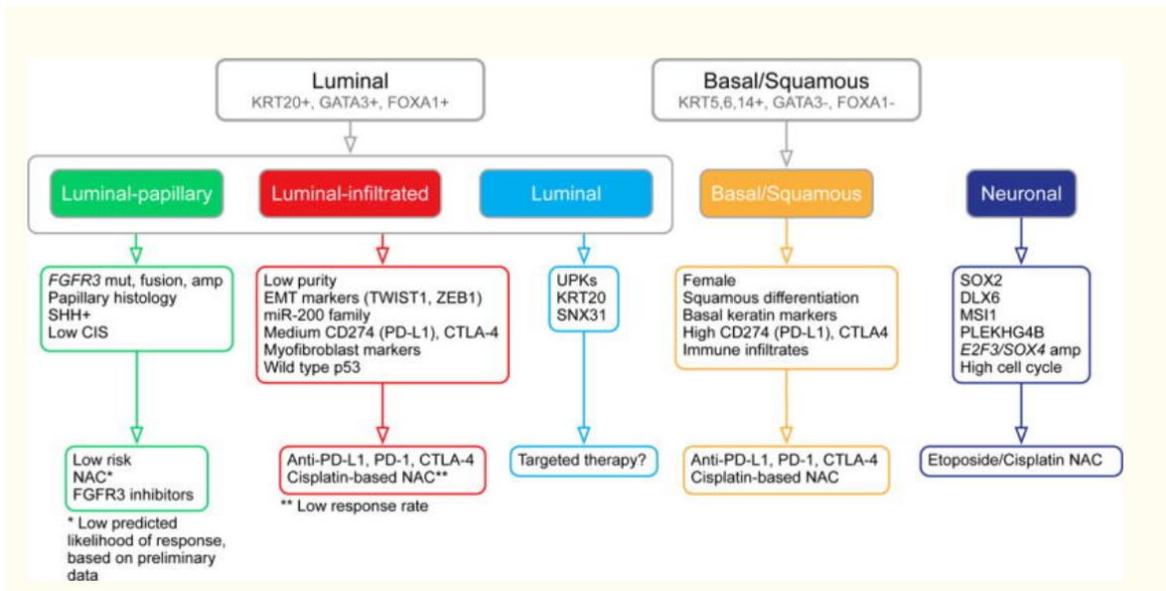
Contrairement à ce que l'on pensait jusqu'alors, les amplifications géniques focales et récurrentes ne sont pas des événements rares dans les carcinomes urothéliaux de vessie. En effet, les données du *TCGA* ont permis d'identifier 27 régions amplifiées²⁶. Parmi les amplifications géniques mises en évidence dans les TVIM, celles touchant le chromosome 7 sont d'une particulière importance car ciblant l'oncogène *EGFR* codant pour le récepteur de l'*EGF*. Ce récepteur est parfois surexprimé dans les cancers de vessie et le gène est retrouvé amplifié dans 11% des cas³⁵. De même, au niveau du chromosome 17, un des gènes candidats est l'oncogène *HER2* codant pour un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase apparenté aux récepteurs de l'*EGF*. Ce gène localisé dans la bande 17q12 est amplifié dans plusieurs cancers, notamment dans le cancer du sein et de la vessie³⁶. Si les amplifications sont retrouvées dans 7% des cas, il semble également exister d'autres mécanismes d'activation comme des mutations « gain de fonction » retrouvées dans 5% des cas et de rares translocations impliquant *DIP2B* (4%). Enfin, des mutations activatrices d'*ERBB3* sont également décrites dans 8 à 11% des cancers de vessie²⁶⁻²⁸, ouvrant de nouvelles perspectives thérapeutiques. Les données de l'analyse pangénomique du *Cancer Genome Atlas* ont permis de mettre en évidence de nouveaux oncogènes potentiellement impliqués dans la carcinogénèse vésicale puisque présentant des mutations activatrices (*ERCC2* (12%), *RXRA* (9%), *ELF3* (8%), *KLF5* (8%), *CCND3* (4%)) ou des amplifications récurrentes (*CCNE1* (12%), *CCND1* (10%), *MDM2* (8%), *PVRL4* (19%), *PPARG* (17%), *BCL2L1* (11%), *ZNF703* (10%))²⁶. Au final, l'analyse intégrée des différentes altérations génétiques décrites au sein du *TCGA* a permis d'identifier 3 principales voies de

signalisation dérégulées dans les tumeurs de vessie et potentielles cibles thérapeutiques privilégiées. Les dérégulations affectant le cycle cellulaire sont retrouvées dans 93% des cas ; celles affectant la voie PIKCA3/AKT/mTOR dans 72% des cas ; et enfin les altérations de gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine dans 64% des cas²⁶.

VI.3. CLASSIFICATIONS MOLECULAIRES

Même si elles ne sont pas encore utilisées en pratique quotidienne pour guider la prise en charge, des classifications moléculaires intégrant une partie des marqueurs anciennement et nouvellement étudiés, voient le jour afin de pouvoir proposer au patient la prise en charge la plus personnalisée et efficace possible. L'équipe française de Radvanyi à l'Institut Curie³¹ ainsi que celles de Hedegaard dans les TVNIM³⁷ et Choi dans les TVIM³⁸, ont mis en évidence des sous-groupes moléculaires, ressemblant à ceux du TCGA, et ayant un impact pronostique mais probablement aussi prédictif de la réponse au traitement. En effet, le sous-groupe « *luminal* » *p53* like (*p53* + *p16*) et surexprimant *FGFR3* répondrait mieux aux immunothérapies alors que le groupe « *basal-like* » surexprimant *EGFR* aurait un mauvais pronostic mais serait meilleur répondeur à la chimiothérapie. Les classifications s'affinent avec le temps. Récemment, l'équipe de Roberston en a proposé une pour guider la prise en charge des TVIM³⁹.

Figure 8 : Algorithme de prise en charge des TVIM selon Robertson et al.



V. CANCER DE VESSIE ET IMMUNOTHERAPIE

Le manque de facteurs pronostiques individuels à l'heure actuelle pousse à chercher de nouveaux marqueurs qui pourraient aussi servir de cibles thérapeutiques. Le paysage des cancers de vessie pourrait être modifié par l'émergence de nouvelles thérapies, avec l'immunothérapie qui constitue la plus prometteuse d'entre elles^{40,41}.

La surexpression de PD-1 et de ses ligands PD-L1 et PD-L2 sur les cellules immunitaires et sur les cellules épithéliales respectivement, a été mise en évidence dans plusieurs cancers. La voie du CTLA4 a aussi été décrite comme surexprimée dans plusieurs cancers et semble jouer un rôle clé dans la co-inhibition des lymphocytes T⁴². Les essais cliniques utilisant les anti-PD-1, anti-PD-L1 et anti-CTLA4 ont montré des réponses impressionnantes notamment dans les mélanomes, le cancer du poumon à petites cellules et le cancer du rein^{43,44}. Dans le cancer de vessie, l'immunothérapie est une approche déjà connue. En effet, avec l'exemple de la BCG-thérapie administrée en intra-vésical pour les TVNIM, le caractère immunogène de certaines tumeurs de vessie avait été mis en évidence²⁴, même si le mécanisme d'action de la BCG-thérapie n'est pas clairement élucidé^{45,46}. Plus récemment des thérapies bloquant des checkpoints de l'immunité (ICI) ont montré de très bons résultats dans le cancer de vessie⁴⁷ métastatique d'abord^{48,49} puis localisé en néo-adjuvant (essai PURE-01⁵⁰ et ABACUS).

Pour autant, nous avons besoin d'identifier de nouveaux biomarqueurs pronostiques et prédictifs de la réponse au traitement pour mieux guider nos prescriptions. Même si la surexpression de PD-1 et PD-L1 a été reportée dans le

cancer de vessie^{51,52}, son caractère pronostique et prédictif de la réponse au traitement reste controversé^{23,53-55}. Malgré les résultats prometteurs et les nombreuses études en cours, la prise en charge des tumeurs de vessie en pratique n'a que peu changé au cours des 30 dernières années. Si l'atezolizumab n'a pas pu prouver son bénéfice comparé à la chimiothérapie avec une survie globale de 8,6 mois sur une population non sélectionnée⁵⁶, les résultats du pembrolizumab sont positifs avec une survie globale de 10,3 mois versus 7,4 mois dans le bras chimiothérapie²³. Néanmoins seuls 25% des patients ont un bénéfice clinique à l'immunothérapie et si l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales ou dans le micro-environnement semble favoriser la réponse, il n'existe à ce jour aucun biomarqueur permettant de sélectionner les patients les plus susceptibles de répondre. De nombreux travaux sont en cours, notamment sur l'évaluation de la charge mutationnelle et les classifications moléculaires comme potentiels marqueurs prédictifs^{57,58}.

VI. RATIONNEL DU PROJET DE RECHERCHE

L'histoire naturelle des tumeurs vésicales fait apparaître un risque évolutif variable au sein d'un même stade tumoral, soulignant l'insuffisance des facteurs pronostiques classiquement reconnus que sont le stade, le grade de différenciation, la taille, la multifocalité tumorale, la fréquence des récurrences des tumeurs, la présence de carcinome *in situ* et le statut ganglionnaire¹⁰. A l'échelon individuel, ils ne donnent que peu de renseignements sur le potentiel évolutif d'une tumeur. A l'heure actuelle, on ne dispose pas de marqueur optimal reflétant le risque de progression tumorale. Pour les TVNIM, l'identification de nouveaux marqueurs pronostiques permettrait d'isoler celles qui, à même stade et grade, auraient un potentiel évolutif différent justifiant une surveillance accrue ou un traitement complémentaire éventuellement plus agressif d'emblée. Pour les TVIM, ces marqueurs permettraient d'identifier celles qui pourraient justifier d'un traitement adjuvant précoce. A ce jour, malgré les nombreux axes de recherche développés par différentes équipes, aucun marqueur moléculaire n'a pu remplacer ces critères histopronostiques usuels. La prise en charge des tumeurs de vessie n'a, en conséquence, que peu changé au cours des dernières années. L'objectif des études et essais actuels est de mettre en évidence de nouveaux marqueurs dont les anomalies seraient liées au pronostic et/ou à l'histoire naturelle de la maladie et pour lesquelles il existerait des drogues antagonistes spécifiques^{26,59,60}. Ceci permettrait non seulement l'émergence de nouvelles thérapies ciblées, mais également l'identification de marqueurs moléculaires prédictifs de la réponse au traitement.

VII. TRAVAUX DE MASTER 2 (M2)

La prise en charge du cancer de la vessie nécessite une connaissance plus approfondie des cellules tumorales et de leur environnement immunitaire afin de mieux prédire le pronostic et proposer des thérapies individualisées. Notre travail a débuté fin 2015 par une année de Master 2 puis s'est poursuivi par le travail de Doctorat.

Il s'agit de travaux de recherche collaboratifs menés sur 3 sites : le Centre de recherche des Cordeliers, l'Institut Curie et l'hôpital Cochin à Paris.

Nous avons eu l'opportunité d'analyser des échantillons tumoraux (TVNIM et TVIM) de patients porteurs de tumeurs vésicales (tous stades et grades). Notre tumorothèque comporte des ARN et des ADN tumoraux, ainsi que les données clinico-biologiques. Nous disposons également d'échantillons témoins correspondant à des prélèvements vésicaux normaux réalisés pendant des interventions pour lésions bénignes de la prostate. Les échantillons fixés et inclus en paraffine ont permis de réaliser 2 blocs de *Tissue-Micro-Array (TMA)* (un pour les TVNIM et un pour les TVIM) avec l'objectif d'études immunohistochimiques.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse en RT-PCR quantitative en temps réel de 33 gènes de l'immunité anti-tumorale et de 29 oncogènes d'intérêt dans les tumeurs de vessie. Un premier article a été publié en 2017 sur PD-1 et ses ligands PD-L1 et PD-L2, CTLA4/CD28 et leurs ligands CD80/CD86⁶¹ disponible en annexe (Annexe 1). Les principaux résultats de ce travail étaient :

- La surexpression de PD-1 et CTLA4 est plus importante dans les TVIM que dans les TVNIM.

- Aucun des gènes de la voie PD-1 et CTLA4 n'a de valeur pronostique ou prédictive de la réponse au BCG.
- Il existe une association significative entre les voies PD-1 et CTLA4.
- Il existe une corrélation significative entre ARN et expression immunohistochimique pour PD-1 et PD-L1 (cellules tumorales et cellules immunitaires).

Ce travail a fait l'objet d'un poster présenté à l'ASCO en 2016 et d'une publication dans *Urologic Oncology* en 2017⁶¹.

VIII. OBJECTIFS DE LA THESE DE SCIENCE

Les analyses ARN réalisées en M2 ont mis en évidence des variations intéressantes d'expression de gènes potentiellement associés au pronostic des TVNIM (*FOXP3*, *RXRA*, *FGFR3* et *CCNE1*) et/ou des TVIM (*OX40L*, *CD8*, *TIGIT*, *E2F3*, *EGFR* et *ERCC2*).

Dans un second temps, nous nous sommes focalisés sur le micro-environnement immunitaire dans les TVNIM, avec (i) la balance entre cellules T CD8+ effectrices et les T CD4+ régulatrices (*FOXP3*) dont l'intérêt a été montré dans d'autres cancers⁶²⁻⁶⁴ ; (ii) l'identification d'une signature immunitaire dans les TVIM, avec son impact pronostique et thérapeutique (réponse à la BCG-thérapie) ; (iii) l'identification, dans notre cohorte, d'altérations génomiques issues de l'analyse du *TCGA*.

Au total, il s'agissait, pour cette cohorte de TVNIM et TVIM, d'étudier l'implication de l'environnement immunitaire et son lien avec les altérations oncogéniques par des analyses ADN, ARN et protéiques, et de corrélérer ces résultats au pronostic et à la réponse au traitement (BCG-thérapie).

IX. MATERIEL ET METHODOLOGIE GENERALE

IX.1. PATIENTS ET ECHANTILLONS

Nous avons analysé des échantillons de tumeurs de vessie provenant de patients opérés dans le service d'Urologie de l'hôpital Cochin entre Janvier 2002 et Décembre 2007. Ces prélèvements avaient été réalisés au cours d'une résection endoscopique de vessie ou sur pièce de cystectomie. Nous avons également analysé des échantillons de tissu vésical normal prélevés au cours d'une adénomectomie par voie haute réalisée pour hypertrophie bénigne de prostate. En collaboration avec le service d'Anatomopathologie de l'hôpital Cochin, une partie de ces prélèvements avait été immédiatement congelée dans de l'azote liquide, avant d'être acheminée au laboratoire de Pharmacogénomique à l'Institut Curie pour analyse moléculaire. L'autre partie des copeaux de résection ou de la pièce de cystectomie a été fixée dans du formol, pour analyse histologique, selon une technique usuelle de fixation des coupes en paraffine et coloration par HES. Le grade cytologique et le stade anatomopathologique pTNM ont été revérifiés par 2 anatomopathologistes (M.S et D.D) et les échantillons ont été classés selon le grade, selon les recommandations OMS 2004 et pour le stade selon l'UICC 2009^{7,65}. Tous les patients concernés avaient reçu une information claire et détaillée, et leur consentement, libre et éclairé, a été recueilli par écrit. Les données cliniques, de suivi et de survie ont été obtenues par l'exploitation d'une base de données rétrospective actualisée en Janvier 2016.

IX.2. ANALYSE DE L'ADN

IX.2.1. Extraction de l'ADN

A partir de la poudre venant du broyat tumoral, les ADN totaux ont été extraits à l'aide du kit QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN selon les recommandations du fabricant. On réalise sur 2 jours plusieurs étapes consécutives jusqu'à obtenir 2 éluions (**Figure 9**).

Figure 9 : Protocole d'extraction de l'ADN

	<p style="text-align: center;">ONCOGENETIQUE <i>Kit QIAamp DNA Mini Kit</i> <i>Extraction d'ADN à partir de tumeur</i></p>	<p style="text-align: center;">Mode opératoire n° Révision n°0 Page 1/1 Date d'application : 04/01/2013</p>
---	---	---

QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, réf: 51304.

Toutes les étapes se font à température ambiante.
Si un précipité se forme dans les tampons ALT ou AL, le dissoudre en incubant quelques minutes à 56°C.

J0 :
Transvaser un peu de poudre (+/-) dans un tube de 1.5 mL et ajouter immédiatement 180 µL de tampon ALT (ne pas laisser la poudre décongeler).
Ajouter 20µL de proteïnase K, vortexer.
Incuber à 56°C une nuit.

J1 :
Mettre le bain marie sec à chauffer à 70°C

- 1) Centrifuger le tube. Ajouter 200 µL de tampon AL, vortexer 15 sec, incuber 10 min à 70°C.
- 1) Centrifuger le tube. Ajouter 200 µL d'EtOH 100%, vortexer 15 sec.
- 3) Centrifuger le tube. Déposer les 600 µL sur la colonne. Centrifuger à 6000g pendant 1 min.
- 4) Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur, ajouter 500µL de tampon AW1.
Centrifuger à 6000g pendant 1 min.
- 5) Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur, ajouter 500µL de tampon AW2.
Centrifuger à 20000g pendant 3 min.
- 6) Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur et centrifuger à 20000g pendant 1 min pour bien assécher la colonne.
- 7) Placer la colonne sur un tube de 1.5mL. Déposer l'eau RNase free DNase free à température ambiante sur la colonne : 20µL pour des biopsies, 200µL pour 25mg maximum. Incuber 5 min à température ambiante. Centrifuger à 6000g pendant 1 min.
- 8) Faire une deuxième élution : placer la colonne sur un nouveau tube de 1.5mL. Déposer 20µL ou 200µL d'eau RNase free DNase free sur la colonne. Incuber 5 min à température ambiante. Centrifuger à 6000g pendant 1 min.

La quantité d'ADN totale présente dans chaque échantillon a été évaluée grâce au Nanodrop par une mesure de l'absorption à 260 et 280 nm.

IX.2.2. Recherche de mutations somatiques et séquençage

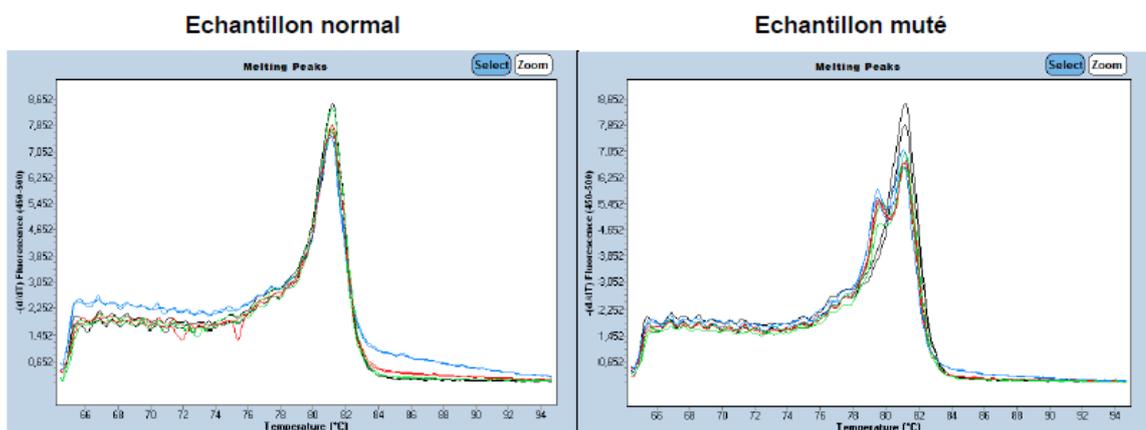
Nous avons analysé *HRAS*, *FGFR3* et *PIK3CA*, gènes connus pour avoir des spots mutationnels bien décrits. La recherche a été réalisée par un criblage en

utilisant la technologie *HRM* (*High Resolution Melting*) suivi d'un séquençage des prélèvements ayant un profil muté en *HRM* pour valider les données *HRM* et déterminer la nomenclature des mutations retrouvées.

✓ HRM

La composition du mélange réactionnel est la suivante : LC Green Plus (Bioké) 10X, Probe Master 2X, eau PCR-grade, UDP 1U/ μ L, amorces U et L (codons 12-13 et 61 pour *HRAS* ; exon 7 (codons 248-249) et exon 10 (codons 372-373-375-382) pour *FGFR3*, exons 9 et 20 courts et longs pour *PIK3CA*) et l'ADN. Un contrôle de qualité est réalisé en amplifiant des témoins normaux. L'interprétation est réalisée sur le logiciel LightCycler® 480. La quantité d'un gène cible est déduite du C_p («*Cycle point*») qui correspond au nombre de cycles nécessaires pour obtenir un signal de fluorescence significatif. On analyse l'aspect de la courbe *HRM* pour chaque échantillon.

Figure 10 : Exemple de courbe obtenue en *HRM* pour *PIK3CA* exon 20

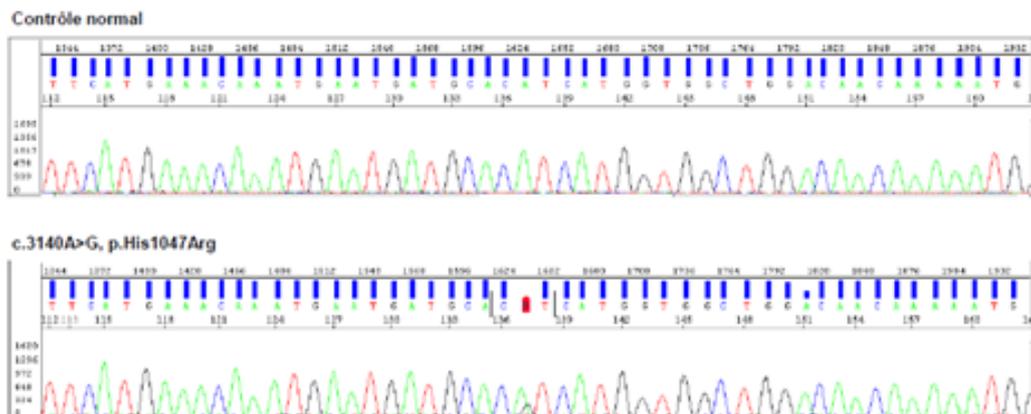


✓ Séquençage

Après purification des produits de *PCR*, on réalise un séquençage par la méthode de Sanger sur tous les échantillons avec un profil atypique en *HRM*.

Les résultats sont interprétés sur le logiciel Sequencing Analysis 5.2.0 selon le mode opératoire IC-000131. Il s'agissait de comparer la séquence d'un échantillon muté en *HRM* avec un échantillon non muté pour trouver la région de la mutation. Une diminution de pic sur un nucléotide associée à l'apparition d'un 2^{ème} pic par rapport à l'échantillon normal correspondait à une mutation.

Figure 11 : Exemple de l'analyse de la séquence de *PIK3CA* exon 20



Les mutations de *FGFR3* ont été réalisées par l'équipe du Pr Allory dans le cadre d'un travail collaboratif et ont pu être intégrées dans nos travaux de recherche.

IX.3. RT-PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

✓ Choix des amorces oligonucléotidiques

Les amorces de 6 gènes (*ERCC2*, *MDM4*, *PAIP1*, *E2F3*, *ZNF703*, *PABPC1*) étaient à dessiner car elles n'étaient pas disponibles dans le laboratoire. Les

amorces oligonucléotidiques ont été choisies pour chaque gène avec l'aide du logiciel Oligo6.0® (National Biosciences, Plymouth, MN). L'analyse des bases de données de séquences nucléotidiques (nr et dbEST) a permis de vérifier le profil d'expression, de connaître l'existence d'éventuelles régions de similarité (rétropseudogènes, gènes paralogues...), de *SNPs*, de séquences répétées et d'épissages alternatifs. Les amorces sont placées dans les régions codantes et l'une des 2 amorces chevauche 2 exons lorsque c'est possible, afin d'éviter toute amplification d'ADN génomique contaminant. D'une manière générale, les produits de *PCR* ont une taille comprise entre 70 et 120 nucléotides (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Amorces oligonucléotidiques designées

Gènes	Oligonucléotides	Séquence	Taille du produit PCR (pdb)
<i>ERCC2</i>	Upper primer	5' – ACGAGGCCCAACAACATTGACAAC - 3'	107
	Lower primer	5' – CGTCTTCTGCAGGGTCTCCAGGT - 3'	
<i>MDM4</i>	Upper primer	5' – CGACTCATGGAGCTGCCGTA - 3'	92
	Lower primer	5' – GTTGAACACTGAGCAGAGGTGGA - 3'	
<i>PAIP1</i>	Upper primer	5' – TGCAGAGACCCTGAATGGTTGT - 3'	98
	Lower primer	5' – AAGAGAAATTTGGGATAGATGTGGC - 3'	
<i>E2F3</i>	Upper primer	5' – CAAGGGCCCATTGAGGTTTACTTA - 3'	125
	Lower primer	5' – TTGGTTGAAGCCAAGTCTTTGGA - 3'	
<i>ZNF703</i>	Upper primer	5' – GTCAGCCCCATTGAGCTGGAC - 3'	76
	Lower primer	5' – GCTTGCCGATCTGCGAGCA - 3'	
<i>PABPC1</i>	Upper primer	5' – TGATCACCCGCCGCTCCTT - 3'	89
	Lower primer	5' – ATCAAATTCATGGTGTCCAAAGCAC - 3'	

La vérification de la spécificité des amorces a été réalisée par une électrophorèse en gel d'agarose 1% (en TAE 1X) sur lequel ne doit apparaître qu'une unique bande par primer.

✓ **Extraction des ARN totaux**

A partir des prélèvements congelés, transférés au laboratoire de Pharmacogénomique de l'Institut Curie, une extraction des ARN messagers avait déjà été effectuée pour la majorité des échantillons en 2006 et a déjà été exploitée pour plusieurs études moléculaires^{66,67}. L'intégrité des ARN totaux avait été contrôlée par une électrophorèse en gel d'agarose 1% (en TAE 1X) avec visualisation des ARN 18S et 28S : si les 2 bandes correspondant aux 2 sous-unités ribosomiales n'étaient pas clairement individualisables (aspect de « smear »), on considérait que l'ARN était dégradé, le plus souvent dû à une rupture de la chaîne du froid au moment du prélèvement. Les échantillons dont l'ARN était dégradé ont été exclus de l'analyse. Pour les échantillons tumoraux congelés qui n'avaient pas encore été extraits, l'extraction des ARN totaux a été réalisée à partir des tissus congelés, après broyage, à l'aide du kit RNable (Eurobio[®], Les Ulis, France) selon les recommandations du fabricant. La quantité d'ARN total présente dans chaque échantillon a été évaluée grâce au Nanodrop par une mesure de l'absorption à 260 et 280 nm.

✓ **RT-PCR quantitative en temps réel**

Reverse-Transcription (RT)

La réaction de Reverse-Transcription est réalisée sur un thermocycler de type GeneAmp PCR system 9700[®] (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA), avec le kit Superscript[™] II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen[®], Cergy pontoise, France), à partir de 1 µg d'ARN total, sous un volume final de 20 µL. La composition du mélange réactionnel est la suivante : tampon RT 1X, DTT 10mM, dNTP 0.5 mM, random hexamers (nucléotides) 0,15 µg, Rnasin (RNase

inhibiteur) 20U, reverse transcriptase 100U. La réaction se déroule en 3 phases (10 minutes à 20°C, 30 minutes à 42°C, et 5 minutes à 99°C), permettant l'hybridation et la synthèse d'ADNc par adjonction de nucléotides complémentaires au brin d'ARN sous l'action de la reverse transcriptase.

qPCR

La composition du mélange réactionnel est la suivante : Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies) 2X et des amorces amont et aval 50 µM pour un volume final de 15 µL. La réaction d'amplification comporte les étapes suivantes : 10 minutes à 95°C, 50 cycles d'amplification (95°C/15s, 65°C/1min) pendant lesquels on aura d'abord une dénaturation des ADNc, puis une hybridation des amorces et une élongation et enfin une étape de dissociation. Tous les dosages ont été faits en duplicata.

Interprétation des résultats

La quantification des taux de transcrits des gènes cibles a été réalisée par *PCR* en temps réel (ABI Prism™ 7900 Sequence Detection System, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA). La quantité de transcrits d'un gène cible est déduite du Ct qui correspond au nombre de cycles nécessaires pour obtenir un signal de fluorescence significatif.

Les résultats, appelés « N_{cible} », représentent le niveau de transcrits du gène cible rapporté à celui du gène de référence, selon la formule : $N_{\text{cible}} = 2^{(\Delta Ct \text{ échantillon})}$ où la valeur du ΔCt de l'échantillon est obtenue en soustrayant la valeur du Ct du gène cible à la valeur du Ct du gène de référence *TBP*.

Pour chaque gène, le taux de transcrits de chaque échantillon fut secondairement normalisé à la médiane des taux de transcrits dans les échantillons témoins. Ainsi, les résultats obtenus pour les tumeurs sont exprimés par rapport à la médiane des normaux pour un gène donné.

Des taux de transcrits de 3 ou plus dans les échantillons tumoraux représentent une surexpression et des valeurs de 0,33 ou moins une sous-expression, pour chacun de ces gènes. Ces valeurs-seuils ont déjà été utilisées dans cette cohorte pour définir des sur- ou sous-expressions dans des échantillons d'ARNm tumoraux^{68,69}.

IX.4. VALIDATION PAR EXPRESSION PROTEIQUE SUR BLOCS DE TMA

Pour des études protéiques concernant les gènes d'intérêt identifiés au niveau ARN ou ADN, du matériel a été préparé (un TMA pour les TVNIM, un autre pour les TVIM). Pour un même cas, toutes les lames HES tumorales sont étudiées afin de sélectionner la lame la plus pertinente et son bloc correspondant. La zone d'intérêt a été définie comme celle comportant la zone tumorale de plus haut stade et grade par un anatomo-pathologiste (D.D).

Nous avons ensuite agencé un tableau qui servira de guide à la lecture du TMA. Le prélèvement du tissu dans la zone d'intérêt se fait à l'aide d'un trocart de la machine *Tissu-Micro-Arrayer* (Alphelys) et est placé sur un bloc de paraffine vierge selon le plan défini au préalable sur papier. On dépose également des tissus témoins positifs qui serviront lors de la lecture du TMA. Enfin, on fixe les spots en déposant le bloc ainsi confectionné sur une plaque chaude (37-40°C).

Des coupes sériées sont alors réalisées à l'aide d'un microtome à paraffine (Microtome Micron AM 360). L'équarrissage se fait à 3 μm après avoir déparaffiné à 10 μm . L'étalement des coupes se fait dans l'eau distillée puis elles sont déposées sur des lames superFrost+.

IX.5. ANALYSE STATISTIQUE

Toutes les informations ont été incluses dans une base de données de type Excel[®] 2010. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SEM. Les paramètres clinico-pathologiques ont été comparés en utilisant le test du Chi². Les niveaux d'expression des différents gènes ont été comparés aux paramètres cliniques et anatomo-pathologiques à l'aide d'un test non paramétrique (distribution non normale) : le test H de Kruskal et Wallis. Les échantillons ayant été collectés entre 2002 et 2007, avec un suivi de plus de 10 ans pour certains patients, une analyse de survie a pu être réalisée (survie sans récurrence et survie sans progression vers l'infiltration du muscle pour les TVNIM ; survie sans récurrence et survie globale pour les TVIM). Les taux de survie ont été estimés par la méthode de Kaplan-Meier. Pour l'analyse univariée, les survies entre deux sous-groupes ont été comparées par le test du Log rank à partir des courbes de Kaplan-Meier. A l'aide du logiciel de statistique, quand le cut-off n'était pas déterminé de façon arbitraire, un cut-off optimal a été déterminé pour l'expression de chacun des gènes grâce au ROC-AUC⁷⁰, afin d'obtenir la meilleure répartition de patients au sein des groupes pronostiques. Pour l'analyse multivariée, un modèle de Cox a été réalisé à partir des facteurs pronostiques significatifs en analyse univariée.

IX.6. CARACTERISTIQUES DE LA COHORTE

La cohorte a contenu, selon les analyses de 155 (71 TVNIM et 84 TVIM) à 127 échantillons tumoraux (60 TVNIM et 67 TVIM). Pour les TVNIM, le suivi médian a été de 5 ans. Pour les TVIM, le suivi médian a été de 1 an. Au sein de ces 2 populations, les taux de récurrence et/ou de progression au cours du suivi sont comparables à ceux observés classiquement : la moitié des TVNIM récidivent sur un mode non infiltrant et 12% d'entre elles progressent vers l'infiltration. De même, plus de la moitié des TVIM récidivent et décèdent malgré un traitement adapté. Pour les TVNIM, les facteurs pronostiques classiques que sont les antécédents de tumeur de vessie d'une part et le Cis associé et le grade d'autre part étaient significativement associés au risque de récurrence et de progression vers l'infiltration respectivement. Pour les TVIM, le stade, le statut ganglionnaire et l'âge étaient significativement associés à la survie globale. 28 patients ont reçu de la BCG-thérapie. Ont été considérés comme répondeurs les patients qui n'ont pas récidivé ou ont récidivé plus de 24 mois après le traitement. Ont été considérés comme non-répondeurs les patients réfractaires au BCG ou ayant présenté une récurrence précoce à moins de 24 mois. 13 patients ont répondu au traitement et 15 n'ont pas répondu.

RÉSULTATS

I. GENES DE L'IMMUNITE ANTI-TUMORALE

Nous avons donc analysé l'expression de 33 gènes impliqués dans l'immunité anti-tumorale selon les données de la littérature et par expérience de l'équipe.

Le résultat principal de ce travail a été la mise en évidence d'une signature transcriptionnelle immunitaire, composée de 3 gènes, pronostique dans les TVIM en termes de récurrence et de survie globale : *OX40L*, *CD8* et *TIGIT*. Cette signature a été brevetée par l'IPC (numéro de brevet : EP3333268 A1).

Notre projet est de la valider dans une cohorte indépendante et dans un essai thérapeutique prospectif afin d'analyser son potentiel caractère prédictif de la réponse à l'immunothérapie.

A l'échelle ARN, nous avons montré que le ratio *FOXP3/CD8* élevé était associé au risque de récurrence dans les TVNIM, en accord avec les résultats d'autres équipes montrant que ce ratio élevé était associé à un mauvais pronostic dans d'autres cancers.

Ces résultats ont été publiés (Le Goux et al Oncoimmunol 2017⁷¹) et sont présentés ci-dessous.

ORIGINAL RESEARCH



mRNA Expression levels of genes involved in antitumor immunity: Identification of a 3-gene signature associated with prognosis of muscle-invasive bladder cancer

Constance Le Goux^{*a}, Sophie Vacher^{b*}, Géraldine Pignot^{bc}, Mathilde Sibony^c, Nicolas Barry Delongchamps^d, Benoit Terris^e, Eliane Piaggio^e, Marc Zerbib^d, Diane Damotte^{e,f}, and Ivan Bieche^{a,g}

^aDepartment of Genetic, Institut Curie, Unité de pharmacogénomique, Service de génétique, Paris, France; ^bDepartment of Urology, Institut Paoli-Calmettes, Service d'Urologie, Marseille, France; ^cDepartment of Pathology, Université Paris Descartes; Hôpital Cochin, Service d'Anatomopathologie, Paris, France; ^dDepartment of Urology, Université Paris Descartes; Hôpital Cochin, Service d'Urologie, Paris, France; ^eDepartment of Translational Immunotherapy, Institut Curie, PSL Research University, INSERM U932, Translational Immunotherapy Siric Team, Centre d'Investigation Clinique Biothérapie CICBT, Paris, France; ^fCentre de Recherche des Cordeliers, Cancer et Immunité anti tumorale, INSERM U1138, Paris, France; ^gUniversité Paris Descartes, Paris, France

ABSTRACT

Immunotherapy for bladder cancer has given promising results. Here we aimed to evaluate the possible involvement and prognostic value of 33 genes involved in the immune response during bladder carcinogenesis. Expression levels were assessed by quantitative real-time RT-PCR in normal and tumor human bladder samples. Immunohistochemistry was performed to evaluate the protein expression of 2 genes and relation of the mRNA and protein levels was analyzed. Tumors were obtained from 154 patients (83 with muscle-invasive bladder cancer [MIBC] and 71 non-MIBC [NMIBC]) who underwent transurethral bladder resection or radical cystectomy between 2002 and 2006. All patients signed an informed consent. Results of molecular analyses were coupled with survival analyses. Overall, 25 genes (75.8%) were significantly overexpressed in MIBC and 15 (45.5%) were deregulated in NMIBC as compared with normal tissue. On multivariate analysis, risk of NMIBC recurrence was increased with high *FOXP3/CD8* ratio and overexpression of *OX40L* ($p = 0.016$ and $p = 0.0039$, respectively). In MIBC, a molecular signature of 3 genes (*OX40L*, *CD8* and *TIGIT*) was significantly associated with prognosis in terms of recurrence-free and overall survival ($p = 0.0007$ and $p = 0.007$). RT-PCR findings were confirmed by immunohistochemistry for CD8 and FOXP3, with high association between mRNA and protein levels. Finally, risk of recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer was increased with high *FOXP3/CD8* ratio and *OX40L* overexpression. We identified a 3 gene molecular signature associated with prognosis of muscle-invasive bladder cancer. These results confirm the useful role of immune checkpoints in bladder carcinogenesis and suggest targets for therapy.

Abbreviations: BCG, bacillus Calmette–Guerin; Cdna, cDNA; MIBC, muscle-invasive bladder cancer; mRNA, messenger ribonucleic acid; NMIBC, non-muscle-invasive bladder cancer; OS, overall survival; PFS, progression-free survival; RFS, recurrence-free survival; RT-PCR, reverse-transcriptase polymerase chain reaction; TNM, tumor-node metastasis

ARTICLE HISTORY

Received 12 May 2017
Revised xxx
Accepted 18 July 2017

KEYWORDS

Bladder cancer; immune checkpoints; immunohistochemistry; prognostic factor; RT-PCR

Introduction

Bladder cancer is the sixth most common cause of cancer mortality, and its incidence has increased markedly in recent decades. Urothelial carcinoma is the predominant histologic type in the United States and Europe, accounting for 90% of all cases. About 2-thirds of newly diagnosed cases are non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC). These have a 60% recurrence rate and, in 10% of cases, evolve to muscle-invasive tumors. Muscle invasive bladder cancer (MIBC) occurs in one-third of cases at diagnosis. Survival greatly differs between early and advanced bladder cancer.

Currently, the prognosis of metastatic MIBC remains poor because treatment options are limited. The lack of individual prognostic factors in urothelial neoplasms calls for new molecular markers that may also serve as therapeutic targets.

However, the treatment landscape and outcomes for bladder cancer may be transformed by recently developed novel therapies, the most promising of which is immunotherapy.^{1,2}

The immune system is present in almost all solid tumors, and its role in controlling growth and metastasis has been demonstrated in a large array of tumors. Indeed, the adaptive immune environment, mainly CD8+ T cells and T helper 1 cells, has been reported to have prognostic value.³ However, the presence of tumor underlines the capacity of cancer cells to escape immune control, through physiologic mechanisms, as an immune-checkpoint inhibition of T-lymphocyte function.⁴

The immune checkpoint genes programmed death 1 (PD-1) and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) have been described for bladder cancer,⁵ but to our knowledge,

CONTACT Géraldine Pignot  pignot@ipc.unicancer.fr  Unité de Chirurgie Oncologique 2 - Institut Paoli-Calmettes 232 boulevard de Sainte-Marguerite, 13009, Marseille, France.

*Equal contributions

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2017 Taylor & Francis Group, LLC

previous studies have included mostly MIBC samples and almost exclusively assessed the PD-1 pathway. However, the complexity and changes of the immune environment over time require additional studies of other genes involved in antitumor immunity.

To identify new molecular markers of clinical interest, we analyzed the mRNA and protein expression of a large panel of genes ($n = 33$) involved in the immune process in normal and tumor bladder samples, including 71 NMIBC and 83 MIBC samples, and determined any association with recurrence and survival.

Results

Patients characteristics

Patients included 25 women and 129 men (median age 70 y [range 31–9]). Pathological staging showed NMIBC in 71 patients (25 low-grade pTa, 17 high-grade pTa, 29 high-grade pT1) and high-grade MIBC in 83. Clinical and histological features and survival of NMIBC and MIBC patients are in Table 1. Characteristics for both groups were consistent with urothelial carcinoma presentation and evolution.

Table 1. Clinical and pathological characteristics of patients.

a) 71 patients with non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC)						
	No recurrence (n = 25)		Recurrence (n = 36)		Muscle-invasive progression (n = 10)	
	No. (%)	No. (%)	p-value*	No. (%)	p-value**	
Age (years)						
≥ 60	Nineteen (76.0)	Twenty-seven (75.0)	0.93	Ten (100.0)	0.08	
< 60	Six (24.0)	Nine (25.0)		0 (0.0)		
Sex						
Male	22 (88.0)	32 (88.9)	0.91	9 (90.0)	0.89	
Female	3 (12.0)	4 (11.1)		1 (10.0)		
Smoking status						
Non-smoker	13 (52.0)	15 (41.7)	0.43	5 (50.0)	0.81	
Smoker	12 (48.0)	21 (58.3)		5 (50.0)		
History of NMIBC						
No	22 (88.0)	13 (36.1)	<0.0001	4 (40.0)	0.31	
Yes	3 (12.0)	23 (63.9)		6 (60.0)		
Associated pTis						
No	25 (100.0)	36 (100.0)	0.99	8 (80.0)	0.0004	
Yes	0 (0.0)	0 (0.0)		2 (20.0)		
Grade						
Low grade	10 (40.0)	14 (38.9)	0.93	1 (10.0)	0.07	
High grade	15 (60.0)	22 (61.1)		9 (90.0)		
Tumor stage						
Ta	15 (60.0)	24 (66.7)	0.59	3 (30.0)	0.043	
T1	10 (40.0)	12 (33.3)		7 (70.0)		

*Chi² test (recurrence vs no recurrence)

**Chi² test (muscle-invasive progression vs others)

b) 83 patients with muscle-invasive bladder cancer (MIBC)					
	No. of patients (%)	Recurrence-free survival (n = 48)		Overall survival (n = 46)	
		No. of events (%) ^a	p-value ^c	No. of events (%) ^b	p-value ^c
Age (years)					
≥ 60	61 (73.5)	40 (65.5)	0.017	39 (63.9)	0.009
< 60	Twenty-two (26.5)	Eight (36.4)		Seven (31.8)	
Sex					
Male	66 (79.5)	36 (54.5)	0.23	38 (57.6)	0.44
Female	17 (20.5)	12 (70.6)		8 (47.1)	
Smoking status					
Non-smoker	34 (41.0)	18 (52.9)	0.45	12 (35.3)	0.002
Smoker	49 (59.0)	30 (61.2)		34 (69.4)	
History of NMIBC					
No	59 (71.1)	30 (50.8)	0.043	31 (52.5)	0.41
Yes	24 (28.9)	18 (75.0)		15 (62.5)	
Associated pTis					
No	73 (88.0)	43 (58.9)	0.59	40 (54.8)	0.76
Yes	10 (12.0)	5 (50.0)		6 (60.0)	
Tumor stage					
T2	34 (41.0)	17 (50.0)	0.10	13 (38.2)	0.009
≥ T3	49 (59.0)	31 (63.3)		33 (67.3)	
Lymph node status					
N-	58 (69.9)	27 (46.6)	0.002	25 (43.1)	0.0006
N+	25 (30.1)	21 (84.0)		21 (84.0)	

^afirst recurrence (local or metastatic);

^bdeath

^cChi² test

For the 71 NMIBC cases, the median follow-up was 57.4 months (range 1–158, mean 61 months); 36 (50.7%) recurred as NMIBC during follow-up. The progression rate to muscle-invasive tumor was 14.1% (n = 10).

For the 83 MIBC cases, the median follow-up was 12.3 months (range 1–152, mean 28 months). During follow-up, 41 patients (48.8%) died of bladder cancer and 5 (5.9%) of unrelated causes.

Gene expression

For all genes except *LGALS9*, the expression profile differed between MIBC and NMIBC samples (Table 2). All genes except *CD96* were overexpressed in MIBC as compared with NMIBC samples. In MIBC samples, 25/33 genes (75.8%) were significantly deregulated as compared with normal bladder tissue ($p < 0.05$), all showing overexpression, except for *TGFB3* which was significantly under-expressed. In NMIBC, 15/33 genes (45.5%) were significantly deregulated as compared with normal bladder tissue ($p < 0.05$), with 8 downregulated (*PD-L2*, *CD4*, *CD8*, *CD226*, *TIM3*, *IFNG*, *IL10*, and *TGFB3*) and 7 upregulated (*CD80*, *LGALS9*, *CD96*, *TNFRSF9*, *TDO2*, *OX40* and *FOXP3*). Regarding NMIBC samples, 15 genes showed significant differences in expression by stage, most overexpressed in pT1 tumors as compared with pTa tumors. In contrast, only 2 genes (i.e., *TNFRSF9* and *CD86*), showed different expression profiles by grade (low versus high) (Supplemental data 1).

Supplemental Data 2 shows for the 4 main drug-targeted genes, the number with co-altered mRNA expression (Venn diagram).

Association between gene expression and prognosis of NMIBC

On univariate analysis, only the expression of *FOXP3* and *OX40L* was associated with RFS, and only *FOXP3* expression was associated with PFS. Risk of recurrence was increased with *OX40L* overexpression (5 year-recurrence rate = 90.9% vs. 71.8%, log rank $p = 0.0023$). Risk of both recurrence and progression to muscle-invasive tumors was increased with *FOXP3* overexpression (5 year-recurrence rate = 81.4% vs. 69.4%, $p = 0.0062$ and 5 year-progression rate = 34.4% vs. 9.2%, $p = 0.018$, respectively).

As described in previous studies, we analyzed *FOXP3* and *CD8* expression together by defining a *FOXP3/CD8* ratio determined by using *FOXP3* and *CD8* mRNA values in each NMIBC sample to obtain a quantitative value (median value [range] = 6.25 [0.94–45.01]). Prognosis in terms of RFS was worse with *FOXP3/CD8* ratio ≥ 6.25 than with a lower ratio ($p = 0.010$) (Fig. 1).

Multivariate analyses included covariates associated with RFS or PFS showing significance at $p < 0.05$ on univariate analysis, i.e., history of NMIBC, *FOXP3/CD8* ratio and *OX40L* status

Table 2. mRNA expression of the 33 studied genes in normal and tumor bladder samples.

GENES	Normal(n = 15)	NMIBC(n = 71)	MIBC(n = 83)	MIBC/NMIBC p-value**	AUC [‡]	NMIBC/N p-value**	AUC [‡]	MIBC/N p-value**	AUC [‡]
CD8	1.00 [0.28–3.89]*	0.31 [0.04–6.13]*	1.00 [0.09–45.5]*	<10 ⁻⁷	0.766	0.00026	0.199	1	0.500
CD4	1.00 [0.35–2.38]	0.63 [0.13–3.95]	1.41 [0.15–14.20]	0.00000028	0.746	0.014	0.3	0.15	0.616
FOXP3	1.00 [0.00–2.51]	2.42 [0.34–20.44]	6.16 [0.71–56.57]	<10 ⁻⁷	0.742	0.00011	0.815	<10 ⁻⁷	0.956
PRF1	1.00 [0.27–2.47]	0.37 [0.00–5.59]	1.50 [0.11–36.45]	<10 ⁻⁷	0.820	0.067	0.235	0.051	0.659
GZMA	1.00 [0.34–5.23]	2.03 [0.04–38.43]	7.93 [0.56–168.88]	<10 ⁻⁷	0.791	0.11	0.695	0.00000031	0.916
IFNG	1.00 [0.00–9.24]	0.28 [0.00–13.74]	1.18 [0.00–93.38]	0.00000043	0.742	0.0080	0.285	0.35	0.576
IL10	1.00 [0.35–2.88]	0.23 [0.00–1.50]	1.59 [0.14–12.89]	0.00000044	0.902	0.00000092	0.402	0.11	0.629
TGFB3	1.00 [0.29–1.79]	0.03 [0.00–0.38]	0.19 [0.01–1.80]	<10 ⁻⁷	0.880	<10 ⁻⁷	0.002	0.00015	0.072
TIGIT	1.00 [0.14–1.87]	0.82 [0.08–14.73]	3.55 [0.26–68.06]	<10 ⁻⁷	0.796	0.19	0.477	0.0000028	0.881
PVR	1.00 [0.47–1.77]	0.84 [0.00–1.80]	1.35 [0.35–5.26]	<10 ⁻⁷	0.815	0.11	0.366	0.0025	0.746
CD96	1.00 [0.21–4.28]	2.84 [0.00–15.59]	2.00 [0.02–15.44]	0.013	0.384	0.0043	0.766	0.066	0.650
CD226	1.00 [0.35–1.63]	0.19 [0.00–3.28]	0.80 [0.05–7.32]	<10 ⁻⁷	0.810	0.000041	0.100	0.29	0.414
OX40	1.00 [0.00–2.04]	1.45 [0.25–12.54]	4.20 [0.36–30.09]	<10 ⁻⁷	0.806	0.043	0.684	<10 ⁻⁷	0.937
OX40L	1.00 [0.00–6.08]	0.72 [0.00–12.23]	10.56 [0.00–110.27]	<10 ⁻⁷	0.892	0.99	0.536	0.0000021	0.886
TNFRSF9	1.00 [0.00–4.07]	0.54 [0.00–10.45]	2.63 [0.05–25.00]	<10 ⁻⁷	0.845	0.9	0.396	0.00021	0.802
TNFRSF9	1.00 [0.00–4.81]	1.92 [0.00–23.68]	12.69 [0.52–254.52]	<10 ⁻⁷	0.840	0.047	0.667	<10 ⁻⁷	0.948
TNFRSF18	1.00 [0.00–3.77]	0.53 [0.00–14.71]	2.67 [0.00–213.81]	<10 ⁻⁷	0.787	0.72	0.513	0.00043	0.787
TNFRSF18 ^{‡‡}	2.19 [0.00–14.21]	5.08 [0.44–165.03]	20.35 [1.89–185.72]	<10 ⁻⁷	0.804	0.14	0.687	<10 ⁻⁷	0.941
IDO1	1.00 [0.14–2.18]	1.58 [0.00–54.40]	10.25 [0.35–2896.87]	<10 ⁻⁷	0.811	0.15	0.699	<10 ⁻⁷	0.948
IDO2 ^{‡‡}	0.00 [0.00–3.57]	0.50 [0.00–8.70]	0.95 [0.00–174.89]	0.027	0.604	0.34	0.674	0.0038	0.735
TDO2	1.00 [0.00–6.66]	19.61 [0.84–277.11]	77.17 [3.61–596.90]	<10 ⁻⁷	0.793	0.0055	0.954	<10 ⁻⁷	0.997
LGALS9	1.00 [0.21–1.61]	2.56 [0.22–8.96]	2.72 [0.20–70.56]	0.33	0.546	0.00062	0.834	0.0000067	0.867
TIM3	1.00 [0.43–3.26]	0.42 [0.02–3.58]	2.37 [0.19–20.16]	<10 ⁻⁷	0.899	0.0079	0.200	0.00084	0.772
LAG3	1.00 [0.44–2.57]	0.47 [0.00–24.07]	2.96 [0.05–159.10]	<10 ⁻⁷	0.840	0.9	0.291	0.00075	0.774
ICOSLG	1.00 [0.41–2.12]	0.88 [0.19–7.01]	1.74 [0.22–10.75]	0.00000038	0.738	0.51	0.462	0.00079	0.773
ICOS	1.00 [0.00–2.32]	1.09 [0.00–19.86]	3.88 [0.16–56.58]	<10 ⁻⁷	0.775	0.14	0.561	0.0000016	0.891
PD-L1	1.00 [0.31–2.68]	0.60 [0.08–7.96]	3.94 [0.09–45.68]	<10 ⁻⁷	0.863	0.13	0.376	0.000027	0.841
PD-L2	1.00 [0.43–1.92]	0.17 [0.01–3.54]	1.37 [0.06–26.77]	<10 ⁻⁷	0.884	0.00000025	0.074	0.25	0.593
PD-1	1.00 [0.00–4.67]	0.79 [0.00–11.27]	4.31 [0.28–106.99]	<10 ⁻⁷	0.815	0.26	0.526	0.0000040	0.876
CTLA4	1.00 [0.00–5.35]	1.63 [0.00–25.08]	9.12 [0.39–306.94]	<10 ⁻⁷	0.809	0.085	0.613	0.00000023	0.921
CD28	1.00 [0.18–3.86]	0.64 [0.02–8.28]	1.58 [0.07–14.06]	<10 ⁻⁷	0.767	0.61	0.343	0.037	0.669
CD80	1.00 [0.00–5.39]	2.46 [0.00–24.17]	12.46 [1.00–185.95]	<10 ⁻⁷	0.855	0.024	0.700	<10 ⁻⁷	0.984
CD86	1.00 [0.29–2.23]	0.45 [0.07–5.98]	2.11 [0.12–24.28]	<10 ⁻⁷	0.832	0.38	0.257	0.0035	0.738

*Median value [range]

**Kruskal Wallis H test

‡Area under the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve

‡‡The mRNA values of the samples were normalized so that a Ct value of 35 was set to 1.

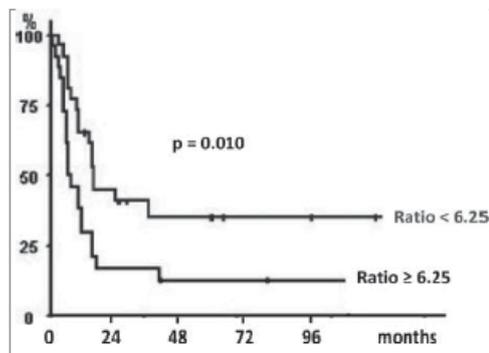


Figure 1. Recurrence-free survival according to *FOXP3/CD8* ratio in non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC).

for recurrence, and stage, grade and *FOXP3* status for progression to muscle-invasive tumor. *FOXP3/CD8* ratio and *OX40L* status remained independent prognostic factors significantly associated with RFS ($p = 0.016$ and $p = 0.0039$, respectively) (Table 3a), with none associated with PFS.

Response to bacillus Calmette–Guerin (BCG) therapy

In total, 21/28 (75%) patients with BCG therapy showed recurrent NMIBC or progression to invasive tumor during follow-up, including 15 (53.6%) over the first 2 y. None of the 33 investigated genes was associated with response to BCG-therapy, although *FOXP3* expression was 3-fold increased but not significantly associated with response (Supplemental data 3).

Association between mRNA expression and survival of MIBC

On univariate analysis for RFS and OS, prognosis was poor with *OX40L* overexpression ($p = 0.027$ and $p = 0.014$, respectively) but was improved with *CD8* overexpression ($p = 0.024$ and $p = 0.029$, respectively). The expression of *TIGIT* was also associated with OS ($p = 0.042$).

Identification of a molecular signature predictive of MIBC prognosis

We performed unsupervised hierarchical clustering analyses of 83 MIBC samples with the 3 genes previously found associated with survival in MIBC (*OX40L*, *CD8*, and *TIGIT*) and found 3 major clusters composed of 29 (Group A), 27 (Group B), and 27 (Group C) samples, respectively (Fig. 2A). Group A was characterized by normal expression of the 3 selected genes compared with normal tissue samples, group B by marked overexpression of *OX40L* only, and group C by simultaneous overexpression of the 3 genes (Fig. 2B).

The groups did not differ in clinicopathological factors (Supplemental Data 4) but did differ in RFS and OS (log rank $p = 0.0002$ and $p = 0.0005$, respectively): Kaplan-Meier survival curves showed poorer outcome associated with group B (Fig. 2C). Five-year RFS and OS rates were 11.2% and 8.3% for group B vs. 47.9% and 44.2% for group A, and 47.1% and 52.8% for group C, respectively.

Multivariate analyses included covariates associated with RFS or OS showing significance at $p < 0.05$ on univariate analysis, i.e., tumor stage, lymph node status and the 3 gene signature. It retained lymph node status and the 3 gene signature as independent prognostic factors in both RFS ($p = 0.002$ and

Table 3. Cox proportional-hazards regression analysis.

a: Factors affecting recurrence-free survival with NMIBC.						
Prognostic factor	Recurrence-free survival					
	Adjusted HR	95% CI	p value*			
History of NMIBC	2.66	[1.43–4.94]	0.0019			
<i>FOXP3/CD8</i> ratio	2.11	[1.15–3.88]	0.016			
<i>OX40L</i> overexpression	2.27	[1.04–4.97]	0.0039			
b: Factors affecting recurrence-free and overall survival with MIBC.						
Prognostic factor	Recurrence-free survival			Overall survival		
	Adjusted HR	95% CI	p value*	Adjusted HR	95% CI	p value*
T Stage			0.19			0.23
≤T2	1			1		
T3–4	1.62	[0.79–3.34]		1.57	[0.75–3.28]	
N+ status	3.37	[1.56–7.30]	0.002	3.26	[1.61–6.60]	0.001
3 gene signature			0.0007			0.007
Group C	1			1		
Group A	2.08	[1.36–3.19]		1.74	[1.16–2.61]	
Group B	4.34	[1.85–10.19]		3.04	[1.36–6.80]	

* Cox model

HR: hazard ratio; CI: confidence interval

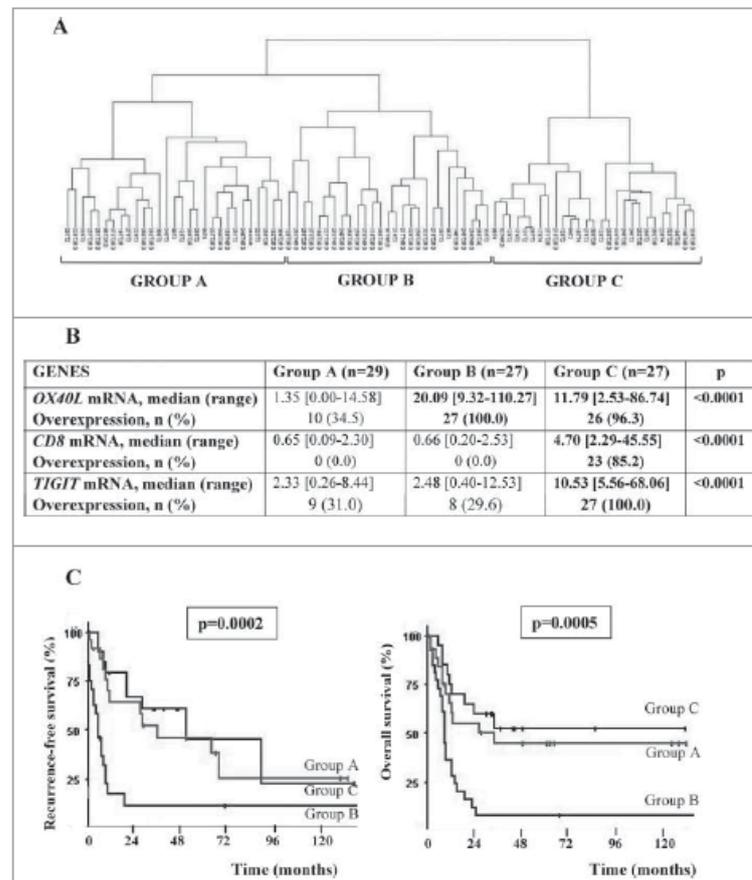


Figure 2. Supervised classification analysis of 83 muscle-invasive bladder cancer (MIBC) samples with the 3 gene signature of *OX40L*, *CD8* and *TIGIT*.

$p = 0.0007$, respectively) and OS ($p = 0.001$ and $p = 0.007$, respectively) (Table 3b).

Immunohistochemistry analyses

CD8 protein expression ($\geq 1+$) in immune cells was significantly more common in MIBC than NMIBC samples ($p = 0.0084$) (Table 4). Importantly, mRNA and protein data for both CD8 and FOXP3 were strongly associated ($p = 0.00000016$ and $p = 0.00000093$ respectively) (Supplemental data 5). The prognostic significance of FOXP3/CD8 ratio was analyzed by protein scoring (0, 1+ or 2+) and we found no significant difference in RFS or PFS for NMIBC (data not shown). For *OX40L* and *TIGIT*, identified as genes of interest in MIBC, immunohistochemistry analysis was not possible because of lack of available reliable antibodies.

Discussion

The lack of individual prognostic factors in urothelial neoplasms calls for new molecular markers that might also serve as

therapeutic targets. Because of the potential implication of anti-tumor immunity in bladder cancer, we assessed the mRNA levels of 33 genes related to the immune environment and identified prognostic markers in both NMIBC and MIBC. In our study population, half of the tumors were superficial and half invasive. In these 2 populations, the classical prognostic factors were confirmed, and recurrence and progression rates agree with those usually reported. As expected, expression profiles for most of the genes differed significantly between NMIBC and MIBC. Specific cell markers and cytokines involved in the immune response, such as *CD8*, *FOXP3*, *TGFB3*, *IFNG*, *IL10*, were deregulated in the early stage of bladder carcinogenesis, with downregulation in NMIBC samples. However, genes involved in immune checkpoint pathways were predominantly overexpressed at the muscle-invasive stage.

In NMIBC, risk of disease recurrence was increased with *OX40L* and *FOXP3* overexpression and high *FOXP3/CD8* ratio. Regarding the literature, the role of *FOXP3* in immune control or dysregulation is still unclear. Indeed, FoxP3 has been found a key regulator in the development and function of regulatory T cells and seems to play a major role in preventing

Table 4. Immunohistochemistry scores for CD8 and FOXP3 expression in immune cells.

	CD8				P*	FOXP3			
	0+ (%)	1+ (%)	2+ (%)	P*		0+ (%)	1+ (%)	2+ (%)	P*
All samples (n = 108)	19 (17.6)	53 (49.1)	36 (33.3)			26 (24.1)	46 (42.6)	36 (33.3)	
NMIBC (n = 50)	14 (28.0)	27 (54.0)	9 (18.0)	0.0084	16 (32.0)	21 (42.0)	13 (26.0)	0.074	
MIBC (n = 58)	5 (8.6)	26 (44.8)	27 (46.0)		10 (17.2)	25 (43.1)	23 (39.7)		

*Chi-2 test (0+ versus 1+/2+)

autoimmune disease or maintaining self-tolerance.⁶ In cancer, FOXP3 upregulation has been found to have protective or pro-tumorigenic effects in various solid tumors.⁷ Some authors suggest that tumor cells could have FOXP3-dependent suppressive effects on T cells and that the mimicking of the regulatory T-cell function by tumor cells may represent a possible mechanism of tumor resistance to immune destruction in the micro-environment and thus facilitate tumor progression.^{8,9} Increased number of intra-tumoral infiltrating FOXP3+ cells and increased FOXP3/CD8 ratio were described as prognostic factors associated with worse survival in several cancers.¹⁰⁻¹²

Our results agree with previously published studies, finding the *FOXP3/CD8* mRNA ratio significantly associated with RFS in NMIBC, with worse prognosis when this ratio was high. Blocking the suppressive T-cell function by stimulating CD8+ T-effector cells should be an effective immunotherapy to improve outcomes in this cancer. Finally, although *FOXP3* mRNA level seemed to be higher in patients with than without response to BCG therapy, FOXP3 did not significantly predict response to BCG therapy, but the small number of patients who received the treatment may explain the lack of statistical power in our study.

In MIBC, we identified a 3 gene signature, *CD8*, *OX40L* and *TIGIT*, associated with both RFS and OS that allowed us to distinguish 3 groups of tumors with differential expression of these genes. Group C was characterized by a relative high expression level of *CD8* compared with the 2 other groups, which seemed to be associated with improved prognosis. In contrast, group B was characterized by a marked overexpression of *OX40L* but downregulation of *CD8*, and this molecular profile was significantly associated with poor prognosis. The relative reduction in *CD8* expression may reflect reduced tumor immunogenicity, thereby allowing for immune tolerance toward tumor cells or a tumor ignorance by the immune system.¹³ However, when neither *OX40L* nor *TIGIT* were overexpressed, the prognosis remained good, as if the tumor's ability to stimulate the immune response was too low, perhaps related to a weak mutation load (group A). The 3 groups did not differ in clinicopathological criteria, which suggests that our 3 gene signature was associated with MIBC prognosis, regardless of conventional tumor-aggressive features. These results were confirmed on multivariate analyses, so the prognostic ability of the 3 gene signature to identify patients with poor outcomes may be even more powerful than stage, which probably reflects the biologic behavior of tumor cells. This molecular profiling may help identify patients who would be most likely to benefit from adjuvant treatments and closer follow-up.

In other cancers, the therapeutic efficacy of immune checkpoint inhibitors such as TIGIT and OX40L are still under

investigation. TIGIT has recently been identified as a co-inhibitory receptor that critically limits CD8+ T-cell-dependent immune responses.^{14,15} A recent publication underlined that OX40L upregulation, like PD-1 and CTLA-4 pathway activation, is associated with the epithelial-to-mesenchymal transition and drug response,¹⁶ but its role in bladder cancer was still unknown. Accumulating preclinical evidence supports the clinical development of anti-OX40 monoclonal antibodies in several solid tumors and thus in bladder cancer according to our results.¹⁷

In recent years, many trials testing immune checkpoint inhibition in bladder cancer were launched, and most of them are still ongoing. Assessing the association of gene expression with response to systemic therapies is of interest. The results of our study suggest that the expression of specific cell markers, particularly *CD8*, may be good biologic markers reflecting the immunogenicity of the tumor and is easily assessable by RT-PCR or immunohistochemistry, because we found a good association of mRNA and protein levels.

In conclusion, regulation of several immune genes is associated with urothelial carcinogenesis, which suggests an interplay between both the tumor and immune compartment. Some of these molecular alterations could appear very early during carcinogenesis, involving mostly specific cell genes encoding for adaptive immune markers or cytokines. RFS was worse with *OX40L* and *FOXP3* overexpression, and high *FOXP3/CD8* ratio in NMIBC. As well, immune checkpoint alterations might emerge at invasive steps of carcinogenesis, which suggests their role in tumor escape from the immune response. We identified a 3 gene signature associated with both RFS and OS in MIBC; patients with poor prognosis because of this gene profile may benefit from new adjuvant strategies and/or intense follow-up.

Modification of the tumor microenvironment by combined administration of new immunotherapies represents a promising pharmacological approach, as suggested by our results. However, considering the cost of the drugs, their accurate prescription is warranted and response to treatment should be correctly assessed. *CD8* may be the best prognostic marker, well reflecting the immunogenicity of the tumor and easily assessable. Large prospective clinical studies with molecular evaluation of tumors are needed.

Materials and methods

Patients and Samples

We analyzed 154 urothelial carcinoma samples from patients who had undergone transurethral bladder resection or radical cystectomy in our hospital between January 2002 and January

2006. Specimens of normal bladder tissue from 15 patients undergoing surgery unrelated to bladder tumors (transurethral resection of the prostate or prostatic adenectomy) were used as normal bladder tissue. All patients signed an informed consent. This study received approval from an institutional review board and was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

Immediately after surgery, tumor samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C (for RNA extraction) and fixed in formaldehyde. Each tumor was reviewed by 2 pathologists (DD and MS) who were blinded to clinical outcomes. Tumors were re-staged according to the 2009 American Joint Committee on TNM classification of bladder tumors and graded according to the 2004 World Health Organization grading scheme.^{18,19}

Data were obtained from the patients' medical records. Patients were followed up according to current guidelines.

Gene selection

From the literature on antitumor immunity, we selected 33 genes involved in the immune process, including PD-1, CTLA4, the pathways indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) domains (TIGIT), tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily members (including TNF superfamily, member 4 [OX40] and its ligand OX40L), and other specific cellular markers of immune response such as CD4, CD8, interferon γ (INF γ), transforming growth factor- β 3 (TGFB3) and interleukin 10 (IL-10) (Supplemental data 6). We chose one endogenous RNA control gene, namely TBP (GenBank Accession No. NM_003194) which encodes the TATA box-binding protein.

Real-time quantitative RT-PCR

The theoretical basis, primers and PCR consumables, RNA extraction, cDNA synthesis, and PCR reaction conditions have been described previously in detail.²⁰

Quantitative values were obtained from the cycle threshold (Ct) number at which the increase in signal associated with exponential growth of PCR products was first detected. Each sample was normalized to TBP level. Results, expressed as N-fold differences in target gene expression relative to the TBP gene, and termed "Ntarget," were determined as $N_{\text{target}} = 2^{\Delta\text{Ct}_{\text{sample}}}$, where the ΔCt value of the sample was determined by subtracting the Ct value of the target gene from the Ct value of the TBP gene. Ntarget values for samples were normalized such that the median of the 15 normal bladder Ntarget values was 1. For 2 genes, namely TNFRSF18 and IDO2, because of low expression, the mRNA values were normalized such that a Ct value of 35 was set to 1.

For each investigated gene, mRNA values ≥ 3 were considered to represent overexpression and ≤ 0.33 under-expression. We previously used the same cut-off value for altered tumor gene expression.²⁰

Analysis of protein expression

Representative blocks of paraffin-embedded tumor were available for 108 patients (50 NMIBC and 58 MIBC). For each

tumor, 2 observers, including at least 1 expert pathologist, selected the tumor block containing the highest density of immune cells on hematoxylin and eosin-safranin-stained slides. Briefly, serial 5- μm tissue sections were deparaffinized, rehydrated and pretreated in appropriate buffer for antigen retrieval by using a Leica automat. Tissue slides were then incubated at 48°C with a primary antibody, anti-CD8 (SP16, Spring Biosciences) or anti-FOXP3 (263A/E7, Abcam) (both 1:100), then appropriate secondary antibodies.

We used a semi-quantitative analysis of protein expression with the following scores: 0 (no positive cells), 1+ (few positive cells) and 2+ (numerous positive immune cells). The same score was used for analysis of CD8 and FOXP3 on tumor immune infiltrating cells. All quantification was performed with blinding to patient status by an expert pathologist (D.D.).

Statistical analysis

The clinicopathological features of NMIBC and MIBC were tested for association with tumor recurrence and survival by using Student's *t* test for continuous variables or chi-square test for categorical variables. Data are presented as median (range). The associations between clinical and histological variables and mRNA levels were tested by the non-parametric Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis H tests (a link between 1 categorical and 1 quantitative variable).

Unsupervised hierarchical cluster analyses were performed using WARD algorithm to identify homogenous tumor groups regarding molecular data.

Overall survival (OS) was calculated from the date of surgery until death or the last follow-up. Recurrence-free survival (RFS) was defined as the time from the date of surgery until the first local relapse or first metastasis. For NMIBC, progression-free survival (PFS) was defined as the time from the date of surgery until progression to muscle-invasive disease. Patients were censored if they had not experienced the end-point of interest at the time of last follow-up. Survival curves were derived by the Kaplan-Meier method, with the log-rank test used to compare survival between groups.

Cox proportional-hazards regression was used to estimate hazard ratios (HRs) and their 95% confidence intervals (95% CIs) for covariates associated with RFS, PFS or OS showing significance at $p < 0.05$ on univariate analysis.

Differences between 2 populations were judged significant at confidence levels greater than 95% ($p < 0.05$).

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

ORCID

Sophie Vacher  <http://orcid.org/0000-0002-0042-6023>

References

1. Powles T. Immune checkpoint inhibitors for urologic cancer: The tip of the iceberg? *Eur Urol.* 2015;68:280-2. doi:10.1016/j.eururo.2015.03.022; PMID:25800945

2. Blank CU. The perspective of immunotherapy: New molecules and new mechanisms of action in immune modulation. *Curr Opin Oncol.* 2014;26:204-14. doi:10.1097/CCO.0000000000000054. PMID:24424272
3. Becht E, Goc J, Germain C, Giraldo NA, Dieu-Nosjean M-C, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Shaping of an effective immune microenvironment to and by cancer cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63:991-7. doi:10.1007/s00262-014-1590-3. PMID:25112529
4. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002;8:793-800. doi:10.1038/nm0902-1039c. PMID:12091876
5. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56:1173-82. doi:10.1007/s00262-006-0266-z. PMID:17186290
6. Browne SK, Burbelo PD, Chetchotaisakd P, Suputtamongkol Y, Kiertiburanakul S, Shaw PA, Kirk JL, Jutivorakool K, Zaman R, Ding L, et al. Adult-onset immunodeficiency in Thailand and Taiwan. *N Engl J Med.* 2012;367:725-34. doi:10.1056/NEJMoa1111160. PMID:22913682
7. Suzuki H, Chikazawa N, Tasaka T, Wada J, Yamasaki A, Kitaura Y, Sozaki M, Tanaka M, Onishi H, Morisaki T, et al. Intratumoral CD8 (+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59:653-61. doi:10.1007/s00262-009-0781-9. PMID:19908042
8. Niu J, Jiang C, Li C, Liu L, Li K, Jian Z, Gao T. Foxp3 expression in melanoma cells as a possible mechanism of resistance to immune destruction. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:1109-18. doi:10.1007/s00262-011-1025-3. PMID:21547596
9. Józwicki W, Brożyna AA, Siedkiera J, Słominski AT. Frequency of CD4+CD25+Foxp3+ cells in peripheral blood in relation to urinary bladder cancer malignancy indicators before and after surgical removal. *Oncotarget.* 2016;7:11450-62. doi:10.18632/oncotarget.7199. PMID:26862849
10. Shen Z, Zhou S, Wang Y, Li R, Zhong C, Liang C, Sun Y. Higher intratumoral infiltrated Foxp3+ Treg numbers and Foxp3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136:1585-95. doi:10.1007/s00432-010-0816-9. PMID:20221835
11. Horn T, Laus J, Seitz AK, Maurer T, Schmid SC, Wolf P, Haller B, Winkler M, Retz M, Nawroth R, et al. The prognostic effect of tumour-infiltrating lymphocytic subpopulations in bladder cancer. *World J Urol.* 2016;34:181-7. doi:10.1007/s00345-015-1615-3. PMID:26055646
12. Shinto E, Hase K, Hashiguchi Y, Sekizawa A, Ueno H, Shikina A, Kajiwara Y, Kobayashi H, Ishiguro M, Yamamoto J. CD8+ and FOXP3+ tumor-infiltrating T cells before and after chemoradiotherapy for rectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2014;21(Suppl 3):S414-21. doi:10.1245/s10434-014-3584-y. PMID:24566864
13. Józwicki W, Brożyna AA, Siedkiera J, Słominski AT. Changes in Immunogenicity during the Development of Urinary Bladder Cancer: A Preliminary Study. *Int J Mol Sci.* 2016;17:285. doi:10.3390/ijms17030285. PMID:26927070
14. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, Yu X, Huseni M, Yang Y, Park S, Javinal V, Chiu H, Irving B, et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell.* 2014;26:923-37. doi:10.1016/j.ccr.2014.10.018. PMID:25465800
15. Johnston RJ, Yu X, Grogan JL. The checkpoint inhibitor TIGIT limits antitumor and antiviral CD8(+) T cell responses. *Oncoimmunology.* 2015;4:e1036214. doi:10.1080/2162402X.2015.1036214. PMID:26405604
16. Mak MP, Tong P, Diao L, Cardnell RJ, Gibbons DL, William WN, Skoulidis F, Parra ER, Rodriguez-Canales J, Wistuba II, et al. A Patient-Derived, Pan-Cancer EMT Signature Identifies Global Molecular Alterations and Immune Target Enrichment Following Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Clin Cancer Res.* 2016;22:609-20. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0876. PMID:26420858
17. Aspeslagh S, Postel-Vinay S, Rusakiewicz S, Soria J-C, Zitvogel L, Marabelle A. Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy. *Eur J Cancer.* 2016;52:50-66. doi:10.1016/j.ejca.2015.08.021. PMID:26645943
18. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. *UICC Int. Union Cancer.* 2009. p. 262-5.
19. Molinié V. Classification of bladder tumors in 2006. *Prog Urol FMC.* 2006;16:7-10.
20. Pignot G, Bieche I, Vacher S, Güet C, Vieillefond A, Debré B, Lidereau R, Amsellem-Ouazana D. Large-scale real-time reverse transcription-PCR approach of angiogenic pathways in human transitional cell carcinoma of the bladder: identification of VEGFA as a major independent prognostic marker. *Eur Urol.* 2009;56:678-88. doi:10.1016/j.euro.2008.05.027. PMID:18513850

II. ONCOGENES ALTÉRÉS DANS LES TUMEURS DE VESSIE

Nous avons choisi d'étudier les altérations concernant les oncogènes avec l'hypothèse que différents mécanismes d'activation sont possibles pour un même gène (amplifications, mutations activatrices, surexpression).

A partir d'une revue de la littérature récente, notamment le *TCGA*^{26,27,72,73}, nous avons sélectionné un panel de gènes selon les critères de sélection suivants :

- pour les gènes candidats situés au niveau de régions d'amplification en *CGH-array*, une amplification significative retrouvée dans au moins 8% des TVIM : [*YWHAZ* (22%), *E2F3* (20%), *SOX4* (20%), *MYC* (13%), *PVRL4* (19%), *PPARG* (17%), *PABPC1* (17%), *MYC* (13%), *CCNE1* (12%), *BCL2L1* (11%), *EGFR* (11%), *CCND1* (10%), *ZNF703* (10%), *GDI2* (10%), *MDM2* (9%), *PIK3CA* (8%)]

et/ou

- pour les gènes mutés, une mutation activatrice retrouvée dans au moins 8% des TVIM : [*PIK3CA* (20%), *ERCC2* (12%), *FGFR3* (12%), *ERBB3* (11%), *FBXW7* (10%), *RXRA* (9%), *NFE2L2* (8%), *FRS2* (8%)]

et/ou

- une surexpression ARN retrouvée dans au moins 8% des TVIM : [*PVRLA4* (26%), *PABPC1* (26%), *YWHAZ* (26%), *SOX4* (25%), *E2F3* (24%), *GDI2* (21%), *BCL2L1* (21%), *PAIP1* (19%), *EGFR* (18%), *FRS2* (18%), *ZNF703* (18%), *CCNE1* (17%), *PRKCI* (14%), *PIK3CA* (13,5%), *ERBB3* (12%), *PPARG* (12%), *CCND1* (11%), *ERBB2* (10%), *MDM2* (9%), *ERCC2* (8,7%)]

- Par ailleurs sur les données de la littérature récente, 3 gènes ont également été intégrés dans l'analyse : *MDM4*, *HRAS* et *TACC3*^{26,59,72,74}.
- Nous avons également étudié, en parallèle, l'expression du gène *MKI67* codant l'antigène Ki67 dans les 128 échantillons tumoraux et les 21 échantillons normaux.

Au total, nous avons sélectionné un panel de 29 oncogènes^{26,59,60,72,74} que nous avons caractérisés dans une série bien définie de 61 TVNIM et de 67 TVIM puis corrélés aux données cliniques et notamment de survie. L'objectif de cette 2^{ème} étude était d'identifier les altérations géniques liées au pronostic, en particulier dans les TVNIM, et pouvant orienter vers de nouvelles thérapies plus personnalisées.

Une mutation des gènes a été retrouvée chez 4,5% (2/44) des TVNIM et 1,7% (1/59) des TVIM pour *HRAS*, 50,0% (22/44) des TVNIM et 10,2% (6/59) des TVIM pour *FGFR3*, 16,7% (10/60) des TVNIM et 11,9% (8/67) des TVIM pour *PIK3CA*. Les mutations étudiées (*HRAS*, *FGFR3* et *PIK3CA*) n'étaient pas associées au pronostic, que ce soit en termes de récurrence ou de progression des TVNM et en termes de RFS ou d'OS des TVIM.

Les antécédents de TVNIM, les expressions de *RXRA* et *FGFR3* sont restés des facteurs pronostiques indépendamment significativement associés à la RFS ($p=0,0045$, $p=0,0022$ et $p=0,0069$, respectivement). L'expression de *RXRA* est restée un facteur pronostique indépendamment significativement associé à la PFS ($p=0,0068$).

Nous avons, dans un deuxième temps, analysé (classification hiérarchique non supervisée) nos 61 TVNIM selon le profil d'expression des 3 gènes associés à la survie (*RXRA*, *FGFR3* et *CCNE1*) et identifié 4 groupes (A, B, C, D) composés de 15, 15, 16 et 15 patients respectivement. Le groupe A se caractérise par une

faible expression de *RXRA*, une expression normale de *FGFR3* et *CCNE1* ; le groupe B par une expression normale de *RXRA*, une faible expression de *FGFR3* et une surexpression marquée de *CCNE1* ; le groupe C par une expression normale de *RXRA*, une surexpression marquée de *FGFR3* et une expression élevée de *CCNE1* ; et enfin le groupe D par une expression élevée de *RXRA*, une expression élevée de *FGFR3* et une faible expression de *CCNE1* (Figure 1 de l'article ci-dessous).

Sur les 29 gènes étudiés, l'expression de *FGFR3* était significativement associée à la réponse au traitement par BCG.

Concernant les données protéiques, l'expression de *RXRA* était nucléaire dans les TVNIM mais exclusivement cytoplasmique dans les TVIM. Pour *FGFR3* et *CCNE1*, le marquage était nucléaire aussi bien dans les TVNIM que dans les TVIM. Il existe une corrélation significative entre expression génique (ARN) et expression protéique (immunohistochimique) pour *FGFR3* mais pas pour *RXRA* et *CCNE1*.

L'article ci-dessous sur ce travail a récemment été soumis à Scientific reports.

**IDENTIFICATION OF A 3-GENE SIGNATURE PREDICTIVE OF RISK OF
RECURRENCE AND MUSCLE-INVASIVE PROGRESSION IN NON-MUSCLE-
INVASIVE BLADDER CANCER**

Le Goux Constance^{1,2}, Vacher Sophie¹, Schnitzler Anne¹, Barry Delongchamps Nicolas³, Zerbib Marc³, Peyromaure Michaël³, Mathilde Sibony⁴, Yves Allory⁵, Bieche Ivan^{1,6}, Damotte Diane^{4,7}, Pignot Géraldine⁸

¹ Pharmacogenomics unit, department of Genetic, Curie Institute, Paris, France

² Paris Sud University, Bicêtre Hospital, department of Urology, Le Kremlin-Bicêtre, France

³ Paris Descartes University, Cochin Hospital, department of Urology, Paris, France

⁴ Paris Descartes University, Cochin Hospital, department of Pathology, Paris, France

⁵ Department of Pathology, Curie Institute, Paris, France

⁶ Inserm U1016, Cochin Institute, University Paris Descartes, Paris, France.

⁷ Cancer, Immune Control, and Escape, INSERM U1138, Cordeliers Research Center

⁸ Institut Paoli-Calmettes, department of Surgical Oncology, Marseille, France

Running title: 3 gene-signature associated with prognosis of NMIBC

CONFLICT-OF-INTEREST AND FINANCIAL DISCLOSURE: None

Abbreviations: BCG = Bacillus Calmette-Guerin, cDNA = complementary deoxyribonucleic acid, IHC = immunohistochemistry, NMIBC = non-muscle-invasive bladder cancer, MIBC = muscle-invasive bladder cancer, mRNA = messenger ribonucleic acid, OS = overall survival, PFS = progression-free survival, RFS = recurrence-free survival, RT-PCR = reverse-transcriptase polymerase chain reaction, TCGA = The Cancer Genome Atlas, TNM = tumor-node metastasis

ABSTRACT

This study evaluated the prognostic value of a panel of 29 oncogenes derived from the analysis of The Cancer Genome Atlas TCGA data or from the recent literature on bladder tumors on a well-characterized series of muscle-invasive-bladder-cancer (MIBC) and non-MIBC (NMIBC) samples and tried to identify molecular prognostic markers.

We analyzed 128 samples of bladder tumors from patients between 2002 and 2007.

Mutations of *HRAS*, *FGFR3* and *PIK3CA* were found in 2.9%, 27.2% and 14.2% tumor samples, respectively. On multivariate analysis, *RXR4* and *FGFR3* levels were associated with recurrence-free survival (RFS) ($p=0.0022$ and $p=0.0069$) and *RXR4* level was associated with progression to muscle-invasive disease ($p=0.0068$). *FGFR3* overexpression was associated with reduced response to Bacillus Calmette-Guerin treatment ($p=0.037$). We identified a 3-gene molecular signature associated with NMIBC prognosis. On multivariate analysis, *ERCC2* overexpression was associated with RFS ($p=0.0011$) and *E2F3* and *EGFR* overexpression were associated with overall survival ($p=0.014$ and $p=0.035$) for MIBC. RT-PCR findings were confirmed by IHC for *FGFR3*.

Genomic alterations in MIBC revealed in TCGA data also concern NMIBC and seem to be associated with prognosis in terms of recurrence and progression. Correcting these alterations by targeted therapies seems a promising pharmacological approach.

Keywords: non-muscle-invasive bladder cancer; molecular markers; prognostic factor; survival

INTRODUCTION

Bladder cancer is the sixth most common cause of cancer mortality, and its incidence has increased markedly in recent decades. About two-thirds of newly diagnosed cases are non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC). These cases have a 60% recurrence rate, and 10% evolve to muscle-invasive tumors. Muscle-invasive bladder cancer (MIBC) represents one-third of cases at diagnosis. Survival greatly differs between early and advanced bladder cancer.

Contrary to what was previously thought, focal and recurrent gene amplifications are common in urothelial bladder carcinomas. Recently, genome analysis revealed new genomic alterations that could be used as markers in clinical oncology. Analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) data revealed 27 amplified regions ¹. Integrated analysis of the various genetic alterations described in TCGA revealed 3 main deregulated signaling pathways in bladder tumors and potential therapeutic targets. Deregulations affecting the cell cycle were found in 93% of cases, those affecting the PI3K/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in 72% of cases, and those involved in chromatin remodeling in 64% of cases ¹. However, there are few comparative data in the literature regarding these alterations in NMIBC, probably because of the constraints associated with the sampling procedures inherent in NMIBC.

We aimed to identify genes whose abnormalities are related to prognosis, especially NMIBC prognosis. We studied a panel of 29 oncogenes derived from the analysis of TCGA data or from the recent literature on bladder tumors ¹⁻⁷ on a well-characterized series of NMIBC and MIBC samples and tried to identify molecular prognostic markers.

RESULTS

DNA mutations

NMIBC and MIBC samples showed mutation in *HRAS* in 4.5% (2/44) and 1.7% (1/59) cases, respectively; in *FGFR3* in 50.0% (22/44) and 10.2% (6/59) cases, respectively and in *PIK3CA* in 16.7% (10/60) and 11.9% (8/67) cases, respectively (Table 1 and Suppl. data 1). DNA mutations were not associated with prognosis in terms of recurrence or progression of NMIBC or in terms of RFS or OS of MIBC (data not shown).

Table 1:**a) Clinical and pathological characteristics of the 61 non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) samples**

		No recurrence		Recurrence		Muscle-invasive progression	
		n (%)	n (%)	n (%)	p [*]	n (%)	p ^{**}
Total population		61 (100)	19 (31.1)	32 (52.5)		10 (16.4)	
Age (years)	≥60	45 (73.8)	13 (68.4)	22 (68.8)	0.98	10 (100.0)	0.0095
	<60	16 (26.2)	6 (31.6)	10 (31.2)		0 (0.0)	
Sex	Male	54 (88.5)	17 (89.5)	28 (88.9)	0.81	9 (90.0)	0.70
	Female	7 (11.5)	2 (10.5)	4 (11.1)		1 (10.0)	
Smoking status	Non-smoker	27 (44.3)	6 (31.6)	16 (50.0)	0.20	5 (50.0)	0.96
	Smoker	34 (55.7)	13 (68.4)	16 (50.0)		5 (50.0)	
History of NMIBC	No	34 (55.7)	16 (84.2)	14 (43.7)	0.0045	4 (40.0)	0.45
	Yes	27 (44.3)	3 (15.8)	18 (56.3)		6 (60.0)	
Cis associated	No	58 (95.1)	19 (100.0)	31 (96.9)	0.79	8 (80.0)	0.015
	Yes	3 (4.9)	0 (0.0)	1 (3.1)		2 (20.0)	
Grade	Low	25 (41.0)	10 (52.6)	14 (43.8)	0.48	1 (10.0)	0.029
	High	36 (59.0)	9 (47.4)	18 (56.2)		9 (90.0)	
Tumor stage	Ta	39 (63.9)	13 (68.4)	23 (71.9)	0.79	3 (30.0)	0.015
	T1	22 (36.1)	6 (31.6)	9 (28.1)		7 (70.0)	
HRAS mutation ^f	No	42 (95.5)	13 (92.9)	21 (95.5)	0.68	8 (100.0)	0.80
	Yes	2 (4.5)	1 (7.1)	1 (4.5)		0 (0.0)	
FGFR3 mutation ^f	No	22 (50.0)	7 (50.0)	11 (50.0)	1.00	4 (50.0)	1.00
	Yes	22 (50.0)	7 (50.0)	11 (50.0)		4 (50.0)	
PIK3CA mutation ^{ff}	No	50 (83.3)	13 (72.2)	28 (87.5)	0.18	9 (90.0)	0.53
	Yes	10 (16.7)	5 (27.8)	4 (12.5)		1 (10.0)	

^{*} chi-square test (Recurrence versus No recurrence); ^{**} chi-square test (Muscle-invasive progression versus the others)

^f Information available for 44 patients; ^{ff} Information available for 60 patients

b) Clinical and pathological characteristics of the 67 MIBC samples

		Recurrence-free survival			Overall survival	
		n (%)	n (%) ^a	p [*]	n (%) ^b	p [*]
Total population		67 (100)	46 (68.7)		40 (59.7)	
Age (years)	≥60	49 (73.1)	39 (79.6)	0.001	34 (69.4)	0.008
	<60	18 (26.9)	7 (38.9)		6 (33.3)	
Sex	Male	53 (79.1)	34 (64.2)	0.16	32 (60.4)	0.83
	Female	14 (20.9)	12 (85.7)		8 (57.1)	
Smoking status	Non-smoker	15 (22.4)	13 (86.7)	0.09	12 (80.0)	0.07
	Smoker	52 (77.6)	33 (63.5)		28 (53.8)	
History of NMIBC	No	40 (59.7)	31 (77.5)	0.06	25 (62.5)	0.57
	Yes	27 (40.3)	15 (55.6)		15 (55.6)	
Tumor stage	T2	25 (37.3)	17 (68.0)	0.93	10 (40.0)	0.01
	≥T3	42 (62.7)	29 (69.0)		30 (71.4)	
N status	N-	42 (62.7)	25 (59.5)	0.06	19 (45.2)	0.002
	N+	25 (37.3)	21 (84.0)		21 (84.0)	
HRAS mutation ^f	No	58 (98.3)	44 (97.8)	0.57	38 (100.0)	0.17
	Yes	1 (1.7)	1 (2.2)		0 (0.0)	
FGFR3 mutation ^f	No	53 (89.8)	35 (66.0)	0.98	30 (85.7)	0.64
	Yes	6 (10.2)	4 (66.7)		4 (66.7)	
PIK3CA mutation	No	59 (88.1)	41 (89.1)	0.69	35 (87.5)	0.86
	Yes	8 (11.9)	5 (10.9)		5 (12.5)	

^a First recurrence (local or metastatic); ^b Death; ^{*} chi-square test

^f Information available for 59 patients

Suppl. data 1: Frequency of mutations for *HRAS*, *FGFR3* and *PIK3CA*

a) Frequency of *HRAS* mutations

<i>HRAS</i>	Codon 12-13 n (%)	Codon 61 n (%)	Total n (%)
All tumors (n=103)	3 (2.9)	0 (0.0)	3 (2.9)
NMIBC (n=44)	2 (4.5)	0 (0.0)	2 (4.5)
MIBC (n=59)	1 (1.7)	0 (0.0)	1 (1.7)

b) Frequency of *FGFR3* mutations

<i>FGFR3</i>	Total n (%)
All tumors (n=103)	28 (27.2)
NMIBC (n=44)	22 (50.0)
MIBC (n=59)	6 (10.2)

c) Frequency of *PIK3CA* mutations

<i>PIK3CA</i>	Exon 9 n (%)	Exon 20 n (%)	Total n (%)
All tumors (n=127)	13 (10.2)	6 (4.7)	18 (14.2)
NMIBC (n 60)	10 (16.7)	0 (0.0)	10 (16.7)
MIBC (n=67)	3 (4.5)	6 (9.0)	8 (11.9)

Gene expression

For most genes except *PRKCI*, *FBXW7*, *E2F3*, *SOX4*, *YWHAZ*, *GDI2*, *FRS2*, *ERCC2* and *BCL2L1*, the expression profile differed between MIBC and NMIBC samples (Suppl. data 2).

In NMIBC samples, 24/29 (82.8%) genes were significantly deregulated as compared with normal bladder tissue ($p < 0.05$) (Suppl. data 2); 4 genes showed significant differences in expression by stage (pTa versus pT1), 4 by grade (low versus high) and 5 by stage and grade (*TACC3*, *FBXW7*, *SOX4*, *YWHAZ*, *Ki67*) (Suppl. data 3).

In MIBC samples, 25/29 genes (86.2%) were significantly deregulated as compared with normal bladder tissue ($p < 0.05$) (Suppl. data 2).

Suppl. data 2: mRNA expression of the 29 studied genes in normal and tumor bladder samples

GENES	Normal (n=21)	NMIBC (n=61)	Underexpression ^a n (%)	Overexpression ^b n (%)	MIBC (n=67)	Underexpression ^a n (%)	Overexpression ^b n (%)	MIBC/NMIBC p-value ^{**}	AUC [‡]	NMIBC/N p-value ^{**}	AUC [‡]	MIBC/N p-value ^{**}	AUC [‡]
PVRL4	1.00 [0.00-34.48]*	144.81 [33.37-751.90]*	0 (0.0)	61 (100.0)	70.26 [0.00-820.53]*	2 (3.0)	61 (91.0)	0.00000022	0.234	<10 ⁻⁷	0.998	0.00000015	0.882
MDM4	1.00 [0.59-2.32]	0.98 [0.50-2.21]	0 (0.0)	0 (0.0)	0.80 [0.26-1.72]	1 (1.5)	0 (0.0)	0.00049	0.327	0.86	0.487	0.0079	0.307
NFE2L2	1.00 [0.32-2.35]	2.00 [0.60-6.58]	0 (0.0)	11 (18.0)	1.58 [0.47-6.17]	0 (0.0)	5 (7.5)	0.0026	0.345	0.00018	0.851	0.0035	0.712
PPARG	1.00 [0.91-1.86]	25.02 [4.51-55.73]	0 (0.0)	61 (100.0)	8.94 [0.13-174.90]	3 (4.5)	41 (61.2)	<10 ⁻⁷	0.169	<10 ⁻⁷	0.993	0.012	0.682
PIK3CA	1.00 [0.37-2.29]	0.54 [0.21-2.01]	1 (1.6)	0 (0.0)	0.67 [0.32-2.90]	1 (1.5)	0 (0.0)	0.00052	0.678	0.0000014	0.146	0.000037	0.200
PRKCI	1.00 [0.02-4.21]	4.01 [0.00-12.39]	1 (1.6)	48 (78.7)	4.16 [1.76-20.08]	0 (0.0)	53 (79.1)	0.29	0.555	<10 ⁻⁷	0.941	<10 ⁻⁷	0.967
FGFR3	1.00 [0.65-2.41]	25.76 [0.89-187.25]	0 (0.0)	57 (93.4)	2.56 [0.00-47.52]	14 (20.9)	32 (47.8)	<10 ⁻⁷	0.148	<10 ⁻⁷	0.987	0.00044	0.755
TACC3	1.00 [0.23-18.12]	3.97 [0.69-15.59]	0 (0.0)	40 (65.6)	7.80 [0.90-22.20]	0 (0.0)	58 (86.6)	0.0000049	0.734	0.0000018	0.851	<10 ⁻⁷	0.914
FBXW7	1.00 [0.61-2.05]	1.06 [0.57-2.01]	0 (0.0)	0 (0.0)	1.07 [0.42-3.16]	0 (0.0)	1 (1.5)	0.23	0.562	0.88	0.489	0.65	0.533
PAIP1	1.00 [0.80-2.10]	0.85 [0.10-1.96]	1 (1.6)	0 (0.0)	1.02 [0.46-3.43]	0 (0.0)	2 (3.0)	0.00057	0.677	0.000012	0.179	<10 ⁻⁷	0.453
E2F3	1.00 [0.18-2.09]	2.22 [0.81-4.14]	0 (0.0)	10 (16.4)	2.41 [0.75-13.46]	0 (0.0)	24 (35.8)	0.23	0.561	<10 ⁻⁷	0.953	<10 ⁻⁷	0.934
SOX4	1.00 [0.61-1.07]	2.55 [0.76-5.15]	0 (0.0)	19 (31.1)	2.10 [0.31-14.79]	1 (1.5)	20 (29.9)	0.44	0.461	<10 ⁻⁷	0.981	<10 ⁻⁷	0.958
EGFR	1.00 [0.28-1.89]	0.99 [0.20-3.08]	2 (3.3)	1 (1.6)	1.29 [0.01-8.64]	5 (7.5)	11 (16.4)	0.025	0.615	0.88	0.511	0.049	0.643
ZNF703	1.00 [0.34-4.48]	1.07 [0.08-10.23]	5 (8.2)	7 (11.5)	0.60 [0.10-13.45]	12 (17.9)	4 (6.0)	0.0024	0.344	0.63	0.535	0.035	0.347
PABPC1	1.00 [0.40-3.91]	2.18 [0.99-4.51]	0 (0.0)	9 (14.8)	1.21 [0.26-11.13]	1 (1.5)	9 (13.4)	0.0000085	0.272	<10 ⁻⁷	0.898	0.13	0.609
YWHAZ	1.00 [0.76-3.44]	1.38 [0.68-3.69]	0 (0.0)	5 (8.2)	1.45 [0.46-7.84]	0 (0.0)	8 (11.9)	0.74	0.517	0.0013	0.736	0.0021	0.723
MYC	1.00 [0.35-8.88]	1.01 [0.08-3.68]	3 (4.9)	3 (4.9)	1.58 [0.10-8.05]	3 (4.5)	10 (14.9)	0.0015	0.663	0.56	0.543	0.016	0.675
RXRA	1.00 [0.49-2.29]	2.42 [0.41-9.23]	0 (0.0)	20 (32.8)	1.41 [0.11-9.15]	2 (3.0)	10 (14.9)	<10 ⁻⁷	0.227	<10 ⁻⁷	0.930	0.044	0.646
GDI2	1.00 [0.16-2.48]	2.26 [0.92-3.44]	0 (0.0)	9 (14.8)	2.42 [1.10-5.59]	0 (0.0)	19 (28.4)	0.29	0.554	<10 ⁻⁷	0.948	<10 ⁻⁷	0.949
Ki67	1.00 [0.00-93.03]	33.85 [1.45-84.55]	0 (0.0)	57 (93.4)	53.80 [2.39-197.75]	0 (0.0)	66 (98.5)	0.000019	0.719	<10 ⁻⁷	0.923	<10 ⁻⁷	0.947
CCND1	1.00 [0.48-2.16]	3.34 [0.18-19.98]	2 (3.3)	35 (67.4)	1.37 [0.10-31.80]	11 (16.4)	11 (16.4)	0.0000011	0.228	<10 ⁻⁷	0.901	0.25	0.638
HRAS	1.00 [0.48-2.10]	1.44 [0.63-6.00]	0 (0.0)	3 (4.9)	1.27 [0.35-7.47]	0 (0.0)	5 (7.5)	0.037	0.393	0.00018	0.775	0.057	0.638
ERBB3	1.00 [0.38-1.28]	2.36 [0.54-8.77]	0 (0.0)	11 (18.0)	1.07 [0.00-10.89]	13 (19.4)	5 (7.5)	<10 ⁻⁷	0.19	<10 ⁻⁷	0.993	0.00000094	0.856
MDM2	1.00 [0.59-1.59]	2.01 [0.94-11.42]	0 (0.0)	12 (19.7)	1.39 [0.38-13.63]	0 (0.0)	9 (13.4)	0.00019	0.309	<10 ⁻⁷	0.936	0.0044	0.707
FRS2	1.00 [0.60-1.91]	0.71 [0.40-27.38]	0 (0.0)	1 (1.6)	0.78 [0.34-6.53]	0 (0.0)	1 (1.5)	0.74	0.517	0.0000056	0.166	0.0016	0.271
ERBB2	1.00 [0.95-1.37]	2.73 [0.81-17.32]	0 (0.0)	24 (39.3)	1.35 [0.01-110.73]	9 (13.4)	18 (26.9)	0.00023	0.311	<10 ⁻⁷	0.979	0.000027	0.805
CCNE1	1.00 [0.70-1.21]	7.55 [1.98-55.39]	0 (0.0)	58 (95.1)	11.30 [1.04-117.10]	0 (0.0)	60 (89.6)	0.04	0.605	<10 ⁻⁷	0.970	<10 ⁻⁷	0.938
ERCC2	1.00 [0.31-2.47]	1.78 [0.52-6.10]	0 (0.0)	8 (13.1)	1.71 [0.71-6.03]	0 (0.0)	8 (11.9)	0.61	0.474	0.000006	0.833	0.000035	0.801
BCL2L1	1.00 [0.48-1.93]	1.42 [0.68-4.45]	0 (0.0)	2 (3.3)	1.55 [0.39-6.23]	0 (0.0)	5 (7.5)	0.26	0.558	0.00069	0.749	0.00054	0.751

N=normal

* Median value [range]

** Kruskal-Wallis H test

‡ Area under the receiver operating characteristic curve (AUC)

Suppl. data 3: mRNA expression of the 29 studied genes in the NMIBC subgroups

	All NMIBC tumors (n=61)	pTa low grade (n=25)	pTa high grade (n=14)	pT1 high grade (n=22)	p** pTa versus pT1	p** low versus high grade
PVRL4	144.81 [33.37-751.90]*	126.08 [54.94-440.42]*	226.62 [104.72-638.75]*	141.03 [33.37-751.90]*	0.60	0.05
MDM4	0.98 [0.50-2.21]	1.04 [0.71-2.00]	1.08 [0.57-1.77]	0.88 [0.50-2.21]	0.20	0.88
NFE2L2	2.00 [0.60-6.58]	1.97 [0.99-3.90]	2.23 [1.06-3.74]	2.09 [0.60-6.58]	0.98	0.58
PPARG	25.02 [4.51-55.73]	25.44 [11.82-37.46]	25.73 [12.89-55.73]	24.38 [4.51-35.34]	0.28	0.55
PIK3CA	0.54 [0.21-2.01]	0.54 [0.21-1.11]	0.51 [0.35-1.51]	0.62 [0.38-2.01]	0.03	0.17
PRKCI	4.01 [0.00-12.39]	3.68 [0.00-7.57]	4.03 [1.54-11.16]	4.51 [0.80-12.39]	0.14	0.15
FGFR3	25.76 [0.89-187.25]	27.91 [3.25-79.68]	30.55 [0.89-68.89]	17.98 [1.40-187.25]	0.03	0.17
TACC3	3.97 [0.69-15.59]	2.39 [0.69-12.08]	4.76 [1.36-13.43]	6.63 [1.39-15.59]	0.008	0.001
FBXW7	1.06 [0.57-2.01]	0.94 [0.57-1.46]	1.08 [0.60-1.40]	0.19 [0.64-2.01]	0.04	0.03
PAIP1	0.85 [0.10-1.96]	0.80 [0.58-1.48]	0.81 [0.10-1.09]	0.84 [0.22-1.80]	0.09	0.28
E2F3	2.22 [0.81-4.14]	2.12 [0.81-3.25]	2.23 [0.16-6.65]	0.90 [0.43-1.96]	0.27	0.004
SOX4	2.55 [0.76-5.15]	1.73 [0.88-4.20]	2.67 [1.24-5.15]	2.84 [0.76-4.71]	0.04	0.007
EGFR	0.99 [0.20-3.08]	0.84 [0.39-2.07]	0.80 [0.33-1.74]	1.46 [0.20-3.08]	0.06	0.35
ZNF703	1.07 [0.08-10.23]	0.86 [0.21-3.08]	1.52 [0.57-3.79]	0.94 [0.08-10.23]	0.96	0.03
PABPC1	2.18 [0.99-4.51]	2.16 [0.99-3.54]	2.31 [1.43-3.68]	2.12 [1.26-4.51]	0.55	0.24
YWHAZ	1.38 [0.68-3.69]	1.29 [0.83-2.48]	1.51 [0.68-1.93]	1.69 [0.75-3.69]	0.01	0.002
MYC	1.01 [0.68-3.08]	0.94 [0.29-1.82]	1.17 [0.36-3.40]	0.92 [0.08-3.68]	0.78	0.13
RXRA	2.42 [0.41-9.23]	2.42 [0.41-5.82]	2.45 [1.16-9.23]	2.31 [0.79-5.79]	0.57	0.72
GDI2	2.26 [0.92-3.44]	2.25 [1.28-3.44]	2.41 [1.13-3.07]	2.22 [0.92-3.23]	0.01	0.59
KI67	33.85 [1.45-84.55]	17.64 [1.45-75.16]	38.23 [6.96-50.00]	35.67 [1.80-84.55]	0.01	0.002
CCND1	3.34 [0.18-19.98]	3.32 [0.43-19.98]	3.13 [1.27-10.71]	3.43 [0.18-17.88]	0.72	0.71
HRAS	1.44 [0.63-6.00]	1.63 [0.97-1.87]	1.45 [0.63-2.81]	1.37 [0.67-6.00]	0.70	0.58
ERBB3	2.36 [0.54-8.77]	2.08 [0.54-3.90]	2.45 [1.07-5.49]	2.45 [0.88-8.77]	0.92	0.38
MDM2	2.01 [0.94-11.42]	1.70 [1.21-3.67]	1.97 [1.09-11.42]	2.31 [0.94-7.50]	0.16	0.18
FRS2	0.71 [0.40-27.38]	0.71 [0.40-0.96]	0.70 [0.59-1.22]	0.73 [0.52-27.38]	0.76	0.59
ERBB2	2.73 [0.81-17.32]	2.55 [1.06-4.97]	3.16 [1.01-6.85]	2.70 [0.81-17.32]	0.9	0.17
CCNE1	7.55 [1.98-55.39]	5.06 [1.98-28.20]	8.84 [4.02-23.54]	9.38 [2.15-55.39]	0.08	0.01
ERCC2	1.78 [0.52-6.10]	1.57 [0.52-3.24]	2.11 [1.09-4.17]	1.81 [1.27-6.10]	0.42	0.02
BCL2L1	1.42 [0.68-4.45]	1.30 [0.70-2.02]	1.44 [0.84-2.41]	1.69 [0.68-4.45]	0.04	0.07

*Median mRNA value [range]

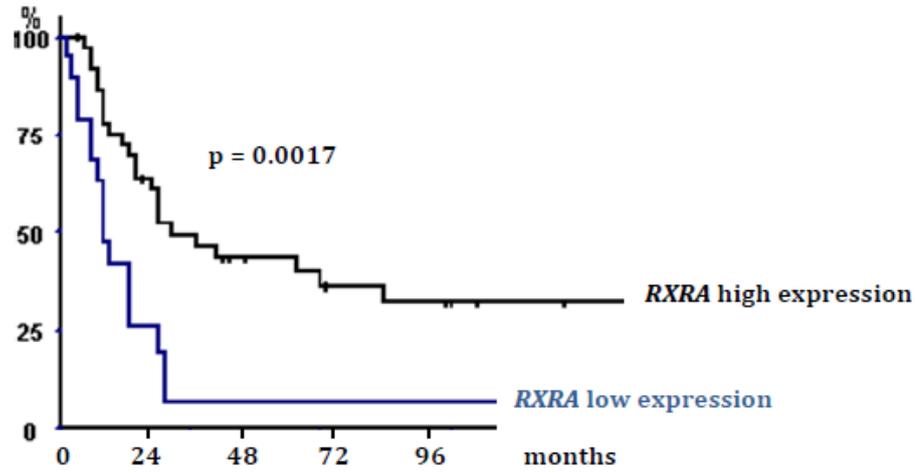
** Kruskal-Wallis H test

Association between gene expression and prognosis of NMIBC

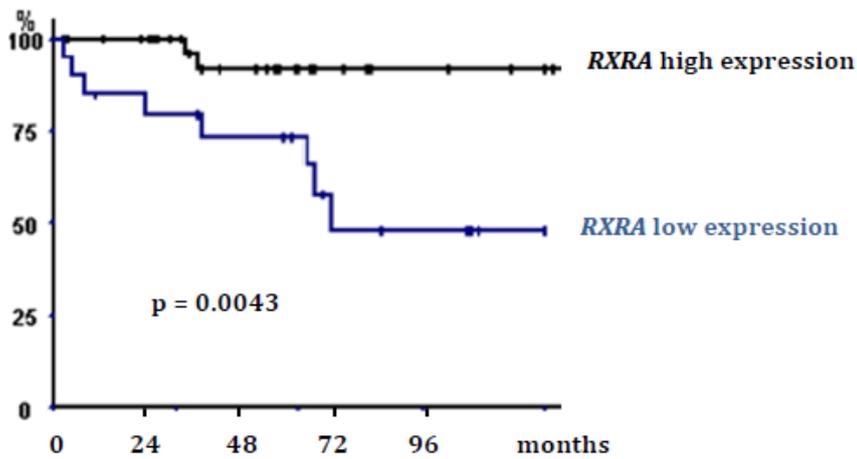
On univariate analysis, only the expression of *RXRA*, *FGFR3* and *CCNE1* was associated with RFS (p=0.0017, p= 0.043 and p=0.039, respectively) and PFS (p=0.0043, p=0.022 and p=0.022, respectively) (Suppl. data 4, 5 and 6).

Suppl. data 4: Recurrence-free and progression-free survival according to mRNA level of *RXRA* in non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC)

a) Recurrence-free survival by mRNA level of *RXRA* in non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC)

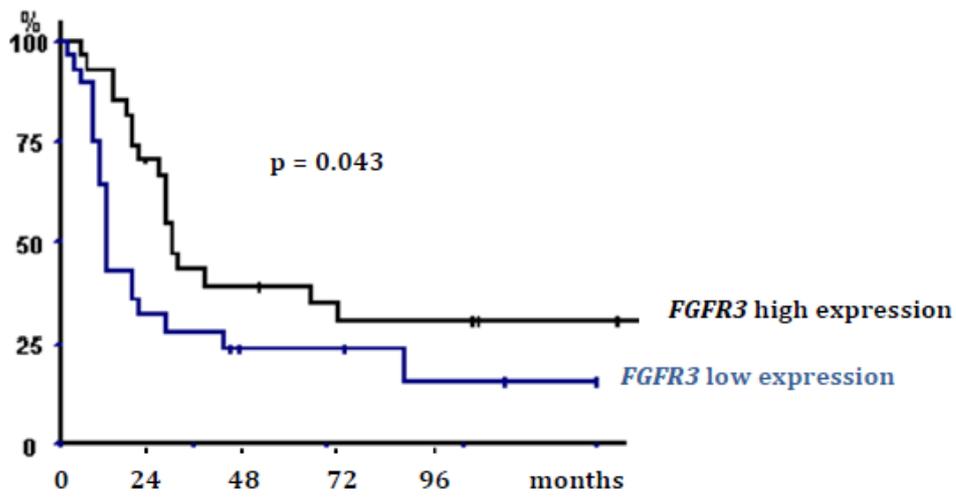


b) Progression-free survival by mRNA expression of *RXRA* in NMIBC

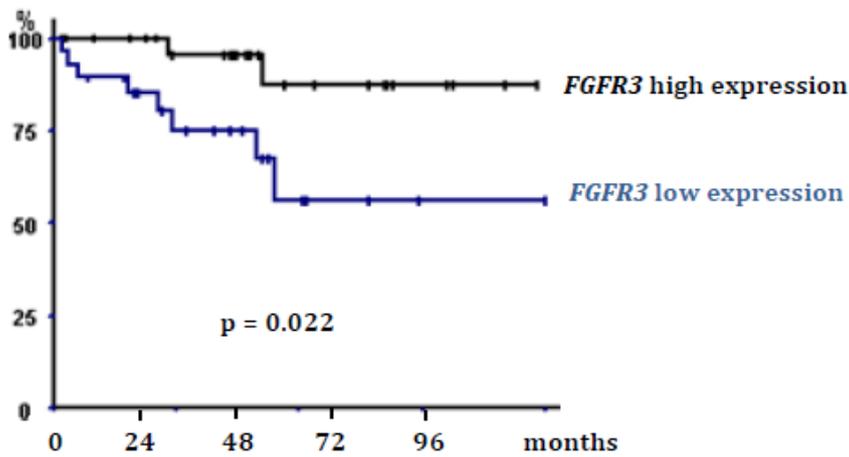


Suppl. data 5:

a) Recurrence-free survival by mRNA expression of *FGFR3* in NMIBC

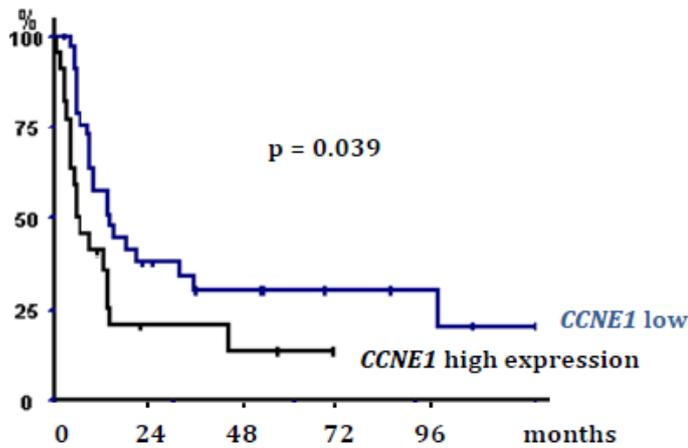


b) Progression-free survival by mRNA expression of *FGFR3* in NMIBC

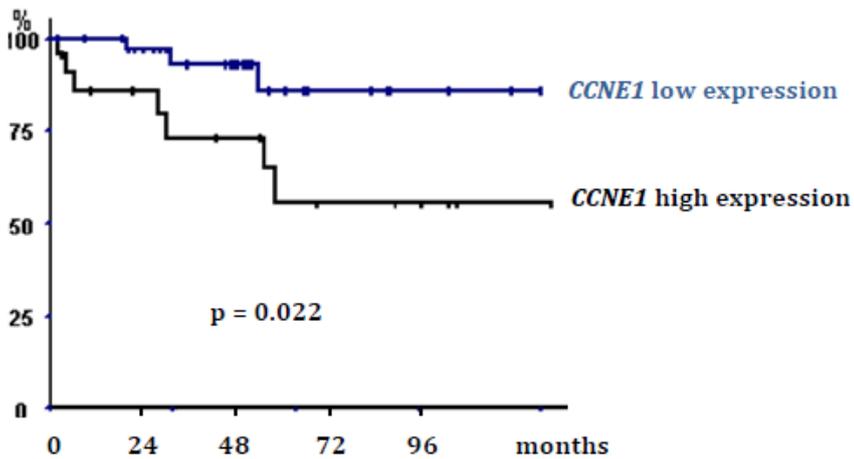


Suppl. data 6:

a) Recurrence-free survival by mRNA expression of *CCNE1* in NMIBC



b) Progression-free survival by mRNA level of *CCNE1* in NMIBC



Multivariate analyses included covariates associated with RFS or PFS showing significance at $p < 0.05$ on univariate analysis (i.e., history of NMIBC; *RXRA*, *FGFR3* and *CCNE1* status for recurrence and stage, grade, Cis and *RXRA*, *FGFR3* and *CCNE1* status for progression to muscle-invasive tumor). On multivariate analysis, history of NMIBC and *RXRA* and *FGFR3* status remained associated with RFS ($p=0.0045$, $p=0.0022$ and $p=0.0069$, respectively) and only *RXRA* status with PFS ($p=0.0068$) (Table 2).

Table 2: Multivariate analysis of prognostic factors involved in recurrence-free survival and progression-free survival in NMIBC

Prognostic factor	Recurrence-free survival		
	Adjusted HR	95% CI	p *
History of NMIBC	2.63	[1.35-5.13]	0.0045
<i>RXR4</i> overexpression	0.34	[0.17-0.68]	0.0022
<i>FGFR3</i> overexpression	0.39	[0.20-0.77]	0.0069
<i>CCNE1</i> overexpression	1.53	[0.81-2.89]	0.19

Prognostic factor	Progression-free survival		
	Adjusted HR	95% CI	p *
T1 stage	5.93	[0.68-51.34]	0.11
Cis associated	1.52	[0.26-9.08]	0.64
High grade	1.10	[0.06-18.76]	0.95
<i>RXR4</i> overexpression	0.06	[0.01-0.47]	0.0068
<i>FGFR3</i> overexpression	0.12	[0.01-1.00]	0.05
<i>CCNE1</i> overexpression	5.53	[0.97-31.39]	0.053

H=hazard ratio; 95% CI=95% confidence interval

We performed unsupervised hierarchical clustering analyses of 61 NMIBC samples with the 3 genes previously found in NMIBC samples (*RXR4*, *FGFR3*, and *CCNE1*) and found 4 major clusters composed of 15 (Group A), 15 (Group B), 16 (Group C) and 15 (Group D) samples with various mRNA levels of these 3 genes (Figure 1A and 1B). The 4 cluster groups significantly differed in terms of PFS (log rank $p=0.010$): Kaplan-Meier survival curves showed poor outcome associated with group B and better with group D (Figure 1C).

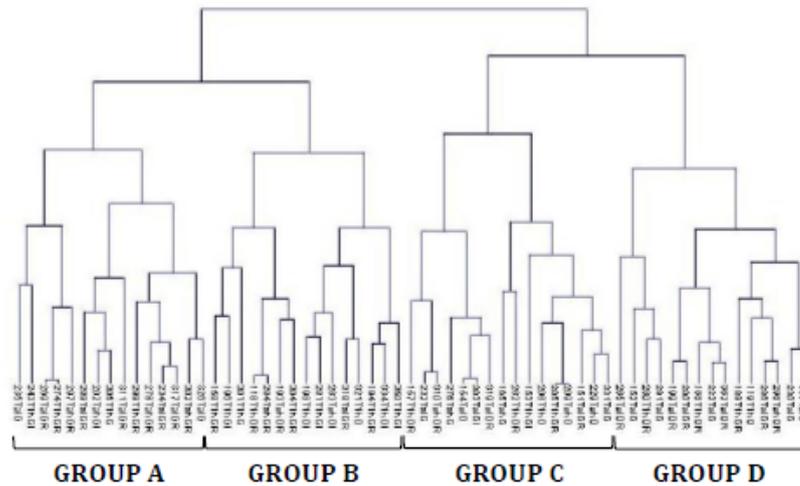
Figure 1: Supervised classification analysis of the 61 NMIBC tumor samples with the 3-gene signature comprising *RXRA*, *FGFR3* and *CCNE1*

A: dendrogram of four tumor groups obtained by hierarchical cluster with the 3-gene signature.

B: mRNA median value [range] and overexpression rates of *FGFR3*, *RXRA* and *CCNE1* in the four tumor groups. p value calculated by Kruskal-Wallis H test. For each gene, mRNA values \geq optimal cut-off were considered to represent overexpression and \leq optimal cut-off, underexpression.

C: Kaplan-Meier curves comparing progression-free survival for tumor groups. p value calculated by log rank test.

A

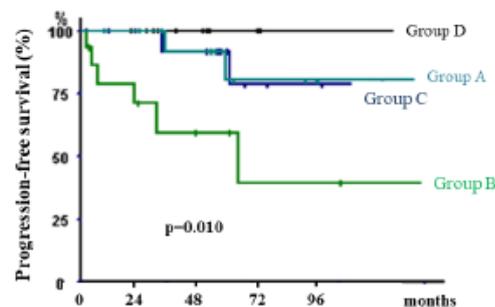


B

GENES	Group A (n=15)	Group B (n=15)	Group C (n=16)	Group D (n=15)	p
<i>RXRA</i> mRNA value (range)	1.93 [0.41-3.34]	2.12 [0.79-3.89]	2.56 [1.53-9.23]	3.73 [2.46-5.82]	<0.0001
Overexpression*, n (%)	5 (33.3)	9 (60.0)	11 (68.8)	15 (100.0)	
<i>FGFR3</i> mRNA value (range)	58.41 [2.49-109.73]	27.94 [3.91-72.13]	116.94 [81.32-524.30]	72.44 [20.95-223.10]	<0.0001
Overexpression*, n (%)	10 (66.7)	9 (60.0)	16 (100.0)	13 (86.7)	
<i>CCNE1</i> mRNA value (range)	6.06 [2.87-9.34]	7.76 [4.37-16.65]	5.05 [2.45-27.69]	2.16 [0.99-3.58]	<0.0001
Overexpression*, n (%)	0 (0.0)	4 (26.7)	3 (18.8)	0 (0.0)	

*optimal cut-off: 2 for *RXRA*, 25 for *FGFR3*, 10 for *CCNE1*

C



Multivariate analyses including covariates associated with RFS and PFS with significance at $p < 0.05$ on univariate analysis and including the 3-gene signature retained history of NMIBC and the 3-gene signature as independent prognostic factors for RFS ($p = 0.017$ and $p = 0.04$, respectively) and the 3-gene signature as independent prognostic factor for PFS ($p = 0.047$) (Table 3).

Table 3: Multivariate analysis of prognostic factors involved in recurrence-free survival and progression-free survival in NMIBC including the 3-gene signature

Prognostic factor	Recurrence-free survival		
	Adjusted HR	95% CI	p
History of NMIBC	2.16	[1.15-4.08]	0.017
3-gene signature (group B vs AC vs D)			0.04
Group D	1.00		
Groups A and C	1.70	[1.02-2.84]	
Group B	2.90	[1.05-8.04]	
	Progression-free survival		
	Adjusted HR	95% CI	p
T1 stage	2.36	[0.43-12.79]	0.23
High Grade	2.26	[0.20-25.29]	0.51
Cis associated	2.29	[0.41-12.88]	0.35
3-gene signature (group B vs AC vs D)			0.047
Group D	1.00		
Groups A and C	3.50	[1.01-12.09]	
Group B	12.27	[1.03-146.14]	

HR=hazard ratio; 95% CI=95% confidence interval

Clinical and histological characteristics of the 4 groups are presented in supplemental data. 7. The 4 groups differed in sex, stage, grade and mutational status of *FGFR3*.

Suppl. data 7: Clinical and pathological characteristics of the three non muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) tumor groups generated after classification with the 3-gene signature (*RXRA*, *FGFR3*, and *CCNE1*)

		Group A	Group B	Group C	Group D	p *
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Total population		15 (100)	15 (100)	16 (100)	15 (100)	
Age (years)	≥60	12 (80.0)	14 (93.3)	10 (62.5)	9 (60.0)	0.12
	<60	3 (20.0)	1 (6.7)	6 (37.5)	6 (40.0)	
Sex	Male	14 (93.3)	15 (100.0)	11 (68.8)	14 (93.3)	0.032
	Female	1 (6.7)	0 (0.0)	5 (31.2)	1 (6.7)	
Smoking status	Non-smoker	9 (60.0)	5 (33.3)	5 (31.2)	8 (53.3)	0.28
	Smoker	6 (40.0)	10 (66.7)	11 (68.8)	7 (46.7)	
History of NMIBC	No	7 (46.7)	7 (46.7)	8 (50.0)	3 (20.0)	0.30
	Yes	8 (53.3)	8 (53.3)	8 (50.2)	12 (80.0)	
Cis associated	No	14 (93.3)	13 (86.7)	16 (100.0)	15 (100.0)	0.26
	Yes	1 (6.7)	2 (13.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Grade	Low	8 (53.3)	1 (6.7)	6 (37.5)	10 (66.7)	0.006
	High	7 (46.7)	14 (93.3)	10 (62.5)	5 (33.3)	
Tumor stage	Ta	4 (26.7)	5 (33.3)	12 (75.0)	4 (26.7)	0.014
	T1	11 (73.3)	10 (66.7)	4 (25.0)	11 (73.3)	
<i>HRAS</i> mutation [‡]	No	13 (100.0)	11 (91.7)	8 (100.0)	10 (90.9)	0.39
	Yes	0 (0.0)	1 (8.3)	0 (0.0)	1 (0.9)	
<i>FGFR3</i> mutation [‡]	No	6 (46.2)	10 (83.3)	3 (37.5)	3 (27.2)	0.042
	Yes	7 (53.8)	2 (16.7)	5 (62.5)	8 (72.3)	
<i>PIK3CA</i> mutation ^{‡‡}	No	13 (86.7)	12 (80.0)	13 (81.3)	13 (86.7)	0.94
	Yes	2 (13.3)	3 (20.0)	3 (18.2)	2 (13.3)	

*chi-square test

‡ Information available for 44 patients; ‡‡ Information available for 60 patients

Response to Bacillus Calmette-Guerin (BCG) therapy

In total, 21/28 (75%) patients with BCG therapy showed recurrent NMIBC or progression to invasive tumor during follow-up, including 15/28 (53.6%) over the first 2 years. Among the 29 investigated genes, only low expression of *FGFR3* was significantly associated with good response to BCG therapy (no or late recurrence) ($p=0.037$) (Table 4).

Table 4: mRNA levels of studied genes in the population who received Bacillus Calmette-Guerin (BCG) therapy and association with response

GENES	Response ^a n=13	No Response ^b n=15	p-value ^{**}
PVRL4	122.90 [63.41-262.88]*	137.25 [33.37-638.75]*	0.53
MDM4	0.88 [0.50-1.24]	0.98 [0.71-1.63]	0.066
NFE2L2	1.87 [1.06-2.90]	1.59 [0.60-4.13]	0.77
PPARG	14.15 [5.91-18.73]	12.51 [2.26-17.67]	0.17
PIK3CA	1.81 [0.33-9.81]	0.62 [0.37-1.31]	0.39
PRKCI	4.07 [0.00-6.96]	3.71 [0.80-11.16]	0.7
FGFR3	27.94 [9.09-104.57]	73.47 [5.25-143.15]	0.037
TACC3	4.98 [1.36-9.32]	3.86 [1.39-12.08]	0.39
FBXW7	0.88 [0.60-1.26]	1.03 [0.64-1.74]	0.44
PAIP1	0.79 [0.63-1.96]	0.85 [0.10-1.09]	0.98
E2F3	2.13 [1.36-2.74]	2.17 [0.81-4.14]	0.73
SOX4	6.39 [3.53-11.76]	6.40 [1.91-12.88]	0.34
EGFR	1.34 [0.45-3.08]	0.92 [0.33-2.67]	0.35
ZNF703	1.09 [0.42-2.18]	1.27 [0.08-3.44]	0.39
PABPC1	2.21 [0.99-4.16]	2.02 [1.38-3.54]	0.27
YWHAZ	1.36 [1.14-3.69]	1.37 [0.68-2.48]	0.61
MYC	0.85 [0.60-1.82]	0.74 [0.30-2.36]	0.56
RXRA	2.04 [1.59-5.79]	1.96 [1.16-4.81]	0.98
GDI2	2.43 [1.50-3.19]	2.12 [0.92-3.10]	0.10
Ki67	8.21 [37.92-72.23]	29.36 [1.80-63.41]	0.27
CCND1	3.40 [0.43-17.88]	2.76 [1.27-10.71]	0.45
HRAS	1.29 [0.77-1.91]	1.30 [0.63-6.00]	0.60
ERBB3	20.49 [11.83-38.13]	19.20 [7.06-43.90]	0.98
MDM2	1.93 [1.17-3.67]	2.06 [0.94-6.08]	0.50
FRS2	0.65 [0.52-0.93]	0.71 [0.48-1.22]	0.24
ERBB2	7.91 [5.15-45.03]	6.43 [2.88-12.50]	0.20
CCNE1	3.78 [2.02-9.72]	3.78 [1.08-27.69]	0.85
ERCC2	1.48 [1.28-2.57]	1.78 [0.80-2.69]	0.45
BCL2L1	1.46 [0.76-1.72]	1.42 [0.75-2.35]	0.98

* median mRNA value [range]

^a no recurrence or late recurrence (≥ 24 months)

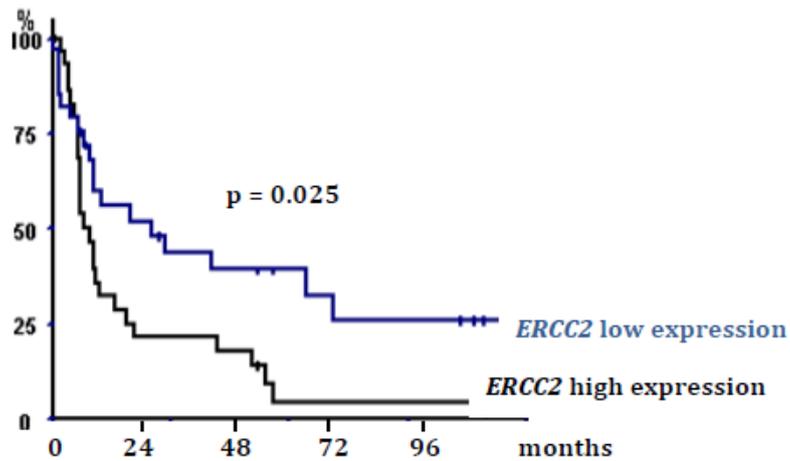
^b BCG-refractory or early recurrence (< 24 months)

** Kruskal-Wallis H test

Association between mRNA expression and survival with MIBC

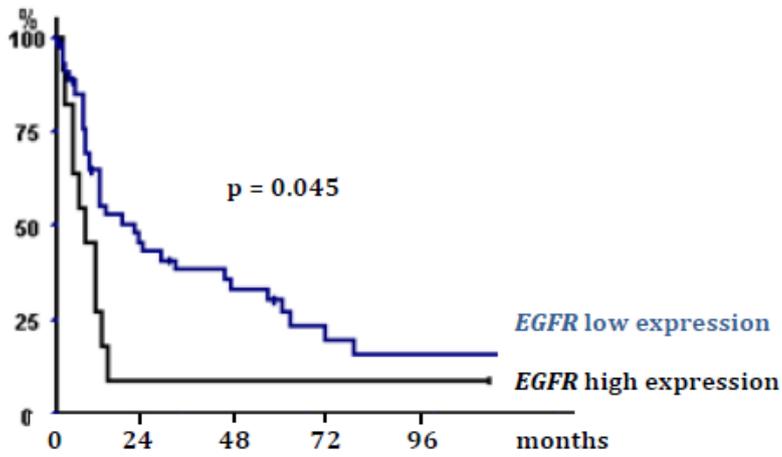
On univariate analysis, RFS and OS prognosis was poor with high expression of *EGFR* ($p=0.045$ and $p=0.010$, respectively) (Suppl. data 8); RFS prognosis was poor with high expression of *ERCC2* ($p=0.025$) (Suppl. data 9); and OS prognosis was poor with low expression of *E2F3* ($p=0.030$) (Suppl. data 10).

Suppl. data 8: Recurrence-free survival by mRNA level of *ERCC2* in MIBC

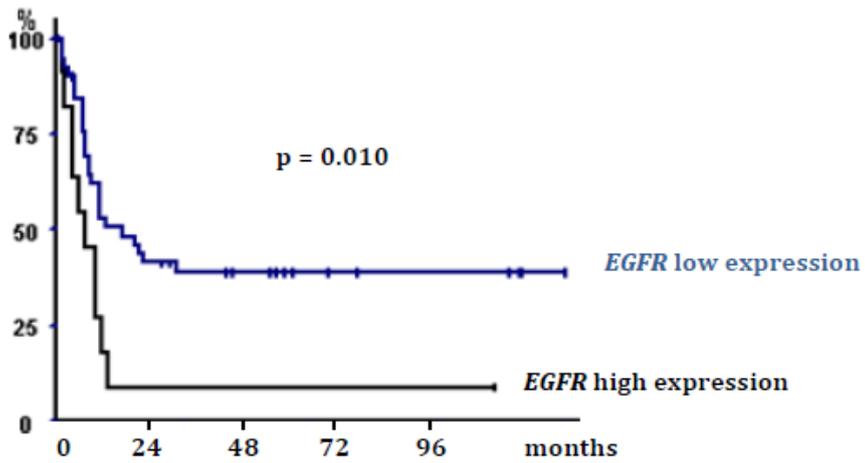


Suppl. data 9:

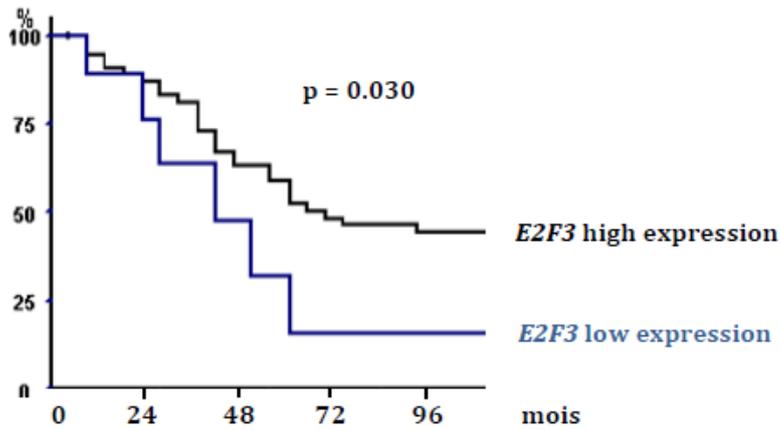
a) Recurrence-free survival by mRNA level of *EGFR* in MIBC



b) Overall survival by mRNA level of *EGFR* in MIBC



Suppl. data 10: Overall survival by mRNA level of *E2F3* in MIBC



Multivariate analyses included covariates associated with RFS or OS showing significance at $p < 0.05$ on univariate analysis (i.e. lymph node status and *ERCC2* and *EGFR* status for RFS, and stage, lymph node status and *E2F3* and *EGFR* status for OS). Lymph node status and *ERCC2* status remained associated with RFS ($p=0.000014$ and $p=0.0011$) and lymph node status and *E2F3* and *EGFR* level status with OS ($p=0.00016$, $p=0.014$ and $p=0.035$, respectively) (Table 5).

Table 5: Multivariate analysis of prognostic factors involved in recurrence-free survival and overall survival in MIBC

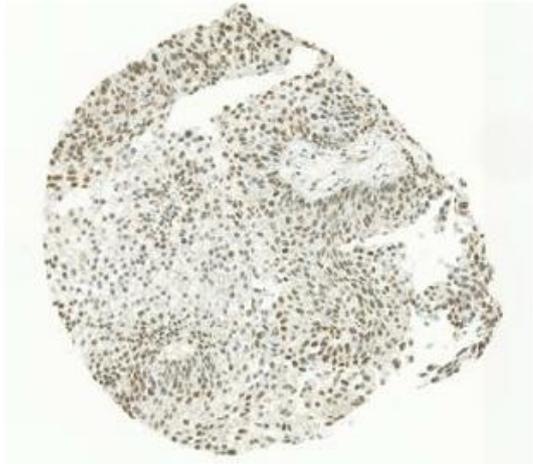
Prognostic factor	Recurrence-free survival		
	HR	95% CI	p
N+ status	4.97	[2.41-10.26]	0.000014
<i>ERCC2</i> overexpression	2.21	[1.20-4.08]	0.0011
<i>EGFR</i> overexpression	2.01	[0.97-4.15]	0.061
Prognostic factor	Overall survival		
	HR	95% CI	p
T3-T4 stage	1.35	[0.61-3.00]	0.46
N+ status	4.12	[1.98-8.58]	0.00016
<i>E2F3</i> underexpression	2.98	[1.25-7.09]	0.014
<i>EGFR</i> overexpression	2.25	[0.61-3.00]	0.035

HR=hazard ratio; 95% CI=95% confidence interval

Protein expression

We chose to assess protein expression of the 2 genes having a significant prognostic impact in NMIBC. The expression of RXRA was nuclear in NMIBC whereas exclusively cytoplasmic in MIBC (Suppl. data 11).

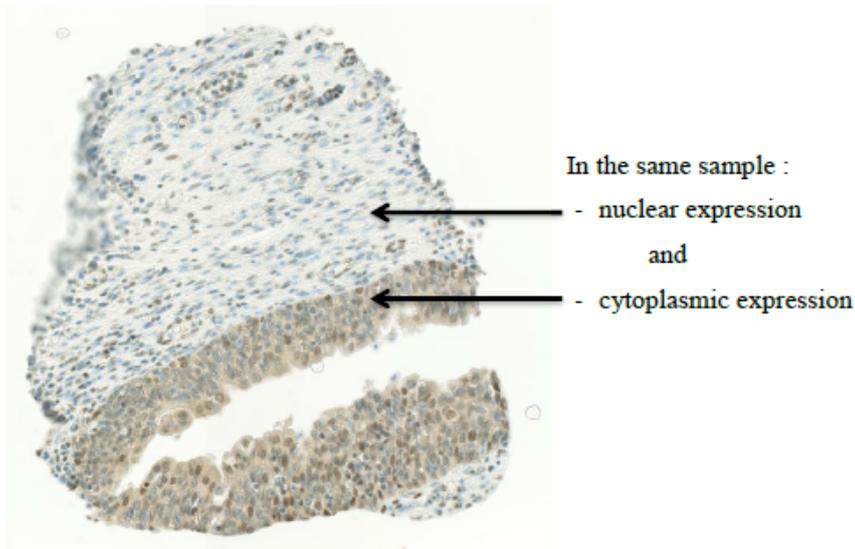
Suppl. data 11: Nuclear expression of RXRA in NMIBC and cytoplasmic expression of RXRA in MIBC



Nuclear expression of RXRA in NMIBC



Cytoplasmic expression of RXRA in MIBC



For FGFR3, expression was nuclear in both NMIBC and MIBC. The distribution of the protein expression for NMIBC and MIBC is shown in supplemental data 12.

Suppl. data 12: Immunohistochemistry results of FGFR3 and RXRA proteins

RXRA	0+ (%)	1+ (%)	2+ (%)	3+ (%)
All tumors (n=92)	9 (9.8)	32 (34.8)	39 (42.4)	12 (13.0)
NMIBC (n=43)	9 (20.9)	14 (32.6)	17 (39.5)	3 (7.0)
MIBC (n=49)	0 (0.0)	18 (36.7)	22 (44.9)	9 (18.4)

FGFR3	0+ (%)	1+ (%)	2+ (%)	3+ (%)
All tumors (n=98)	65 (66.3)	20 (20.4)	10 (10.2)	3 (3.1)
NMIBC (n=45)	24 (53.3)	11 (24.4)	7 (15.6)	3 (6.7)
MIBC (n=53)	41 (77.3)	9 (17.0)	3 (5.7)	0 (0.0)

There was a statistically significant association between mRNA and protein expression for FGFR3 ($p < 0.0001$) but not for RXRA (Table 6).

Table 6: Association between mRNA level and protein score for RXRA and FGFR3

mRNA levels	Protein score				<i>p-value</i> **
	0+	1+	2+	3+	
RXRA	1.91 [0.68-2.83]*	1.88 [0.31-5.79]*	1.59 [0.11-9.15]*	3.09 [1.16-5.92]*	0.13
FGFR3	10.40 [0.01-118.70]	61.05 [7.18-143.15]	94.63 [41.84-524.30]	72.13 [58.00-79.54]	<0.0001

* Median mRNA value [range]

** Kruskal-Wallis H test

Protein expression was not associated with prognosis in terms of recurrence or progression of NMIBC (data not shown).

DISCUSSION

The analysis of TCGA data for bladder tumors has allowed to identify new oncogenes potentially involved in bladder carcinogenesis because they have activating mutations or focal amplifications. The integrated analysis of the different genetic alterations described in the TCGA has revealed deregulated signaling pathways in bladder tumors and potential preferred therapeutic targets^{1,8}. In this study, we aimed to validate some of these data on a fair-matched cohort of NMIBC and MIBC cases focusing on survival data. Within these 2 populations, the rates of recurrence and/or progression were comparable to those observed typically: half of NMIBC cases show relapse and 35% of pT1 cases progress to muscle-invasive disease. Likewise, more than half of MIBC cases (all stages combined) recur after surgery. Concerning MIBC, we found the same results as in the TCGA data with already known prognostic markers (e.g., *EGFR*). Concerning NMIBC, we found genes of interest such as *FGFR3* but also *RXRA* and *CCNE1*. On multivariate analysis, *RXRA* was associated with RFS but also with PFS. The 3-gene signature highlighted 4 distinct prognostic groups and was significantly associated with RFS and PFS.

Two studies showed that the transcription factor *RXRA* regulates the expression of *PPARG* and that activating mutation of *RXRA* hyperactivate *PPARG* and could be responsible for nearly 20% of bladder cancer cases^{9,10}. These data suggest that *PPARG*, a key gene in bladder cancer development, could be targeted. In this regard, it is noted that association between *PPARG* and *RXRA* mRNA expressions were strong ($p < 0.0000001$ with Spearman's test).

In urothelial carcinomas, the frequency of *FGFR3* mutations varies greatly depending on the type of tumors analyzed¹¹. Indeed, the frequency of mutations seems high in pTa and low-grade tumors (about 70%) and much lower in pT1 (30%) or pT2-pT4 and high-grade tumors^{1,4}. In our series, the expression of *FGFR3* was stably associated with NMIBC stage, with more frequent overexpression in pTa tumors. mRNA overexpression but not mutations or protein expression were also associated with favorable prognosis. In the literature, immunohistochemical data show protein overexpression also related to

good prognosis¹². Here, there was a good correlation between mRNA expression and DNA mutation. We have few clinical trial data on targeted anti-FGFR3 therapies in NMIBC. Some MIBC cases also show mutations in *FGFR3* (12%) or *FGFR3/TACC3* translocations (5%)¹³, which suggests a benefit of targeted anti-FGFR3 therapy in these patients [17]. Necchi et al. did not find a prognostic value of *FGFR3* expression in MIBC as compared with NMIBC¹⁵.

We investigated the response to BCG therapy. Expression of *FGFR3* has been found a BCG response marker, which corroborates the data in mice from Langle et al.¹⁶. Indeed, in the Langle and al. study, the responder group showed low expression of *FGFR3*, which we also found. Because *FGFR3* is "druggable", anti-*FGFR3* treatments could be combined with BCG therapy to improve the response to treatment. Some studies suggest the addition of such treatments to potentiate the effect of BCG^{17,18}, including a phase II trial evaluating dovitinib in BCG-refractory patients with *FGFR3* mutated or not¹⁹.

In addition, Ward et al. studied the mutations of a panel of 23 genes on a cohort of 956 bladder tumors (NMIBC and MIBC) including *TERT* (promoter), *FGFR3*, *PIK3CA*, *ERCC2*, *ERBB2*, *HRAS*, *RXRA*, *KRAS*, *FBXW7*, *ERBB3*, *BRAF* and *NRAS*²⁰. *FGFR3* and *HRAS* mutations were of better prognosis (p=0.006 and p=0.04, respectively) and mutations of *RXRA* were significantly associated with a higher risk of recurrence (p < 0.05). In our study, we did not find any link between mutations and prognosis. In our cohort, it was *RXRA* overexpression that was associated with a higher risk of recurrence.

CCNE1 expression is increased in many cancers: breast, stomach, colon, ovary and bladder²¹. As in our study, Rothman et al. showed increased expression of *CCNE1* associated with high grade tumors²², which is consistent with its role in cell proliferation. Similarly, in our series, high expression of *CCNE1* was associated with poor prognosis in NMIBC.

Regarding MIBC, the most attractive gene seems to be *EGFR* because of its prognostic and theragnostic interest. In our study, *EGFR* seemed a prognostic factor for RFS and OS. In the TCGA

data, a subgroup of tissue representing poor prognosis, called "basal-like", showed abnormal expression of the *EGFR* pathway^{13,22}. The study by Rebouissou et al. suggests that this well-selected group would be a good candidate for anti-EGFR treatment, provided that patients do not have mutations in the RAS pathway that would limit the response to treatment²³. More recently, anti-EGFR targeted therapies have been evaluated in urothelial carcinomas in a trial demonstrating the benefit of cetuximab combined with paclitaxel as second-line treatment for metastatic bladder cancer²⁴.

ERCC2 is involved in DNA repair. It has recently been studied, in the MIBC as a biomarker of response to neo-adjuvant chemotherapy²⁵. Some studies suggest that missense mutations and overexpression of *ERCC2* increased cisplatin sensitivity²⁶⁻²⁸. A target population that could benefit the most from this treatment could be identified.

E2F3, which was significantly associated with OS in MIBC in our study, belongs to the neuronal subtype^{8,29} that is characterized by the expression of both neuroendocrine and neuronal genes reflecting a proliferative state.

Taking into account the prognostic impact and the predictive value of these two genes, *ERCC2* and *E2F3* expression levels may probably allow to guide the indication of chemotherapy in neoadjuvant or metastatic setting.

In conclusion, regarding the prognosis of NMIBC, predicting the risk of progression is difficult and the identification of markers is particularly interesting. Our results concerning *RXR α* and *FGFR3* and the 3-gene signature, if they are confirmed, could allow for adapting the management by intensifying the surveillance and/or proposing early cystectomy in patients with abnormal expression associated with poor prognosis.

METHODS

Patients and samples

We analyzed 128 urothelial carcinoma samples from patients who had undergone transurethral bladder resection or radical cystectomy in our hospital between 2002 and 2007. Specimens of normal bladder tissue from 21 patients undergoing surgery unrelated to bladder tumors (transurethral resection of the prostate or prostatic adenectomy) were used as normal bladder tissue. All patients gave their signed informed consent. This study received approval from an institutional review board and was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

Immediately after surgery, tumor samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C (for RNA extraction) and fixed in formaldehyde. Each tumor was reviewed by 2 pathologists (DD and MS) who were blinded to clinical outcomes. Tumors were re-staged according to the 2009 American Joint Committee on TNM classification of bladder tumors and graded according to the 2004 World Health Organization grading scheme^{30,31}.

Complete clinical, histological and survival data were available for these 128 patients (107 men and 21 women; median age 70 years [range: 31–91]). Pathological staging revealed NMIBC in 61 (25 low-grade pTa, 14 high-grade pTa, 22 high-grade pT1) and high-grade MIBC in 67. For NMIBC patients, the median follow-up was 58 months (range: 3–158 months; mean follow-up, 64 months). For MIBC patients, the median follow-up was 12 months (range: 1–152 months; mean follow-up: 31 months). Clinical, histological and survival characteristics are presented in Table 1.

Gene selection

Recent findings from the genome-wide analysis of TCGA data highlighted new oncogenes potentially involved in bladder carcinogenesis because of activating mutations [*PIK3CA* (20%), *ERCC2* (12%), *FGFR3* (12%), *ERBB3* (11%), *FBXW7* (10%), *RXRA* (9%), *NFE2L2* (8%), *FRS2* (8%)] or recurrent amplifications [*YWHAZ* (22%), *E2F3* (20%), *SOX4* (20%), *MYC* (13%), *PVRL4* (19%), *PPARG*

(17%), *PABPC1* (17%), *MYC* (13%), *CCNE1* (12%), *BCL2L1* (11%), *EGFR* (11%), *CCND1* (10%), *ZNF703* (10%), *GDI2* (10%), *MDM2* (9%), *PIK3CA* (8%)] or overexpression [*PVRLA4* (26%), *PABPC1* (26%), *YWHAZ* (26%), *SOX4* (25%), *E2F3* (24%), *GDI2* (21%), *BCL2L1* (21%), *PAIP1* (19%), *EGFR* (18%), *FRS2* (18%), *ZNF703* (18%), *CCNE1* (17%), *PRKCI* (14%), *PIK3CA* (13,5%), *ERBB3* (12%), *PPARG* (12%), *CCND1* (11%), *ERBB2* (10%), *MDM2* (9%), *ERCC2* (8,7%)]¹. In addition to TCGA data, recent articles have highlighted previously unknown genetic alterations in bladder cancer. *MDM4* was described as a prognostic marker of recurrence in NMIBC ⁵. *TACC3* and *FGFR3* can form a fusion gene, described in some cancers ^{1,4,6}. In addition, the role of the RAS family has been extensively studied in oncology. *HRAS* is mutated in 5% of bladder cancers. Analysis of cell lines of bladder cancer cases revealed that this population could be treated with anti-MEK and -mTOR therapy ⁷. In the same way, the *MYC* proto-oncogene is potentially "drugable"; it has been found a prognostic factor of NMIBC recurrence ².

Finally, we selected 29 genes (Suppl. data 13) for analysis. We chose one endogenous RNA control gene to RT-PCR analysis, namely *TBP* (GenBank accession No. NM_003194), which encodes the TATA box-binding protein.

Suppl. data 13: Gene selection

Gene symbol	Alternative symbol	Location	Accession no.	Gene definition	Function
PVRL4	nectin-4	1q22-q23.1	NM_030916	Poliovirus receptor-related 4	Cell adhesion
MDM4	HDMX; MDMX	1q32	NM_002393.4	MDM4, p53 regulator	p53 regulation
NFE2L2	NRF2; HEBP1	2q31	NM_006164.4	Nuclear factor (erythroid-derived 2) like 2	Antioxidant
PPARG	CDMT1; PPARG2; PPARgamma	3p25	NM_015869.4	Peroxisome proliferative activated receptor, gamma	Transcription factor, cell differentiation
PIK3CA	PI3K	3q26.3	NM_006218.3	Phosphoinositide 3 kinase	Cell proliferation
PRKCI	PKCI	3q26.3	NM_002740.5	Protein kinase C, iota	Family of protein kinases
FGFR3	ACH; CD333; CEK2; HSFGR3EX; JTK4	4p16.3	NM_000142.4	Fibroblast growth factor receptor 3	Fibroblast growth receptor
TACC3		4p16.3	NM_006342.2	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	Growth and cell differentiation
FBXW7		4q31.3	NM_033632.3	F-box and WD-40 domain protein 7	Ubiquitination-dependent phosphorylation
PAIP1		5p12	NM_006451.4	Poly(A) binding protein interacting protein 1	Translational initiation
E2F3	E2F-3	6p22	NM_001949.4	E2F transcription factor 3	Transcription factor
SOX4	EVI16	6p22.2	NM_003107.2	SRY (sex determining region Y)-box 4	Transcription factor
EGFR	ERBB; HER1; ERBB1	7p12	NM_005228.3	EGF receptor	Cell proliferation
ZNF703	ZNF503L	8p11.23	NM_025069.2	zinc finger protein 703	Carcinogenesis
PABPC1	PAB1; PABP; PABP1; PABPC2	8q22.2-q23	NM_002568.3	Poly(A) binding protein cytoplasmic 1	Translational initiation
YWHAZ		8q23.1	NM_145690.2	Tyrosine 3-monooxygenase	Transcription, transport and cell cycle regulation
MYC	c-Myc	8q24.21	NM_002467.4	c-Myc oncogene	Transcription and cell cycle regulation
RXRA	NR2B1	9q34.3	NM_002957.5	Retinoid X receptor, alpha	Transcription factor
GDI2		10p15	NM_001494.3	GDP dissociation inhibitor 2	Regulation of family of protein kinases
Ki67	MKI67	10q25-qter	NM_002417	Proliferation-related Ki-67 antigen	Cell proliferation
CCND1	BCL1	11q13	NM_053056.2	Cyclin D1	Cell cycle
HRAS	HRAS1	11p15.5	NM_005343.3	HRAS-like suppressor	Growth factor
ERBB3		12q13	NM_001982.3	erb-b2 receptor tyrosine kinase 3	Receptor tyrosine kinase
MDM2	HDMX	12q14.3-q15	NM_002392.5	Mdm2 protein	p53 regulation
FRS2		12q15	NM_001278351.1	Fibroblast growth factor receptor substrate 2	FGF receptor
ERBB2	HER2; HER-2	17q12	NM_004448.3	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2	Receptor tyrosine kinase
CCNE1	CCNE	19q12	NM_001238.3	Cyclin E1	Cell cycle
ERCC2	TFIIF	19q13.3	NM_000400.3	ERCC excision repair 2	DNA repair
BCL2L1	BCLX; BCL2L	20q11.21	NM_138578.2	BCL2-like 1, long isoform 2	Apoptosis

DNA mutation analysis

We analyzed *HRAS*, *FGFR3* and *PIK3CA*, which have well-described mutational spots. The genes have 2 mutational spots (codons 12-13 and 61 for *HRAS*; exon 7 (codons 248-249) and exon 10 (codons 372-373-375-382) for *FGFR3* and exons 9 and 20 for *PIK3CA*). The assessment involved a screening with high-resolution melt (HRM) analysis followed by Sanger sequencing of samples with a mutated profile on HRM to validate the HRM data and to determine the nomenclature of mutations found.

Real-time quantitative RT-PCR

The theoretical basis, primers and PCR consumables, RNA extraction, cDNA synthesis, and PCR reaction conditions have been previously described in detail³². Each sample was normalized to *TBP* level. Ntarget values for samples were normalized such that the median of the 21 normal-bladder Ntarget values was 1. For each investigated gene, mRNA values ≥ 3 were considered to represent overexpression and ≤ 0.33 under-expression. We previously used the same cut-off value for altered tumor gene expression³². We also used the optimal cut-off calculated by the area under the receiver operating characteristic curve for prognostic studies.

Analysis of protein expression

Representative blocks of paraffin-embedded tumor samples were available. For each tumor, 2 observers, including at least 1 expert pathologist, selected the tumor block. The area of interest was defined as the one with the highest stage and grade tumor area. A table is then arranged to guide the reading of the Tissu-Micro-Array (TMA). The removal of the tissue in the area of interest is done using a trocar of the Tissu-Micro-Arrayer machine (Alphelys) and is placed on a blank paraffin block according to the plane defined beforehand on paper. Positive control tissues are also deposited and will be used when reading the TMA. Finally, the spots are fixed by depositing the block thus made on a hot plate (37-40 ° C). Briefly, serial 3- μ m tissue sections were made using a paraffin microtome (Microtome Micron AM 360) and then were deparaffinized, rehydrated and pretreated in appropriate

buffer for antigen retrieval by using a Leica automat. Tissue slides were then incubated at 48°C with a primary antibody, anti-RXR α (ab191176, Abcam), anti-FGFR3 (sc-13121, Santa Cruz); (both 1:100) or anti-CCNE1 (ab71535, Abcam); (1:300), then appropriate secondary antibodies.

We used a semi-quantitative analysis of protein expression with the following scores: 0 (no positive cells), 1+ (few positive cells), 2+ (numerous positive cells) and 3+ (a lot of positive cells). All quantification was performed with blinding to patient status by an expert pathologist (DD).

Statistical analysis

The clinicopathological features of NMIBC and MIBC cases were tested for their association with tumor recurrence and survival by using chi-square test for categorical variables. The associations between clinical and histological variables and mRNA levels were tested by the non-parametric Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis H tests. Unsupervised hierarchical cluster analyses involved use of the WARD algorithm to identify homogenous tumor groups in terms of molecular data. Survival curves were derived by the Kaplan-Meier method, with the log-rank test used to compare survival between groups. Cox proportional-hazards regression was used to estimate hazard ratios (HRs) and their 95% confidence intervals (95% CIs) for covariates associated with RFS, PFS or OS showing significance at $p < 0.05$ on univariate analysis. Differences between two populations were considered statistically significant at confidence levels $> 95\%$ ($p < 0.05$).

Materials and data are available.

REFERENCES

1. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* **507**, 315–322 (2014).
2. Massari, F. *et al.* Prognostic Value of Beta-Tubulin-3 and c-Myc in Muscle Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *PLoS One* **10**, e0127908 (2015).
3. Fu, Y.-P. *et al.* The 19q12 bladder cancer GWAS signal: association with cyclin E function and aggressive disease. *Cancer Res.* **74**, 5808–5818 (2014).
4. Pignot, G., le Goux, C. & Bieche, I. [Recent advances in bladder urothelial carcinogenesis]. *Bull. Cancer (Paris)* **102**, 1020–1035 (2015).
5. Salvi, S. *et al.* Copy number analysis of 24 oncogenes: MDM4 identified as a putative marker for low recurrence risk in non muscle invasive bladder cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 12458–12468 (2014).
6. Williams, S. V., Hurst, C. D. & Knowles, M. A. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 795–803 (2013).
7. Kiessling, M. K. *et al.* Mutant HRAS as novel target for MEK and mTOR inhibitors. *Oncotarget* **6**, 42183–42196 (2015).
8. Robertson, A. G. *et al.* Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell* **171**, 540–556.e25 (2017).
9. Halstead, A. M. *et al.* Bladder-cancer-associated mutations in RXRA activate peroxisome proliferator-activated receptors to drive urothelial proliferation. *eLife* **6**, (2017).
10. Goldstein, J. T. *et al.* Genomic Activation of PPARG Reveals a Candidate Therapeutic Axis in Bladder Cancer. *Cancer Res.* **77**, 6987–6998 (2017).
11. Knowles, M. A. Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target. *World J. Urol.* **25**, 581–593 (2007).
12. Poyet, C. *et al.* Positive fibroblast growth factor receptor 3 immunoreactivity is associated with low-grade non-invasive urothelial bladder cancer. *Oncol. Lett.* **10**, 2753–2760 (2015).
13. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* **511**, 543–550 (2014).
14. Dienstmann, R. *et al.* Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **25**, 552–563 (2014).
15. Necchi, A. *et al.* Prognostic Effect of FGFR Mutations or Gene Fusions in Patients with Metastatic Urothelial Carcinoma Receiving First-line Platinum-based Chemotherapy: Results from a Large, Single-institution Cohort. *Eur. Urol. Focus* (2018) doi:10.1016/j.euf.2018.02.013.
16. Langle, Y. V. *et al.* FGFR3 Down-Regulation is Involved in bacillus Calmette-Guérin Induced Bladder Tumor Growth Inhibition. *J. Urol.* **195**, 188–197 (2016).
17. Vandeveer, A. J. *et al.* Systemic Immunotherapy of Non-Muscle Invasive Mouse Bladder Cancer with Avelumab, an Anti-PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitor. *Cancer Immunol. Res.* (2016) doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0176.
18. Donin, N. M. *et al.* Immunotherapy in the Treatment of Urothelial Carcinoma. *J. Urol.* (2016) doi:10.1016/j.juro.2016.02.3005.
19. Hahn, N. M. *et al.* A Phase II Trial of Dovitinib in BCG-Unresponsive Urothelial Carcinoma with FGFR3 Mutations or Overexpression: Hoosier Cancer Research Network Trial HCRN 12-157. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 3003–3011 (2017).
20. Ward, D. G. *et al.* Targeted deep sequencing of urothelial bladder cancers and associated urinary DNA: a 23-gene panel with utility for non-invasive diagnosis and risk stratification. *BJU Int.* (2019) doi:10.1111/bju.14808.

21. Donnellan, R. & Chetty, R. Cyclin E in human cancers. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **13**, 773–780 (1999).
22. Rothman, N. *et al.* A multi-stage genome-wide association study of bladder cancer identifies multiple susceptibility loci. *Nat. Genet.* **42**, 978–984 (2010).
23. Rebouissou, S. *et al.* EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Sci. Transl. Med.* **6**, 244ra91 (2014).
24. Wong, Y.-N. *et al.* Phase II trial of cetuximab with or without paclitaxel in patients with advanced urothelial tract carcinoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 3545–3551 (2012).
25. Liu, D. *et al.* Clinical Validation of Chemotherapy Response Biomarker ERCC2 in Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma. *JAMA Oncol.* **2**, 1094–1096 (2016).
26. Tse, J., Ghandour, R., Singla, N. & Lotan, Y. Molecular Predictors of Complete Response Following Neoadjuvant Chemotherapy in Urothelial Carcinoma of the Bladder and Upper Tracts. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
27. Li, Q. *et al.* ERCC2 Helicase Domain Mutations Confer Nucleotide Excision Repair Deficiency and Drive Cisplatin Sensitivity in Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **25**, 977–988 (2019).
28. Pietzak, E. J. *et al.* Genomic Differences Between ‘Primary’ and ‘Secondary’ Muscle-invasive Bladder Cancer as a Basis for Disparate Outcomes to Cisplatin-based Neoadjuvant Chemotherapy. *Eur. Urol.* **75**, 231–239 (2019).
29. Sjö Dahl, G., Eriksson, P., Liedberg, F. & Höglund, M. Molecular classification of urothelial carcinoma: global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification. *J. Pathol.* **242**, 113–125 (2017).
30. Sobin, L., Gospodarowicz, M. & Wittekind, C. TNM classification of malignant tumors. in *UICC International Union Against Cancer* 262–5 (2006).
31. Molinié, V. Classification of bladder tumors in 2006. in *Prog Urol FMC* 16:7–10 (2006).
32. Pignot, G. *et al.* Large-scale real-time reverse transcription-PCR approach of angiogenic pathways in human transitional cell carcinoma of the bladder: identification of VEGFA as a major independent prognostic marker. *Eur. Urol.* **56**, 678–688 (2009).

Acknowledgments

None

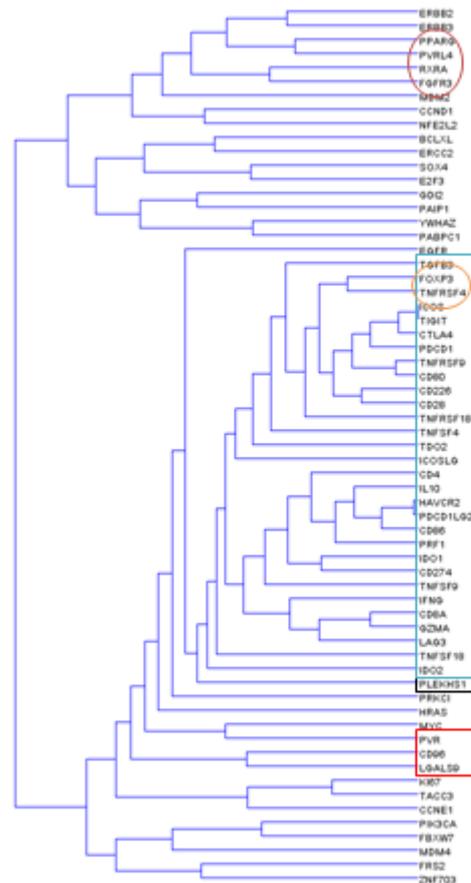
Author Contribution: CLG (data collection, statistical analysis, manuscript writing), SV, AS, NBD, ZM, MP, MS, YA (data collection), IB, DD, GP (data collection, manuscript writing)

Competing interests: The author(s) declare no competing interests.

INTERACTIONS ENTRE LES ALTÉRATIONS GÉNIQUES ET LE MICRO-ENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE

Après avoir étudié les gènes de l'immunité et les altérations géniques décrites dans le *TCGA*, nous avons cherché à savoir s'il y avait des corrélations d'expression entre ces 2 populations de gènes pour voir s'ils pouvaient interagir ensemble dans la carcinogénèse urothéliale.

Figure 12 : Clustering avec les 33 gènes de l'immunité et les 29 oncogènes sur les 121 échantillons tumoraux communs (TVNIM et TVIM)



Les gènes du micro-environnement clusterisent ensemble. On peut remarquer que *RXRA* et *FGFR3*, 2 des 3 gènes de la signature moléculaire pronostique dans les TVNIM, clusterisent ensemble. *RXRA* se trouve à côté de *PPARG*.

L'expression des 33 gènes de l'immunité a été étudiée dans les 4 groupes de notre signature moléculaire issue de l'analyse des 29 oncogènes (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Expression des 33 gènes de l'immunité anti-tumorale étudiée en fonction des 4 groupes du clustering (57 TVNIM)

GENES	Group A (n=14)	Group B (n=14)	Group C (n=17)	Group D (n=12)	Gr A vs B p **	Gr A vs C p **	Gr A vs D p **	Gr B vs C p **	Gr B vs D p **	Gr C vs D p **	Gr A vs B vs C vs D p **
CD8	0.23 [0.06-6.13]*	0.76 [0.08-1.86]*	0.31 [0.11-1.39]*	0.21 [0.04-1.75]*	0.18	0.15	0.68	0.28	0.068	0.21	0.17
CD4	0.62 [0.21-3.95]	0.85 [0.19-2.12]	0.49 [0.15-2.91]	0.87 [0.13-1.53]	0.21	0.74	0.37	0.059	0.54	0.23	0.27
FOXP3	1.77 [0.41-9.09]	6.01 [1.36-14.39]	1.65 [0.34-20.44]	1.58 [0.43-4.37]	0.0038	0.55	0.88	0.019	0.00100	0.60	0.0059
PRF1	0.20 [0.05-5.59]	0.50 [0.00-1.31]	0.37 [0.05-1.88]	0.33 [0.08-1.73]	0.16	0.51	0.30	0.28	0.37	0.64	0.43
GZMA	1.11 [0.19-38.43]	3.76 [0.18-9.15]	2.78 [0.04-8.73]	1.72 [0.34-6.91]	0.066	0.12	0.35	0.35	0.13	0.27	0.14
INFG	0.10 [0.00-13.74]	0.49 [0.00-4.67]	0.14 [0.00-1.20]	0.26 [0.00-1.45]	0.066	0.95	0.59	0.071	0.13	0.76	0.19
IL10	0.15 [0.02-0.99]	0.55 [0.09-1.50]	0.23 [0.00-1.43]	0.20 [0.00-0.94]	0.0077	0.14	0.82	0.049	0.033	0.33	0.024
TGFB3	0.02 [0.01-0.38]	0.06 [0.01-0.20]	0.03 [0.01-0.11]	0.02 [0.00-0.28]	0.063	0.23	0.96	0.15	0.19	0.33	0.19
TIGIT	0.52 [0.08-7.67]	2.30 [0.26-7.73]	0.75 [0.15-14.73]	0.68 [0.12-3.93]	0.029	0.53	0.92	0.039	0.0055	0.45	0.032
PVR	0.61 [0.00-0.91]	1.06 [0.35-1.80]	0.97 [0.27-1.73]	0.82 [0.22-1.71]	0.00046	0.0018	0.049	0.64	0.25	0.43	0.0047
CD96	1.21 [0.16-9.18]	4.28 [0.00-15.59]	3.71 [1.31-14.21]	3.79 [0.17-7.25]	0.031	0.0088	0.100	0.87	0.44	0.38	0.045
CD226	0.08 [0.02-3.28]	0.37 [0.07-1.30]	0.23 [0.00-2.04]	0.10 [0.01-0.98]	0.0077	0.14	1.00	0.15	0.031	0.25	0.033
OX40	1.16 [0.55-12.54]	2.95 [0.46-6.15]	0.96 [0.51-10.39]	1.02 [0.25-3.37]	0.033	0.66	0.29	0.047	0.0056	0.39	0.034
OX40L	0.77 [0.17-3.89]	1.97 [0.00-12.23]	0.33 [0.00-5.35]	0.53 [0.00-3.06]	0.081	0.099	0.78	0.0099	0.018	0.26	0.021
TNFSF9	0.43 [0.07-2.94]	1.92 [0.17-10.45]	0.25 [0.00-1.72]	0.20 [0.02-3.21]	0.0033	0.43	0.78	0.0011	0.0026	0.74	0.0019
TNFRSF9	1.62 [0.32-23.68]	6.31 [0.92-13.18]	0.99 [0.00-20.41]	1.52 [0.00-7.28]	0.039	1.00	0.84	0.0062	0.017	0.79	0.030
TNFSF18	0.43 [0.00-14.71]	1.24 [0.00-13.81]	0.54 [0.00-3.58]	0.16 [0.00-3.28]	0.71	0.51	0.27	0.18	0.12	0.45	0.36
TNFRSF18 ^{EE}	2.92 [0.54-45.64]	17.10 [2.67-165.03]	3.72 [0.44-34.55]	4.79 [0.51-89.29]	0.014	0.68	0.54	0.024	0.048	0.71	0.045
IDO1	0.97 [0.04-41.81]	2.97 [0.53-23.37]	0.94 [0.00-11.11]	1.18 [0.14-28.35]	0.019	0.89	0.50	0.012	0.090	0.45	0.044
IDO2 ^{EE}	0.44 [0.00-3.98]	1.10 [0.00-5.83]	0.32 [0.00-8.70]	0.67 [0.00-6.73]	0.16	0.53	0.74	0.092	0.40	0.31	0.30
TDO2	16.02 [5.20-89.91]	37.75 [2.27-155.74]	28.50 [2.58-158.56]	6.59 [0.84-150.69]	0.14	0.13	0.090	0.72	0.057	0.051	0.071
LGALS9	2.03 [0.70-6.59]	2.48 [0.45-5.43]	3.08 [0.95-8.52]	2.90 [0.48-8.96]	0.99	0.078	0.22	0.076	0.22	0.68	0.17
TIM3	0.22 [0.09-3.55]	0.78 [0.15-1.18]	0.34 [0.02-1.55]	0.43 [0.05-1.50]	0.031	0.35	0.034	0.062	0.36	0.82	0.13
LAG3	0.17 [0.07-24.07]	0.91 [0.07-3.72]	0.58 [0.00-2.36]	0.30 [0.04-1.70]	0.081	0.24	0.70	0.12	0.027	0.35	0.10
ICOSLG	0.69 [0.25-2.13]	1.44 [0.56-3.30]	0.99 [0.37-7.01]	0.53 [0.26-3.26]	0.0088	0.15	0.82	0.23	0.031	0.22	0.040
ICOS	0.58 [0.10-13.04]	2.43 [0.33-8.72]	1.09 [0.10-19.86]	0.54 [0.00-4.32]	0.019	0.40	0.68	0.12	0.0075	0.28	0.036
PD-L1	0.51 [0.21-7.96]	1.54 [0.21-3.32]	0.60 [0.13-2.43]	0.53 [0.08-2.56]	0.026	0.65	0.92	0.029	0.025	0.89	0.056
PD-L2	0.12 [0.02-3.54]	0.35 [0.06-0.95]	0.14 [0.03-1.21]	0.11 [0.01-0.80]	0.0082	0.54	0.70	0.019	0.0087	0.39	0.016
PD-1	0.26 [0.00-11.27]	2.14 [0.00-8.19]	0.81 [0.00-7.30]	0.33 [0.00-6.98]	0.046	0.13	0.61	0.22	0.019	0.11	0.045
CTLA4	0.67 [0.12-25.08]	4.74 [0.00-17.37]	1.35 [0.00-18.94]	0.78 [0.00-7.81]	0.043	0.32	0.72	0.16	0.010	0.14	0.047
CD28	0.34 [0.09-8.28]	1.17 [0.15-4.23]	0.43 [0.04-7.43]	0.29 [0.02-2.72]	0.051	0.55	0.72	0.18	0.048	0.36	0.14
CD80	1.23 [0.35-24.17]	5.25 [0.63-19.30]	2.51 [0.00-19.35]	1.86 [0.00-6.12]	0.041	0.62	0.86	0.13	0.014	0.47	0.086
CD86	0.39 [0.12-4.63]	0.77 [0.22-5.98]	0.35 [0.11-2.06]	0.42 [0.07-1.42]	0.016	0.55	0.76	0.043	0.037	0.96	0.059

* Median value [range]

** Kruskal Wallis H test

££ The mRNA values of the samples were normalized so that a Ct value of 35 was set to 1.

On constate que les groupes A, C et D (de bon pronostic) diffèrent peu concernant l'expression des gènes du micro-environnement. En revanche, le groupe B (de mauvais pronostic) est bien à part. En effet, dans ce groupe, les médianes d'expression sont significativement plus élevées pour *FOXP3*, *OX40* et son ligand (*OX40L*), *TNFSF9* et son récepteur (*TNFRSF9*), *TNFS18* et son récepteur (*TNFRSF18*) et *TDO2*.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Le cancer de vessie est une pathologie relativement fréquente. Quel que soit le stade, les traitements restent les mêmes depuis une quarantaine d'année.

Pour un même stade et grade, certaines TVNIM ne récidiveront jamais, d'autres récidiveront plusieurs fois, certaines progresseront après plusieurs récurrences vers l'infiltration du muscle, d'autres d'emblée. En effet, les TVNIM forment une population hétérogène sur laquelle il est donc intéressant de se pencher. Leur pronostic est lié à la récurrence mais surtout à la progression vers l'infiltration du muscle. Peu d'études s'intéressent aux TVNIM, sans doute en partie à cause de la nature des prélèvements, souvent de petite taille, et pour lesquels il est difficile de garder du matériel dédié à la recherche translationnelle. Les données de la littérature sont pauvres dans ce groupe de patients, notamment concernant les tumeurs de stade pT1 pour lesquelles on a besoin de marqueurs pronostiques et prédictifs de l'évolution, l'enjeu étant d'identifier les patients qui progresseront vers l'infiltration du muscle. Les classifications moléculaires qui pourraient potentiellement nous aider dans les choix thérapeutiques, s'affinent aussi bien concernant les TVIM que les TVNIM^{75,76} en incluant les données transcriptionnelles et mutationnelles notamment aussi bien des gènes du micro-environnement que sur ceux impliqués directement dans la carcinogénèse. Une étude pangénomique s'est récemment intéressée à 460 TVNIM de stade pT1, permettant de classer ces TVNIM en 3 sous-groupes similaires à ceux du TCGA⁷⁷, ressemblant eux-mêmes aux groupes luminal-, basal- et p53-like décrits par Choi et al³. Néanmoins, ces données n'ont pas encore été corrélées aux

données de survie.

De la même manière, pour les TVIM qui ont un pronostic sombre, la prise en charge est standardisée en fonction du stade TNM⁸ alors que certaines tumeurs répondent très bien à la chimiothérapie et d'autres pas. La réponse aux traitements systémiques (chimiothérapie ou immunothérapie) semble varier d'une tumeur à l'autre, notamment en fonction des caractéristiques moléculaires. Les essais avec des thérapies innovantes et coûteuses visant à améliorer la survie des patients fleurissent dans la vessie avec des résultats prometteurs. La plupart des essais cliniques dans les tumeurs de vessie actuellement concernent les checkpoints inhibiteurs ciblant la voie PD-1 ou PD-L1⁷⁸ comme les essais de phase III ALBAN et POTOMAC (anti-PD-L1 en association à la BCG-thérapie dans les TVNIM) et les essais de phase II PANDORE (anti-PD-1 en néo-adjuvant pour les TVIM) et DANUBE (immunothérapie versus chimiothérapie en 1^{ère} ligne dans les TVIM métastatiques). Cependant, il n'est pas encore possible, en routine, d'identifier les patients qui bénéficieront le plus de ces traitements. Il a tout de même été établi que le statut mutationnel des gènes de réparation de l'ADN était impliqué dans la réponse aux immunothérapies. En effet, les tumeurs mutées correspondent à des tumeurs « chaudes » qui répondent bien aux immunothérapies^{58,79}.

Concernant la réponse à la BCG-thérapie, outre les mutations de *FGFR3* (49%) déjà largement décrites dans la vessie, une étude s'intéressant à 105 TVNIM, a montré qu'on retrouvait plusieurs autres altérations dans ce groupe de tumeurs (au niveau du promoteur *TERT* (73%), de *PIK3CA* (26%) et de *TP53* (21%) notamment). Dans cette étude, les mutations d'*ARID1A* étaient associées à un risque de récurrence plus important après BCG-thérapie chez les 62 patients ayant reçu du BCG. Au total, les auteurs suggèrent que les TVNIM, tout comme les

TVIM présentent de nombreuses altérations moléculaires pouvant aider à la sélection des patients et guider le rationnel d'essai sur des traitements intra-vésicaux ou systémiques⁸⁰.

Dans nos travaux de recherche, nous avons cherché à valider une partie des données du *TCGA* qui ne s'était intéressée qu'aux TVIM sans corréler les données au pronostic initialement²⁶ et à évaluer des gènes de l'immunité anti-tumorale sur une cohorte composée aussi bien de TVNIM que de TVIM, tout en s'intéressant aux données de survie.

Concernant les gènes de l'immunité, dans nos études, aucun des gènes de la voie PD-1/PD-L1 n'a été retrouvé comme étant un marqueur pronostique ou marqueur de la réponse au BCG alors qu'une étude récente a montré qu'une expression élevée de PD-L1 était associée à une meilleure survie des 334 TVNIM de stade pT1 étudiées⁸¹. En revanche, le ratio *FOXP3/CD8* était pronostique dans les TVNIM en termes de survie sans récurrence. Tout comme dans notre étude, ce ratio a été démontré comme étant de mauvais pronostic quand élevé dans le cancer du sein et prédictif de la réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante⁸². Il peut être intéressant de continuer à étudier ce ratio pronostique dans le cancer de vessie car simple d'utilisation en termes de manipulation en routine et, d'après notre étude, peut être étudié aussi bien au niveau ARN qu'au niveau protéique. Une expression élevée d'OX40-L était également de mauvais pronostic dans les TVNIM. OX40 est une molécule membranaire de la famille des récepteurs tumoraux. C'est un récepteur costimulateur critique pendant la réponse immunitaire, en particulier pour les cellules T auxiliaires et régulateurs (Treg). Les lymphocytes T régulateurs sont

des lymphocytes T CD4⁺ et FOXP3⁺ immunosuppresseurs, indispensables au maintien de la tolérance immunitaire⁸³. Les Treg exercent néanmoins un rôle délétère dans le cancer et les maladies infectieuses, en inhibant des réponses immunitaires bénéfiques. Réduire transitoirement le nombre ou la fonction des Treg représente une approche prometteuse d'immunothérapie qui n'a pourtant connu que peu de succès jusqu'ici. Une des raisons découle de l'absence de marqueur protéique permettant d'étudier et de cibler ces cellules sans ambiguïté chez l'homme. Si le facteur de transcription FOXP3 est exprimé exclusivement par les Treg chez la souris, chez l'homme il est aussi exprimé dans de nombreux lymphocytes non régulateurs activés. D'autre part, les protéines abondamment présentes à la surface des Treg, parfois utilisées comme marqueurs de ces cellules, sont également présentes sur les lymphocytes T non régulateurs activés. C'est le cas des protéines CTLA-4 et OX40 par exemple. Des anticorps monoclonaux qui reconnaissent ces protéines ne ciblent donc pas seulement les Treg, mais également les lymphocytes T activés, ce qui complique l'interprétation de leurs effets sur la modulation des réponses immunes. L'équipe de Weixler et al. a montré que l'expression du gène *OX40* dans le cancer colo-rectal était significativement corrélée à l'expression des gènes *FOXP3* et *CD8*. Une expression élevée d'*OX40* était associée à un pronostic favorable. Les cancers colorectaux avec infiltration en *OX40* et *CD8* élevée étaient caractérisés par une survie globale significativement plus longue (pouvant s'apparenter au groupe C - celui ayant la meilleure survie globale- de notre signature moléculaire immunologique dans les TVIM) que celle des tumeurs exprimant faiblement *OX40* et *CD8* de manière élevée mais aussi que celle des tumeurs exprimant *OX40* de manière élevée et *CD8* faiblement (groupe B -de mauvais pronostic- de notre signature moléculaire immunologique dans les TVIM, de mauvais pronostic)

ou enfin que celle des tumeurs exprimant faiblement *OX40* et *CD8* (groupe A de notre signature)⁸⁴ (cf figure 2 de l'article « 33 gènes »). L'infiltrat élevé de CD8 seul dans les 408 TVIM du *TCGA* actualisé a été retrouvé comme étant un marqueur de bon pronostic en termes de RFS et d'OS⁵⁸, ce qui était le cas dans notre cohorte en multivarié pour la RFS (données non montrées). Cet infiltrat de CD8 élevé est associé au sous-groupe basal/squamous qui exprime fortement PD-L1 et CTLA4 et qui répond bien aux immunothérapies selon le concept de tumeurs « chaudes » et tumeurs « froides » sur le plan immunologique⁵⁸. Il est intéressant que CD8 à lui seul puisse être un bon marqueur pronostique car aisé d'utilisation en routine et d'après notre étude, pouvant aussi bien être étudié au niveau de son transcrite qu'au niveau protéique puisqu'il existait une corrélation forte entre son expression ARN et protéique.

Concernant l'étude des altérations génomiques issues du *TCGA*, dans notre étude, 3 gènes d'intérêt pronostique ont été mis en évidence dans les TVNIM : *RXRA*, *FGFR3* et *CCNE1*. Une signature composée de ces 3 gènes est ressortie comme un étant un facteur pronostique indépendant aussi bien en termes de récurrence que de progression vers l'infiltration du muscle.

Le récepteur X du rétinoïde alpha (*RXRA*) appartient à la sous-famille du récepteur nucléaire 2, groupe B, membre 1 et est un récepteur nucléaire. Les récepteurs X du rétinoïde (*RXR*) et les récepteurs de l'acide rétinoïque (*RAR*) sont des récepteurs nucléaires qui assurent la médiation des rétinoïdes en raison de leur implication dans l'activation des gènes médiée par l'acide rétinoïque. Ces récepteurs exercent leur action en se liant, en tant qu'homodimères ou hétérodimères, à des séquences spécifiques des promoteurs de gènes cibles comme *PPARG* et en régulant leur transcription^{85,86}. Inhiber l'un de ces 2 gènes

pourrait améliorer le pronostic du cancer de vessie. Bien que les immunothérapies soient approuvées pour les tumeurs de vessie, la majorité des patients ne répondent pas, ce qui suggère l'existence de mécanismes complémentaires comme l'évasion immunitaire. Une étude a rapporté que la voie *PPARG/RXRA* constitue un mécanisme intrinsèque à la tumeur sous-tendant l'évasion immunitaire dans les TVIM. Des mutations de *RXRA* via l'activation conformationnelle de l'hétérodimère *PPARG/RXRA* et l'amplification/surexpression de *PPARG* convergent pour moduler les programmes de transcription dépendants de *PPARG/RXRA*. Des ensembles de données cliniques et un modèle de tumeurs *in vivo* indiquent que *PPARG* amplifié ou surexprimé avec *RXRA* muté modulent le micro-environnement tumoral en altérant l'expression des cytokines et l'infiltration de lymphocytes T CD8+ et confèrent une résistance partielle aux immunothérapies. L'inactivation de *PPARG* ou de *RXRA* et l'inhibition pharmacologique de *PPARG* augmenterait la sensibilité aux immunothérapies⁸⁷. Une autre étude confirme que les mutations récurrentes de *PPARG* qui activent la voie *PPARG/RXRA* de manière protumogène confèrent à ce gène un rôle important dans le cancer de la vessie. Ces mutations sont retrouvées dans la protéine. Les études structure-fonction des variants de *PPARG* présentant des mutations dans le domaine de liaison aux ligands, permettent d'identifier les éléments structurels qui sous-tendent leur gain de fonction. Ces altérations génomiques ont été retrouvées dans les tumeurs luminales de la vessie et pourraient là encore ouvrir la voie à des options alternatives de traitement⁸⁸. Pour l'instant, à notre connaissance, il n'y a pas d'essai clinique impliquant des thérapies *RXRA* ou *PPARG*.

Le gène *FGFR3* (récepteur 3 du facteur de croissance des fibroblastes) appartient à une famille de récepteurs à activité tyrosine kinase codés par 4

gènes différents (*FGFR1-4*). Les mutations les plus fréquentes concernent les domaines extra-cellulaire et trans-membranaire du récepteur (R248C, S249C, G370C, et Y373C) et conduisent à une activation du récepteur par une stabilisation de la forme dimérique, indépendamment du ligand. D'autres mutations peuvent concerner le domaine tyrosine kinase (K650E, K650M) conduisant à un changement de conformation et à une activation du récepteur. Dans les carcinomes urothéliaux, la fréquence des mutations de *FGFR3* varie grandement en fonction du type de tumeurs analysées⁸⁹. En effet, la fréquence des mutations semble très élevée dans les tumeurs pTa et de bas grade (de l'ordre de 60 à 80%) et beaucoup plus faible dans les tumeurs pT1 (20 à 40%) ou pT2-pT4 et de haut grade (seulement 12% dans le *TCGA* ayant inclus des tumeurs infiltrantes et de haut grade)^{26,72}. *FGFR3* est donc un gène préférentiellement muté dans les tumeurs de vessie de bon pronostic. Dans notre série, l'expression de *FGFR3* était corrélée au stade dans les TVNIM avec une surexpression plus fréquente dans les tumeurs pTa (cf suppl. data 3 de l'article « 29 oncogènes »). Dans notre étude, la surexpression ARN était associée à un pronostic favorable. Tout comme dans les TVIM, les mutations de *FGFR3* sont associées, dans les TVNIM au sous-groupe luminal papillaire de bon pronostic⁹⁰. L'expression et les mutations de *FGFR3* étant étudiées de longue date dans la vessie, des essais cliniques s'intéressent aux thérapies anti-FGFR3, avec notamment une étude de phase III évaluant l'erdafitinib par rapport à la chimiothérapie ou au pembrolizumab chez des patients atteints d'un cancer urothélial avancé et présentant des altérations des gènes *FGFR* (essai THOR). Si l'on s'intéresse à l'expression des 33 gènes de l'immunité anti-tumorale étudiée en fonction des 4 groupes pronostiques issus de la signature moléculaire des TVNIM (cf **Tableau 3**), on constate que les groupes A, C et D (de bon

pronostic) différent peu en termes d'expression des gènes du micro-environnement. En revanche, le groupe B (de mauvais pronostic) est bien à part. En effet, dans ce groupe, les médianes d'expression étaient significativement plus élevées pour *FOXP3*, *OX40* et son ligand (*OX40L*), *TNFSF9* et son récepteur (*TNFRSF9*), *TNFS18* et son récepteur (*TNFRSF18*) et *TDO2*. Le membre de la superfamille des facteurs de nécrose tumorale 9 (*TNFSF9*) a été montré, in vivo, comme étant suppresseur de tumeur dans le carcinome hépatocellulaire et pourrait être lui aussi une piste thérapeutique prometteuse⁹¹. La surexpression de la tryptophane 2,3-dioxygénase (*TDO2*) a été retrouvée comme étant de mauvais pronostic dans de nombreux cancers solides comme l'œsophage⁹² et son antagonisation pourrait être envisagée.

Concernant, les TVIM, dans notre étude, les expressions d'*E2F3*, *EGFR* et *ERCC2* étaient pronostiques.

E2F3 est impliqué dans la prolifération cellulaire et a déjà été étudié dans d'autres cancers urologiques³². Il a été montré, in vitro, qu'antagoniser *E2F3* dans des cellules cancéreuses vésicales réduirait la croissance tumorale⁹³. Étonnamment, dans notre étude, c'est la surexpression d'*E2F3* qui était de bon pronostic. Ce gène est impliqué dans le sous-groupe neuronal de la classification moléculaire de Robertson et al. qui apparaît bon répondeur à la chimiothérapie néo-adjuvante par cisplatine³⁹.

EGFR ressort comme facteur indépendant en analyse multivariée pour la survie globale avec un moins bon pronostic pour les patients surexprimant *EGFR*. *EGFR* appartient à la famille ERBB des récepteurs à activité tyrosine kinase impliqués dans la prolifération et différenciation des cellules normales. Leur implication dans différentes tumeurs et les thérapies ciblant sa voie ont été décrites notamment dans le sein et dans le poumon⁹⁴. Une équipe tunisienne a

trouvé, en IHC, une corrélation significative entre la surexpression d'EGFR dans les TVNIM et l'augmentation du stade et du grade⁹⁵. Dans notre étude, cette corrélation n'était pas retrouvée (ARN). Dans le TCGA, tout comme dans le travail de l'équipe française de Curie sur les tumeurs de vessie³¹, un sous-groupe de mauvais pronostic appelé « basal-like », dans lequel il existe des anomalies d'expression de la voie de l'EGFR, a été identifié²⁶⁻³⁰. Plus récemment, les thérapies ciblées anti-EGFR ont été évaluées dans les carcinomes urothéliaux avec un essai montrant l'intérêt du cetuximab associé au paclitaxel en 2^{ème} ligne chez les patients porteurs d'un cancer de vessie métastatique⁹⁶ et un essai négatif pour le cetuximab en adjuvant de la chimiothérapie conventionnelle pour les TVIM localement avancées ou métastatiques⁹⁷, mais qui n'avait pas ciblé en particulier la population mutée ou surexprimant *EGFR*, comme c'est le cas pour d'autres cancers⁹⁸. La tendance actuelle est à l'administration de molécules pan-HER (HER2) avec des résultats encourageants en terme de survie globale pour la sous-population surexprimant *EGFR* et/ou *ERBB2* dans certains essais⁹⁹. Nous attendons les résultats de l'étude de phase II, multicentrique, randomisée, évaluant l'efficacité du MVAC avec ou sans panitumumab dans le traitement de 1^{ère} ligne des carcinomes urothéliaux avancés chez les patients qui ne portent pas de mutations *HRAS* ou *KRAS*. Ce traitement a déjà l'AMM dans le cancer du côlon métastatique chez les patients *RAS* sauvages.

ERCC2 est un gène impliqué dans la réparation de l'ADN. Il a récemment été étudié dans les TVIM comme biomarqueur de réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante¹⁰⁰. Les recommandations françaises actuelles préconisent la chimiothérapie à base de cisplatine avant cystectomie pour les patients ayant une TVIM localisée⁸. Cette chimiothérapie diffère la chirurgie mais dans le but de la compléter et de la faciliter. Néanmoins, quelques patients ne répondent pas

durant la chimiothérapie et mieux sélectionnés, ils auraient pu se voir éviter un traitement potentiellement toxique sans bénéfice. Après les études de grande envergure de Grossman et al.¹⁰¹ et Stenberg¹⁴, la dernière méta-analyse sur 3285 patients dans 15 études randomisées, confirme l'intérêt d'une chimiothérapie néo-adjuvante à base de cisplatine quel que soit le stade initial de la TVIM¹⁰². Après chimiothérapie néo-adjuvante, 20 à 40 % des patients ont une réponse complète (pT0), ce qui est associé à une amélioration de la survie globale¹⁰³. Des études suggèrent que les mutations faux-sens et la surexpression d'*ERCC2* augmentent la réponse à la chimiothérapie par cisplatine¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Ces mutations ont été retrouvées aussi fréquemment dans les TVNIM de haut grade (17%) que dans les TVIM (20%)⁸⁰. Concernant la réponse au traitement, dans notre cohorte, nous n'avons pas suffisamment de patients porteurs d'une TVIM traités par chimiothérapie néo-adjuvante pour établir des corrélations avec la réponse au traitement mais nous nous sommes intéressés à la réponse à la BCG-thérapie. Le mécanisme d'action de la BCG-thérapie reste toujours hypothétique et il n'existe pas de marqueur prédictif de la réponse au traitement. 30-40% des patients récidivent dans les 5 années suivant l'administration de BCG¹⁰⁷ et certaines équipes s'interrogent sur les modalités de suivi optimal suivant l'administration de BCG, certains actes de surveillance étant quelque peu contraignants (cystoscopies régulières, biopsies vésicales au bloc opératoire)⁹. Dans notre série, nous avons pu évaluer la valeur prédictive de l'expression de nos gènes en termes de réponse au BCG pour 28 patients. Seule l'expression d'un gène (*FGFR3*), peut-être par manque de puissance, a été retrouvée comme étant un marqueur de réponse au BCG ce qui corrobore les données de Langle et al. sur la souris¹⁰⁸. En effet, dans cette étude, le groupe répondeur exprimait de façon plus faible *FGFR3*, ce qui est également le cas dans notre étude. Pour

les patients réfractaires au BCG, nous disposons, à ce jour, de peu d'options thérapeutiques en dehors de la cystectomie⁸. Nous avons besoin de chercher de nouvelles options efficaces et certains essais en cours ou qui vont débiter concernent d'ailleurs cette population de patients. Après l'essai négatif de phase II sur le dovitinib, comme traitement chez les patients *FGFR3* mutés et non mutés porteurs d'une TVNIM réfractaire au BCG¹⁰⁹, un essai de phase II à venir évaluera un autre anti-FGFR3, le rogaratinib, dans la même indication chez les patients surexprimant *FGFR1* et *FGFR3*. Même si les thérapies FGFR3 semblent prometteuses sur le plan pharmacodynamique, elles posent le problème de leur importante toxicité¹⁰⁹, ce qui limitera sans doute leur prescription. La tolérance médiocre à ce traitement pousse à se tourner vers d'autres altérations génomiques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les tumeurs urothéliales sont les 3^{èmes} cancers les plus fréquemment mutés. Il semble que certaines de ces altérations moléculaires (amplifications/délétions, mutations et modification d'expression) surviennent très précocement au cours de la carcinogenèse vésicale alors que d'autres apparaissent à différents stades de l'évolution. Corriger ces altérations par l'administration de thérapies ciblées constitue une approche pharmacologique prometteuse. Idéalement, cela nécessite au préalable un protocole de recherche clinique portant sur une large population afin de préciser si les patients répondeurs sont bien ceux présentant une anomalie de la voie ciblée, selon le concept de pharmacogénomique et de biomarqueur compagnon.

Notre cohorte a permis de confirmer certains résultats de la littérature comme la valeur du ratio *FOXP3/CD8*, de l'infiltrat en CD8 et de gènes déjà bien connus comme *FGFR3* et *EGFR*. Nos travaux ont également permis de mettre en évidence 2 signatures moléculaires, une composée de *RXRA*, *FGFR3* et *CCNE1* pronostique dans les TVNIM et une immunologique pronostique dans les TVIM composée d'*OX40L*, *CD8* et *TIGIT*, qui a été brevetée. Il serait intéressant de pouvoir les valider dans des cohortes indépendantes, éventuellement sur une série de patients traités par immunothérapie (essai de phase I avec des thérapies anti-TIGIT dans le cancer de vessie en cours) ou sur une série de patients traités par thérapies ciblées, sachant que cela n'est, pour l'instant, pas possible hors essai thérapeutique.

Par ailleurs, concernant les TVNIM, nos résultats concernant *RXRA* et *FGFR3* notamment et s'ils se confirment, pourraient permettre d'adapter la prise en charge en intensifiant la surveillance et/ou en proposant une cystectomie précoce chez les patients présentant des anomalies d'expression associées à un pronostic péjoratif.

Concernant les TVIM, le gène le plus attractif semble être *EGFR* en raison de son intérêt théranostique déjà bien connu dans d'autres cancers. Il sera intéressant de suivre les résultats des essais cliniques en cours. *ERCC2* paraît être également un gène particulièrement intéressant puisqu'aujourd'hui, il semble que les signatures moléculaires pronostiques et prédictives de réponse aux traitements (immunothérapie et chimiothérapie) classent les sous-groupes selon leur statut mutationnel au niveau des gènes de réparation de l'ADN et sur leur infiltrat en cellules immunitaires, les 2 pans étant étroitement liés. En effet, on pense maintenant qu'un facteur pronostique ou prédictif de la réponse au traitement ne sera pas un récepteur ou un ligand mais plutôt une combinaison de sur- et sous-expressions et mutations de différents gènes, permettant de définir une signature moléculaire discriminante selon le modèle qui suit proposé par Vidotto et al⁵⁸. Selon ces auteurs, le sous-type moléculaire d'après les classifications déjà proposées^{26,39,110}, le statut mutationnel et l'expression des gènes de l'immunité anti-tumorale devraient être étudiés pour chaque patient, afin de leur proposer le traitement ou la combinaison de traitements la plus adaptée.

Figure 13 : Schéma proposé par Vidotto at al. afin de stratifier les patients ayant une TVIM pour la chimio-immunothérapie⁵⁸

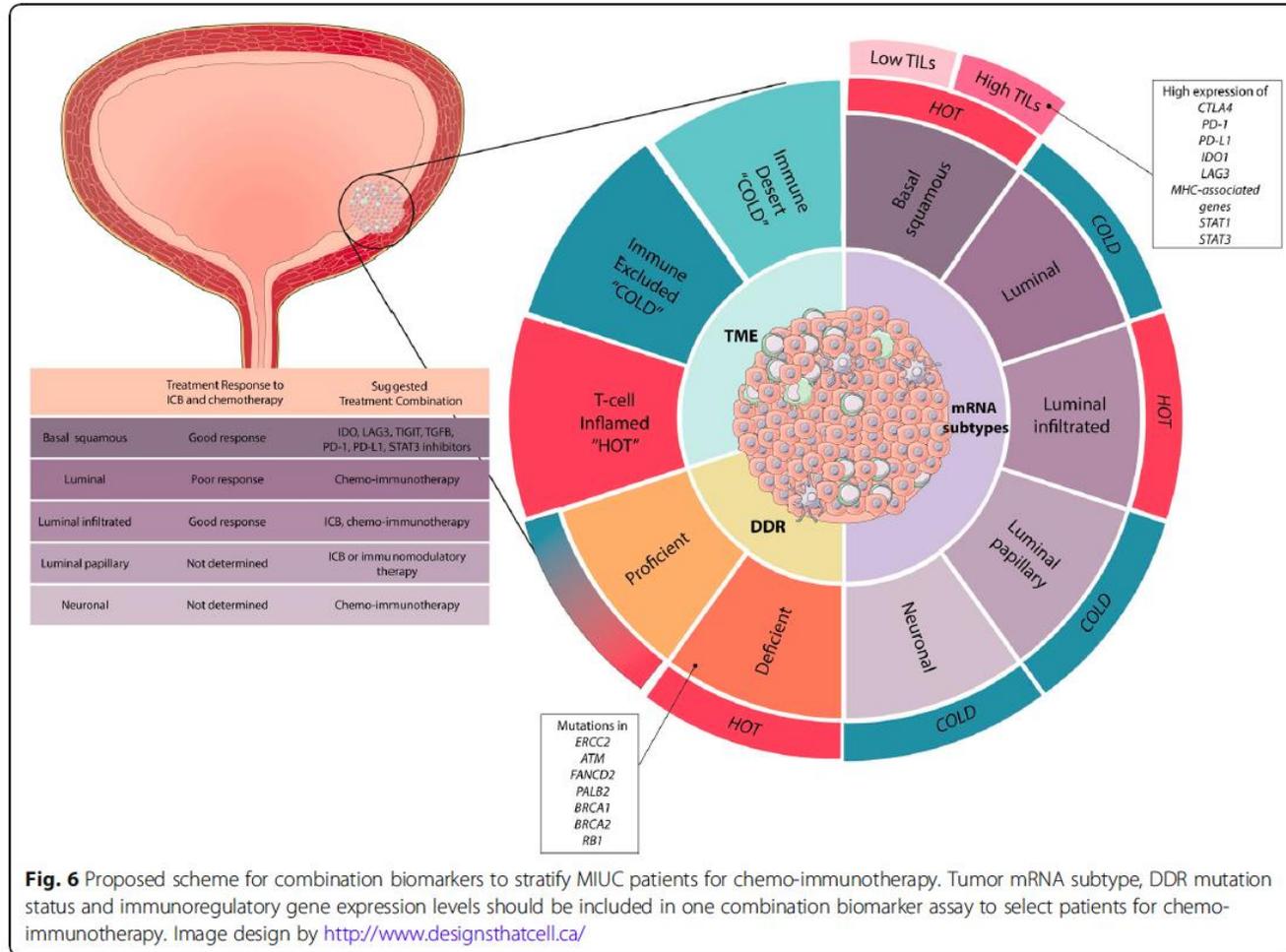


Fig. 6 Proposed scheme for combination biomarkers to stratify MIUC patients for chemo-immunotherapy. Tumor mRNA subtype, DDR mutation status and immunoregulatory gene expression levels should be included in one combination biomarker assay to select patients for chemo-immunotherapy. Image design by <http://www.designthatcell.ca/>

RÉFÉRENCES

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65:87–108.
2. Guérin S, Doyon F, Hill C. [The frequency of cancer in France in 2006, mortality trends since 1950, incidence trends since 1980 and analysis of the discrepancies between these trends]. *Bull Cancer (Paris)* 2009;96:51–7.
3. Rudman SM, Crawley D. Epidemiology of Bladder Cancer. In: Pathology and Epidemiology of Cancer. Switzerland: Loda M., 2017. 511–22.
4. Cheng L, Montironi R, Davidson DD, Lopez-Beltran A. Staging and reporting of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2009;22 Suppl 2:S70-95.
5. Mostofi F, Sobin L, Torloni H. Histological Typing of Urinary Bladder Tumours. 1973;
6. Ben Abdelkrim S, Rammeh S, Trabelsi A, Ben Yacoub-Abid L, Ben Sorba N, Jaïdane L, Mokni M. Reproductibilité des classifications OMS 1973 et OMS 2004 des tumeurs urothéliales papillaires de la vessie. *Can Urol Assoc J J Assoc Urol Can* 2012;6:E230-233.
7. Molinié V. Classification of bladder tumors in 2006. In: Prog Urol FMC. 2006. 16:7-10.
8. Rouprêt M, Neuzillet Y, Pignot G, Compérat E, Audenet F, Houédé N, Larré S, Masson-Lecomte A, Colin P, Brunelle S, Xylinas E, Roumiguié M, et al. RETRACTED: Recommandations françaises du Comité de Cancérologie de l'AFU — Actualisation 2018—2020 : tumeurs de la vessie French ccAFU guidelines — Update 2018—2020: Bladder cancer. *Progres En Urol J Assoc Francaise Urol Soc Francaise Urol* 2018;28:S46–78.
9. Pfister C, Roupret M, Neuzillet Y, Larré S, Pignot G, Quintens H, Houédé N, Compérat E, Colin P, Roy C, Davin J-L, Guy L, et al. [CCAFU Recommendations 2013: Bladder carcinoma]. *Prog En Urol J Assoc Fr Urol Société Fr Urol* 2013;23 Suppl 2:S105-125.
10. Sylvester RJ, van der Meijden APM, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffouix C, Denis L, Newling DWW, Kurth K. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006;49:466–465; discussion 475-477.
11. D'Souza AM, Pohar KS, Arif T, Geyer S, Zynger DL. Retrospective analysis of survival in muscle-invasive bladder cancer: impact of pT classification, node status, lymphovascular invasion, and neoadjuvant chemotherapy. *Virchows Arch Int J Pathol* 2012;461:467–74.
12. Bouchot O, Zerbib M. [Neo-adjuvant and adjuvant chemotherapy in radical treatment]. *Progres En Urol J Assoc Francaise Urol Soc Francaise Urol* 2002;12:987–97.
13. International Collaboration of Trialists, Medical Research Council Advanced Bladder Cancer Working Party (now the National Cancer Research Institute Bladder Cancer Clinical Studies Group), European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Tract Cancer Group, Australian Bladder Cancer Study Group, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, Finnbladder, Norwegian Bladder Cancer Study Group, Club Urologico Espanol de Tratamiento Oncologico Group, Griffiths G, Hall R, Sylvester R, Raghavan D, 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* 2011;29:2171–7.
14. 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* 2005;48:202–5; discussion 205-206.
 15. Cognetti F, Ruggeri EM, Felici A, Gallucci M, Muto G, Pollera CF, Massidda B, Rubagotti A, Giannarelli D, Boccardo F, Study Group. Adjuvant chemotherapy with cisplatin and gemcitabine versus chemotherapy at relapse in patients with muscle-invasive bladder cancer submitted to radical cystectomy: an Italian, multicenter, randomized phase III trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2012;23:695–700.
 16. Paz-Ares LG. Randomized phase III trial comparing adjuvant paclitaxel/gemcitabine/cisplatin (PGC) to observation in patients with resected invasive bladder cancer: Results of the Spanish Oncology Genitourinary Group (SOGUG) 99/01 study. 2010;
 17. Sternberg CN, Skoneczna I, Kerst JM, Albers P, Fossa SD, Agerbaek M, Dumez H, de Santis M, Théodore C, Leahy MG, Chester JD, Verbaeys A, et al. Immediate versus deferred chemotherapy after radical cystectomy in patients with pT3-pT4 or N+ M0 urothelial carcinoma of the bladder (EORTC 30994): an intergroup, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16:76–86.
 18. Donat SM, Shabsigh A, Savage C, Cronin AM, Bochner BH, Dalbagni G, Herr HW, Milowsky MI. Potential impact of postoperative early complications on the timing of adjuvant chemotherapy in patients undergoing radical cystectomy: a high-volume tertiary cancer center experience. *Eur Urol* 2009;55:177–85.
 19. Bamias A, Tiliakos I, Karali M-D, Dimopoulos MA. Systemic chemotherapy in inoperable or metastatic bladder cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2006;17:553–61.
 20. von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Zimmermann A, Arning M. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2005;23:4602–8.
 21. Clark PE, Agarwal N, Biagioli MC, Eisenberger MA, Greenberg RE, Herr HW, Inman BA, Kuban DA, Kuzel TM, Lele SM, Michalski J, Pagliaro LC, et al. Bladder cancer. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN* 2013;11:446–75.
 22. Porter MP, Kerrigan MC, Donato BMK, Ramsey SD. Patterns of use of systemic chemotherapy for Medicare beneficiaries with urothelial bladder cancer. *Urol Oncol* 2011;29:252–8.
 23. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee J-L, Fong L, Vogelzang NJ, Climent MA, Petrylak DP, Choueiri TK, Necchi A, Gerritsen W, et al. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med* 2017;376:1015–26.
 24. Loskog A, Ninalga C, Paul-Wetterberg G, de la Torre M, Malmström P-U, Tötterman TH. Human bladder carcinoma is dominated by T-regulatory cells and Th1 inhibitory cytokines. *J Urol* 2007;177:353–8.
 25. Wu X-R. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 2005;5:713–25.
 26. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014;507:315–22.

27. Fu Y-P, Kohaar I, Moore LE, Lenz P, Figueroa JD, Tang W, Porter-Gill P, Chatterjee N, Scott-Johnson A, Garcia-Closas M, Muchmore B, Baris D, et al. The 19q12 bladder cancer GWAS signal: association with cyclin E function and aggressive disease. *Cancer Res* 2014;74:5808–18.
28. Gui Y, Guo G, Huang Y, Hu X, Tang A, Gao S, Wu R, Chen C, Li X, Zhou L, He M, Li Z, et al. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nat Genet* 2011;43:875–8.
29. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES, Getz G. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 2014;505:495–501.
30. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MDM, Miller CA, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013;502:333–9.
31. Rebouissou S, Bernard-Pierrot I, de Reyniès A, Lepage M-L, Krucker C, Chapeaublanc E, Hérault A, Kamoun A, Caillault A, Letouzé E, Elarouci N, Neuzillet Y, et al. EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Sci Transl Med* 2014;6:244ra91.
32. Olsson AY, Feber A, Edwards S, Te Poele R, Giddings I, Merson S, Cooper CS. Role of E2F3 expression in modulating cellular proliferation rate in human bladder and prostate cancer cells. *Oncogene* 2007;26:1028–37.
33. Dienstmann R, Rodon J, Prat A, Perez-Garcia J, Adamo B, Felip E, Cortes J, Iafrate AJ, Nuciforo P, Tabernero J. Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO* 2014;25:552–63.
34. Pignot G, le Goux C, Bieche I. [Recent advances in bladder urothelial carcinogenesis]. *Bull Cancer (Paris)* 2015;102:1020–35.
35. Ross JS, Wang K, Al-Rohil RN, Nazeer T, Sheehan CE, Otto GA, He J, Palmer G, Yelensky R, Lipson D, Ali S, Balasubramanian S, et al. Advanced urothelial carcinoma: next-generation sequencing reveals diverse genomic alterations and targets of therapy. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2014;27:271–80.
36. Laé M, Couturier J, Oudard S, Radvanyi F, Beuzeboc P, Vieillefond A. Assessing HER2 gene amplification as a potential target for therapy in invasive urothelial bladder cancer with a standardized methodology: results in 1005 patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO* 2010;21:815–9.
37. Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, Algaba F, Høyer S, Ulhøi BP, Vang S, Reinert T, Hermann GG, Mogensen K, Thomsen MBH, Nielsen MM, et al. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell* 2016;30:27–42.
38. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, Roth B, Cheng T, Tran M, Lee I-L, Melquist J, Bondaruk J, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 2014;25:152–65.
39. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, Hinoue T, Laird PW, Hoadley KA, Akbani R, Castro MAA, Gibb EA, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell* 2017;171:540-556.e25.
40. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, et al. Tumor-associated B7-H1

promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8:793–800.

41. Kiselyov A, Bunimovich-Mendrazitsky S, Startsev V. Key signaling pathways in the muscle-invasive bladder carcinoma: Clinical markers for disease modeling and optimized treatment. 2016;
42. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2002;20:29–53.
43. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2455–65.
44. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon R-A, Reed K, Burke MM, Caldwell A, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2013;369:122–33.
45. Ponticiello A, Perna F, Maione S, Stradolini M, Testa G, Terrazzano G, Ruggiero G, Malerba M, Sanduzzi A. Analysis of local T lymphocyte subsets upon stimulation with intravesical BCG: a model to study tuberculosis immunity. *Respir Med* 2004;98:509–14.
46. Sharma P, Old LJ, Allison JP. Immunotherapeutic strategies for high-risk bladder cancer. *Semin Oncol* 2007;34:165–72.
47. Powles T. Immune Checkpoint Inhibitors for Urologic Cancer: The Tip of the Iceberg? *Eur Urol* 2015;68:280–2.
48. Aoun F, Kourie HR, Sideris S, Roumeguère T, Velthoven R van, Gil T. Checkpoint inhibitors in bladder and renal cancers: results and perspectives. *Immunotherapy* 2015;7:1259–71.
49. Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C, Bellmunt J, Burris HA, Petrylak DP, Teng S, Shen X, Boyd Z, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 2014;515:558–62.
50. Necchi A, Anichini A, Raggi D, Briganti A, Massa S, Lucianò R, Colecchia M, Giannatempo P, Mortarini R, Bianchi M, Farè E, Monopoli F, et al. Pembrolizumab as Neoadjuvant Therapy Before Radical Cystectomy in Patients With Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma (PURE-01): An Open-Label, Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2018;JCO1801148.
51. Inman BA, Sebo TJ, Frigola X, Dong H, Bergstralh EJ, Frank I, Fradet Y, Lacombe L, Kwon ED. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer* 2007;109:1499–505.
52. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother CII* 2007;56:1173–82.
53. Boorjian SA, Sheinin Y, Crispen PL, Farmer SA, Lohse CM, Kuntz SM, Leibovich BC, Kwon ED, Frank I. T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2008;14:4800–8.
54. Xylinas E, Robinson BD, Kluth LA, Volkmer BG, Hautmann R, Küfer R, Zerbib M, Kwon E, Thompson RH, Boorjian SA, Shariat SF. Association of T-cell

co-regulatory protein expression with clinical outcomes following radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol* 2014;40:121–7.

55. Huang Y, Zhang S-D, McCrudden C, Chan K-W, Lin Y, Kwok H-F. The prognostic significance of PD-L1 in bladder cancer. *Oncol Rep* 2015;33:3075–84.
56. Powles T, Durán I, van der Heijden MS, Loriot Y, Vogelzang NJ, De Giorgi U, Oudard S, Retz MM, Castellano D, Bamias A, Fléchon A, Gravis G, et al. Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2018;391:748–57.
57. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, Dawson N, O'Donnell PH, Balmanoukian A, Loriot Y, Srinivas S, Retz MM, 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* 2016;387:1909–20.
58. Vidotto T, Nersesian S, Graham C, Siemens DR, Koti M. DNA damage repair gene mutations and their association with tumor immune regulatory gene expression in muscle invasive bladder cancer subtypes. *J Immunother Cancer [Internet]* 2019 [cited 2019 Oct 10];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6556053/>
59. Kiessling MK, Curioni-Fontecedro A, Samaras P, Atrott K, Cosin-Roger J, Lang S, Scharl M, Rogler G. Mutant HRAS as novel target for MEK and mTOR inhibitors. *Oncotarget* 2015;6:42183–96.
60. Massari F, Bria E, Ciccarese C, Munari E, Modena A, Zambonin V, Sperduti I, Artibani W, Cheng L, Martignoni G, Tortora G, Brunelli M. Prognostic Value of Beta-Tubulin-3 and c-Myc in Muscle Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *PLoS One* 2015;10:e0127908.
61. Le Goux C, Damotte D, Vacher S, Sibony M, Delongchamps NB, Schnitzler A, Terris B, Zerbib M, Bieche I, Pignot G. Correlation between messenger RNA expression and protein expression of immune checkpoint-associated molecules in bladder urothelial carcinoma: A retrospective study. *Urol Oncol* 2017;35:257–63.
62. Shen Z, Zhou S, Wang Y, Li R, Zhong C, Liang C, Sun Y. Higher intratumoral infiltrated Foxp3+ Treg numbers and Foxp3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136:1585–95.
63. Horn T, Laus J, Seitz AK, Maurer T, Schmid SC, Wolf P, Haller B, Winkler M, Retz M, Nawroth R, Gschwend JE, Kübler HR, et al. The prognostic effect of tumour-infiltrating lymphocytic subpopulations in bladder cancer. *World J Urol* 2016;34:181–7.
64. Shinto E, Hase K, Hashiguchi Y, Sekizawa A, Ueno H, Shikina A, Kajiwara Y, Kobayashi H, Ishiguro M, Yamamoto J. CD8+ and FOXP3+ tumor-infiltrating T cells before and after chemoradiotherapy for rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2014;21 Suppl 3:S414-421.
65. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. *UICC Int Union Cancer*
66. Amsellem-Ouazana D, Bièche I, Molinié V, Elie C, Vieillefond A, Tozlu S, Botto H, Debré B, Lidereau R. Is quantitative real-time RT-PCR an adjunct to immunohistochemistry for the evaluation of ErbB2 status in transitional carcinoma of the bladder? *Eur Urol* 2006;49:1035–42; discussion 1042-1043.

67. Pignot G, Vieillefond A, Vacher S, Zerbib M, Debre B, Lidereau R, Amsellem-Ouazana D, Bieche I. Hedgehog pathway activation in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 2012;106:1177–86.
68. Amsellem-Ouazana D, Bièche I, Tozlu S, Botto H, Debré B, Lidereau R. Gene expression profiling of ERBB receptors and ligands in human transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2006;175:1127–32.
69. Bièche I, Onody P, Tozlu S, Driouch K, Vidaud M, Lidereau R. Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *Int J Cancer J Int Cancer* 2003;106:758–65.
70. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982;143:29–36.
71. Le Goux C, Vacher S, Pignot G, Sibony M, Barry Delongchamps N, Terris B, Piaggio E, Zerbib M, Damotte D, Bieche I. mRNA expression levels of genes involved in antitumor immunity: identification of a 3-gene signature associated with prognosis of muscle-invasive bladder cancer. *Oncol Immunology* 2017;
72. Pignot G, le Goux C, Bieche I. [Recent advances in bladder urothelial carcinogenesis]. *Bull Cancer (Paris)* 2015;102:1020–35.
73. Salvi S, Calistri D, Gurioli G, Carretta E, Serra L, Gunelli R, Zoli W, Casadio V. Copy number analysis of 24 oncogenes: MDM4 identified as a putative marker for low recurrence risk in non muscle invasive bladder cancer. *Int J Mol Sci* 2014;15:12458–68.
74. Williams SV, Hurst CD, Knowles MA. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum Mol Genet* 2013;22:795–803.
75. Aine M, Eriksson P, Liedberg F, Sjö Dahl G, Höglund M. Biological determinants of bladder cancer gene expression subtypes. *Sci Rep* 2015;5:10957.
76. Hurst CD, Alder O, Platt FM, Droop A, Stead LF, Burns JE, Burghel GJ, Jain S, Klimczak LJ, Lindsay H, Roulson J-A, Taylor CF, et al. Genomic Subtypes of Non-invasive Bladder Cancer with Distinct Metabolic Profile and Female Gender Bias in KDM6A Mutation Frequency. *Cancer Cell* 2017;32:701-715.e7.
77. Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, Algaba F, Høyer S, Ulhøi BP, Vang S, Reinert T, Hermann GG, Mogensen K, Thomsen MBH, Nielsen MM, et al. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell* 2016;30:27–42.
78. Gwynn ME, DeRemer DL. The Emerging Role of PD-1/PD-L1-Targeting Immunotherapy in the Treatment of Metastatic Urothelial Carcinoma. *Ann Pharmacother* 2018;52:60–8.
79. Teo MY, Seier K, Ostrovnaya I, Regazzi AM, Kania BE, Moran MM, Cipolla CK, Bluth MJ, Chaim J, Al-Ahmadie H, Snyder A, Carlo MI, et al. Alterations in DNA Damage Response and Repair Genes as Potential Marker of Clinical Benefit From PD-1/PD-L1 Blockade in Advanced Urothelial Cancers. *J Clin Oncol* 2018;36:1685–94.
80. Pietzak EJ, Bagrodia A, Cha EK, Drill EN, Iyer G, Isharwal S, Ostrovnaya I, Baez P, Li Q, Berger MF, Zehir A, Schultz N, et al. Next-generation Sequencing of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer Reveals Potential Biomarkers and Rational Therapeutic Targets. *Eur Urol* 2017;72:952–9.
81. Breyer J, Wirtz RM, Otto W, Erben P, Worst TS, Stoehr R, Eckstein M, Denzinger S, Burger M, Hartmann A. High PDL1 mRNA expression predicts better survival of stage pT1 non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) patients. *Cancer Immunol Immunother Cll* 2018;67:403–12.
82. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Hirakawa H, Takahashi Y, Nakagawa

- S, Watanabe G, Tada H, Suzuki A, Ohuchi N, Ishida T. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Breast Cancer Res BCR* 2015;17:124.
83. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 2012;30:531–64.
84. Weixler B, Cremonesi E, Sorge R, Muraro MG, Delko T, Nebiker CA, Däster S, Governa V, Amicarella F, Soysal SD, Kettelhack C, von Holzen UW, et al. OX40 expression enhances the prognostic significance of CD8 positive lymphocyte infiltration in colorectal cancer. *Oncotarget* 2015;6:37588–99.
85. Halstead AM, Kapadia CD, Bolzenius J, Chu CE, Schriefer A, Wartman LD, Bowman GR, Arora VK. Bladder-cancer-associated mutations in RXRA activate peroxisome proliferator-activated receptors to drive urothelial proliferation. *eLife* 2017;6.
86. Goldstein JT, Berger AC, Shih J, Duke FF, Furst L, Kwiatkowski DJ, Cherniack AD, Meyerson M, Strathdee CA. Genomic Activation of PPAR γ Reveals a Candidate Therapeutic Axis in Bladder Cancer. *Cancer Res* 2017;77:6987–98.
87. Korpál M, Puyang X, Jeremy Wu Z, Seiler R, Furman C, Oo HZ, Seiler M, Irwin S, Subramanian V, Julie Joshi J, Wang CK, Rimkunas V, et al. Evasion of immunosurveillance by genomic alterations of PPAR γ /RXR α in bladder cancer. *Nat Commun [Internet]* 2017 [cited 2019 Oct 13];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5524640/>
88. Rochel N, Krucker C, Coutos-Thévenot L, Osz J, Zhang R, Guyon E, Zita W, Vanthong S, Hernandez OA, Bourguet M, Badawy KA, Dufour F, et al. Recurrent activating mutations of PPAR γ associated with luminal bladder tumors. *Nat Commun [Internet]* 2019 [cited 2019 Oct 13];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6335423/>
89. Knowles MA. Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target. *World J Urol* 2007;25:581–93.
90. Tan TZ, Rouanne M, Tan KT, Huang RY-J, Thiery J-P. Molecular Subtypes of Urothelial Bladder Cancer: Results from a Meta-cohort Analysis of 2411 Tumors. *Eur Urol* 2019;75:423–32.
91. Shen YL, Gan Y, Gao HF, Fan YC, Wang Q, Yuan H, Song YF, Wang JD, Tu H. TNFSF9 exerts an inhibitory effect on hepatocellular carcinoma. *J Dig Dis* 2017;18:395–403.
92. Pham QT, Oue N, Sekino Y, Yamamoto Y, Shigematsu Y, Sakamoto N, Sentani K, Uraoka N, Yasui W. TDO2 Overexpression Is Associated with Cancer Stem Cells and Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncology* 2018;95:297–308.
93. Zhang Y, Zhang Z, Li Z, Gong D, Zhan B, Man X, Kong C. MicroRNA-497 inhibits the proliferation, migration and invasion of human bladder transitional cell carcinoma cells by targeting E2F3. *Oncol Rep* 2016;36:1293–300.
94. de Bono JS, Rowinsky EK. The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol Med* 2002;8:S19-26.
95. Arfaoui AT, Mejri S, Belhaj R, Karkni W, Chebil M, Rammeh S. Prognostic value of immunohistochemical expression profile of epidermal growth factor receptor in urothelial bladder cancer. *J Immunoassay Immunochem* 2016;37:359–67.
96. Wong Y-N, Litwin S, Vaughn D, Cohen S, Plimack ER, Lee J, Song W,

- Dabrow M, Brody M, Tuttle H, Hudes G. Phase II trial of cetuximab with or without paclitaxel in patients with advanced urothelial tract carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2012;30:3545–51.
97. Hussain M, Daignault S, Agarwal N, Grivas PD, Siefker-Radtke AO, Puzanov I, MacVicar GR, Levine EG, Srinivas S, Twardowski P, Eisenberger MA, Quinn DI, et al. A randomized phase 2 trial of gemcitabine/cisplatin with or without cetuximab in patients with advanced urothelial carcinoma. *Cancer* 2014;120:2684–93.
98. Zhu C-Q, da Cunha Santos G, Ding K, Sakurada A, Cutz J-C, Liu N, Zhang T, Marrano P, Whitehead M, Squire JA, Kamel-Reid S, Seymour L, et al. Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2008;26:4268–75.
99. Wülfing C, Machiels J-PH, Richel DJ, Grimm M-O, Treiber U, De Groot MR, Beuzeboc P, Parikh R, Pétavy F, El-Hariry IA. A single-arm, multicenter, open-label phase 2 study of lapatinib as the second-line treatment of patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma. *Cancer* 2009;115:2881–90.
100. Liu D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, Garraway LA, Bellmunt J, Van Allen E, Rosenberg JE. Clinical Validation of Chemotherapy Response Biomarker ERCC2 in Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma. *JAMA Oncol* 2016;2:1094–6.
101. Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, Speights VO, Vogelzang NJ, Trump DL, deVere White RW, Sarosdy MF, Wood DP, Raghavan D, Crawford ED. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med* 2003;349:859–66.
102. Yin M, Joshi M, Meijer RP, Glantz M, Holder S, Harvey HA, Kaag M, Franssen van de Putte EE, Horenblas S, Drabick JJ. Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis. *The Oncologist* 2016;21:708–15.
103. Zargar H, Espiritu PN, Fairey AS, Mertens LS, Dinney CP, Mir MC, Krabbe L-M, Cookson MS, Jacobsen N-E, Gandhi NM, Griffin J, Montgomery JS, et al. Multicenter assessment of neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2015;67:241–9.
104. Tse J, Ghandour R, Singla N, Lotan Y. Molecular Predictors of Complete Response Following Neoadjuvant Chemotherapy in Urothelial Carcinoma of the Bladder and Upper Tracts. *Int J Mol Sci* 2019;20.
105. Li Q, Damish AW, Frazier Z, Liu D, Reznichenko E, Kamburov A, Bell A, Zhao H, Jordan EJ, Gao SP, Ma J, Abbosh PH, et al. ERCC2 Helicase Domain Mutations Confer Nucleotide Excision Repair Deficiency and Drive Cisplatin Sensitivity in Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2019;25:977–88.
106. Pietzak EJ, Zabor EC, Bagrodia A, Armenia J, Hu W, Zehir A, Funt S, Audenet F, Barron D, Maamouri N, Li Q, Teo MY, et al. Genomic Differences Between “Primary” and “Secondary” Muscle-invasive Bladder Cancer as a Basis for Disparate Outcomes to Cisplatin-based Neoadjuvant Chemotherapy. *Eur Urol* 2019;75:231–9.
107. Vandeveer AJ, Fallon JK, Tighe R, Sabzevari H, Schlom J, Greiner JW. Systemic Immunotherapy of Non-Muscle Invasive Mouse Bladder Cancer with Avelumab, an Anti-PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitor. *Cancer Immunol Res* 2016;

108. Langle YV, Belgorosky D, Prack McCormick B, Sahores A, Góngora A, Baldi A, Lanari C, Lamb C, Eiján AM. FGFR3 Down-Regulation is Involved in bacillus Calmette-Guérin Induced Bladder Tumor Growth Inhibition. *J Urol* 2016;195:188–97.
109. Hahn NM, Bivalacqua TJ, Ross AE, Netto GJ, Baras A, Park JC, Chapman C, Masterson TA, Koch MO, Bihle R, Foster RS, Gardner TA, et al. A Phase II Trial of Dovitinib in BCG-Unresponsive Urothelial Carcinoma with FGFR3 Mutations or Overexpression: Hoosier Cancer Research Network Trial HCRN 12-157. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2017;23:3003–11.
110. Dadhania V, Zhang M, Zhang L, Bondaruk J, Majewski T, Siefker-Radtke A, Guo CC, Dinney C, Cogdell DE, Zhang S, Lee S, Lee JG, et al. Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use. *EBioMedicine* 2016;12:105–17.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Classification <i>TNM</i> (2009)	p 16
Tableau 2	Amorces oligonucléotidiques designées	p 46
Tableau 3	Expression des 33 gènes de l'immunité anti-tumorale en fonction des 4 groupes du clustering (57 TVNIM)	p 99

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** Représentation des tumeurs de vessie selon le stade T p 17
- Figure 2** Grade des tumeurs de vessie d'après les recommandations du CCAFU p 18
- Figure 3** Vue endoscopique d'une tumeur de vessie p 20
- Figure 4** Résection trans-urétrale de vessie p 21/22
- Figure 5** Algorithme de prise en charge des TVNIM d'après les recommandations du CCAFU p 23
- Figure 6** Algorithme de prise en charge des TVIM d'après les recommandations du CCAFU p 27
- Figure 7** Les 2 voies de signalisation de la carcinogenèse urothéliale p 29
- Figure 8** Algorithme de prise en charge des TVIM selon Robertson et al. p 34
- Figure 9** Protocole d'extraction de l'ADN p 43
- Figure 10** Exemple de la courbe obtenue en *HRM* pour *PIK3CA* exon 20 p 44
- Figure 11** Exemple de l'analyse de la séquence de *PIK3CA* exon 20 p 45
- Figure 12** Clustering avec les 33 gènes de l'immunité et les 29 oncogènes sur les 121 échantillons tumoraux communs (TVNIM et TVIM) p 97
- Figure 13** Schéma proposé afin de stratifier les patients porteurs d'une TVIM pour la chimio-immunothérapie p 114

ANNEXES

Annexe 1 Article sur PD-1, CTLA4/CD28 et leurs ligands

Annexe 2 3^e article issu de la cohorte publié durant les années de thèse

Annexe 1. Article sur PD-1, CTLA4/CD28 et leurs ligands



Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 35 (2017) 257–263

UROLOGIC
ONCOLOGY

Original article

Correlation between messenger RNA expression and protein expression of immune checkpoint-associated molecules in bladder urothelial carcinoma: A retrospective study

Constance Le Goux, M.D.^a, Diane Damotte, M.D., Ph.D.^{b,c}, Sophie Vacher, M.D.^a,
Mathilde Sibony, M.D., Ph.D.^b, Nicolas Barry Delongchamps, M.D., Ph.D.^d,
Anne Schnitzler, M.D.^a, Benoit Terris, M.D., Ph.D.^b, Marc Zerbib, M.D., Ph.D.^d,
Ivan Bieche, M.D., Ph.D.^{a,e}, Géraldine Pignot, M.D., Ph.D.^{f,*}

^a Unité de Pharmacogénomique, Service de génétique, Institut Curie, Paris, France

^b Service d'Anatomopathologie, Hôpital Cochin, Université Paris Descartes, Paris, France

^c Cancer et Immunité anti tumorale, INSERM U1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

^d Service d'Urologie, Hôpital Cochin, Université Paris Descartes, Paris, France

^e Université Paris Descartes, Paris, France

^f Service d'Urologie, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France

Received 28 September 2016; received in revised form 30 December 2016; accepted 16 January 2017

Abstract

Objectives: Immunotherapy for bladder cancer seems to have promising results. Here, we evaluated the association between messenger RNA (mRNA) and protein levels and possible prognostic value of the programmed cell death 1/programmed cell death ligand 1 (PD-1/PD-L1) and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) immune checkpoint pathways during bladder carcinogenesis.

Methods and materials: Tumor samples were obtained from 155 patients (84 with muscle-invasive bladder cancer [MIBC], and 71 non-muscle-invasive bladder cancer [NMIBC]) and normal bladder tissue from 15 patients. We evaluated the mRNA expression of 3 genes in the PD-1 pathway (*PD-1*, *PD-L1*, and *PD-L2*) and 4 in the CTLA4 pathway (*CTLA4*, *CD28*, *CD80*, and *CD86*) in normal and tumoral human bladder samples by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction, with immunohistochemistry used to evaluate the protein expression of PD-1 and PD-L1 in tumor and immune cells. Results of molecular analyses were compared with survival analyses.

Results: As compared with normal bladder tissue, MIBC tissue showed *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA4*, and *CD80* overexpression (59.5%, 60.7%, 84.5%, and 92.9%, respectively), whereas overexpression was lower in NMIBC tissue (22.5%, 4.2%, 35.2%, and 46.5%, respectively). The results of reverse transcription polymerase chain reaction analysis were confirmed by immunohistochemistry, with a high correlation between mRNA and protein expression. On multivariate analyses, overexpression of the studied genes was not associated with prognosis in relapse or progression of NMIBC or in recurrence-free and overall survival of MIBC.

Conclusions: The CTLA4 pathway appears to be deregulated along with the PD-1/PD-L1 pathway in bladder carcinogenesis, with good correlation between mRNA and protein expression endorsing the useful role of immune checkpoints, especially for a large subgroup of MIBC. © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Bladder cancer; Molecular marker; RT-PCR; Immunohistochemistry; Immune checkpoints; PD-1; CTLA4

1. Introduction

The immune system is present in almost all solid tumors and its role for control of growth and metastasis of cancer has

been demonstrated in many tumors. However, the presence of tumors underlines the capacity of cancer cells to escape immune control through physiological mechanisms such as immune checkpoint inhibition of T-lymphocyte function [1].

Expression of the immune checkpoint genes programmed cell death 1 (PD-1) and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) has been

* Corresponding author. Tel.: +334-9-122-3366; fax: +331-5-310-2648.
E-mail addresses: pignotg@ipc.unicancer.fr, gg_pignot@yahoo.fr (G. Pignot).

assessed in bladder cancer. Aberrant expression of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) in urothelial cancer seems to be associated with aggressive tumors, which suggests a regulatory role of the PD-1/PD-L1 pathway in antitumor immunity [2]. The CTLA4 pathway, including CTLA4 and CD28 receptors on lymphocytes, and their ligands CD80 and CD86 on the surface of tumor cells, has also been described as overexpressed in bladder tumor and seems to play a critical role in T-cell coinhibition [3]. Therefore, the manipulation of immune checkpoints may be a beneficial target for immunotherapy in human urothelial cancer. Immunotherapy has already changed the treatment landscape for non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) with bacillus Calmette-Guérin (BCG) therapy [4,5], but systemic therapy for muscle-invasive bladder cancer (MIBC) has seen minimal progress, with no new approved therapies in the past 30 years.

Recent clinical trials of immune checkpoint inhibitors as second-line systemic therapy have shown a 12-month overall survival of 36% with a favorable toxicity profile (only 16% of patients with grade 3/4 adverse effects) [6]. Moreover, the response rate for tumors expressing PD-L1-positive tumor-infiltrating immune cells (IC) (i.e., IC 2/3 on immunohistochemistry analysis) was particularly high, with 11% complete response and 12-month overall survival up to 48% [6,7].

However, almost 10% of patients not expressing immune checkpoint-associated molecules will respond to treatment. To our knowledge, previous studies have exclusively assessed protein expression, and immunohistochemistry may not be accurate enough to detect the expression of such molecules, probably because results may vary with the choice and quality of antibodies and pathologist-dependent interpretation. Therefore, we need to identify molecular biomarkers of clinical response to better understand the mechanisms of variable response rates and guide prescriptions of these expansive drugs [8,9]. Current and ongoing trials are investigating ways to uncover predictive biomarkers to identify patients most likely to benefit from treatment.

The aim of this study was to compare the mRNA and protein expression of 7 genes involved in immune pathways in a large series of bladder tumor samples including NMIBC and MIBC tissue. A retrospective review of patient outcomes allowed for performing survival analyses to investigate the putative prognostic value of these molecular markers.

2. Materials and methods

2.1. Patients and samples

We analyzed 155 urothelial carcinoma samples (84 MIBC and 71 NMIBC) from patients who had undergone transurethral bladder resection or a radical cystectomy in our hospital between January 2002 and January 2006. Specimens of normal bladder tissue from 15 patients

undergoing surgery unrelated to bladder tumors (transurethral resection of the prostate and prostatic adenectomy) were used as normal bladder tissue. All patients signed a written informed consent. This study received approval from an institutional review board and was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

Immediately after surgery, tumor samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C (for RNA extraction) and fixed in formaldehyde. Each sample was reviewed by 2 pathologists (D.D. and M.S.) who were blinded to clinical outcomes. Tumors were restaged according to the 2009 TNM classification of bladder tumors [10] and were graded according to the OMS 2004 tumor-grading scheme [11]. Clinical and histological parameters and survival characteristics of the 2 populations (NMIBC and MIBC) are presented in Table 1.

In the NMIBC cohort, 32 (45.1%) and 28 (39.4%) patients received adjuvant intravesical instillations of chemotherapy (mitomycin) or immunotherapy (BCG), respectively. In the MIBC cohort, 12 patients (14.3%) received neoadjuvant chemotherapy before cystectomy and 25 (29.8%) received adjuvant chemotherapy taking into account pathological characteristics of the tumor and renal function. The median follow-up was 57.4 months (range: 1–158) for NMIBC and 12.5 months (range: 1–152) for MIBC.

2.2. Gene selection

From the literature on immunotherapy and bladder carcinogenesis, we selected 3 genes involved in the PD-1 pathway (*PD-1*, *PD-L1*, and *PD-L2*) and 4 in the CTLA4 pathway (*CTLA4*, *CD28*, *CD80*, and *CD86*) (Suppl. Data 1). We chose 1 endogenous RNA control gene, namely *TBP* (GenBank accession No. NM_003194), which encodes the TATA box-binding protein.

2.3. Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

The theoretical basis, primers and polymerase chain reaction (PCR) consumables, RNA extraction, complementary DNA synthesis, and PCR conditions have been previously described in detail [12]. For each investigated gene, mRNA value ≥ 3 was considered to represent marked overexpression and mRNA value ≤ 0.33 marked underexpression. We previously used the same cutoff value for altered tumor gene expression [12]. Primers for *TBP* and the 7 target genes were chosen by using the Oligo6.0 computer program (National Biosciences, Plymouth, MN).

2.4. PD-L1 and PD-1 protein expression

Representative blocks of paraffin-embedded tumor were available for 108 patients (50 NMIBC and 58 MIBC).

Table 1
Clinical and pathological characteristics of the studied population

	(A) Clinical and pathological characteristics of the 71 NMIBC			Muscle-invasive progression (n = 10)	
	No recurrence (n = 25)	Recurrence (n = 36)	P value ^a	Number (%)	P value ^a
	Number (%)	Number (%)			
Median age, y [range]	72 [44–88]	70.5 [31–90]	NS ^b	75 [67–87]	NS ^b
Sex					
Male	22 (88.0)	32 (88.9)	0.91	9 (90.0)	0.89
Female	3 (12.0)	4 (11.1)		1 (10.0)	
Smoking status					
Nonsmoker	13 (52.0)	15 (41.7)	0.43	5 (50.0)	0.81
Smoker	12 (48.0)	21 (58.3)		5 (50.0)	
History of NMIBC					
No	22 (88.0)	13 (36.1)	<0.0001	4 (40.0)	0.31
Yes	3 (12.0)	23 (63.9)		6 (60.0)	
Associated pTis					
No	25 (100.0)	36 (100.0)	0.99	8 (80.0)	0.0004
Yes	0.0 (0.0)	0 (0.0)		2 (20.0)	
Grade					
Low grade	10 (40.0)	14 (38.9)	0.93	1 (10.0)	0.07
High grade	15 (60.0)	22 (61.1)		9 (90.0)	
Tumor stage					
Ta	15 (60.0)	24 (66.7)	0.59	3 (30.0)	0.043
T1	10 (40.0)	12 (33.3)		7 (70.0)	
	(B) Clinical and pathological characteristics of the 84 MIBC			Overall survival (n = 46)	
	Disease-free survival (n = 49)				
	Number of patients (%)	Number of events (%) ^c	P value ^d	Number of events (%) ^c	P value ^d
Median age, y [range]	68 [44–91]	72.5 [44–91]	NS ^b	72 [64–80]	NS ^b
Sex					
Male	67 (79.8)	37 (55.2)	0.25	38 (56.7)	0.47
Female	17 (20.2)	12 (70.6)		8 (47.0)	
Smoking status					
Nonsmoker	34 (40.5)	18 (52.9)	0.41	12 (35.3)	0.0031
Smoker	50 (59.5)	31 (62.0)		34 (68.0)	
History of NMIBC					
No	59 (70.2)	30 (50.8)	0.033	31 (52.5)	0.53
Yes	25 (29.8)	19 (76.0)		15 (60.0)	
Associated pTis					
No	73 (86.9)	43 (58.9)	0.96	40 (54.8)	0.82
Yes	11 (13.1)	6 (54.5)		6 (54.5)	
Tumor stage					
T2	35 (41.7)	18 (51.4)	0.28	13 (37.1)	0.0061
≥T3	49 (58.3)	31 (63.3)		33 (67.3)	
Lymph node status					
N–	59 (70.2)	28 (47.5)	0.002	25 (42.4)	0.00046
N+	25 (29.8)	21 (84.0)		21 (84.0)	

NS = nonsignificant.

Bold values are significant values according to the definition given in M and M: p < 0.05.

^aChi-square test.

^bStudent *t* test.

^cFirst recurrence (local or metastatic).

^dLog-rank test.

^eDeath.

For each tumor, 2 pathologists selected the tumor block containing the highest density of IC, as assessed on hematoxylin and eosin-saffron-stained slides. Briefly, serial 5- μ m tissue sections were deparaffinized, rehydrated, and pretreated in appropriate buffer for antigen retrieval in a Leica automat. Tissue slides were then incubated at 48°C with a primary antibody

(anti-PD-1 [NAT, Abcam] or anti-PD-L1 [E1L3N, Cell Signaling], 1:100 dilution), then with appropriate secondary antibodies.

Immunostaining with the PD-L1 antibody was analyzed in tumoral and tumor-infiltrating IC. Tumors were considered positive with PD-L1 staining above the threshold of 1%. Immunostaining was scored semiquantitatively: 0 (no

positive IC), 1+ (scarce positive IC), or 2+ (numerous positive IC). The same score system was used for PD-1. All quantification was performed with blinding to clinical status by an expert pathologist (D.D.).

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses involved the use of SEM software. The clinicopathologic features of NMIBC and MIBC were tested for their association with tumor recurrence and survival by Student *t* test for continuous variables or chi-square test for qualitative variables. Relationships between clinical and histological variables and mRNA levels of target genes were tested by nonparametric Mann-Whitney *U* test or Kruskal-Wallis *H* test (a link between 1 qualitative and 1 quantitative variable). Correlations between mRNA and protein expression were determined by Kruskal-Wallis *H* test or Spearman's test. Survival curves were derived by Kaplan-Meier estimates with the log-rank test used to compare survival among subgroups. The prognostic effect of mRNA levels of genes, adjusted for other prognostic factors, was assessed by multivariate analysis with a Cox proportional hazards regression model. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. mRNA expression of the 7 investigated genes

In total, 6 of the genes (all but *PD-L2*) were significantly overexpressed in MIBC tumors as compared with normal samples (Table 2). In NMIBC tumors, *CD80* was the only gene with significant overexpression, and *PD-L2* was underexpressed as compared with normal samples.

In all, 59.5% and 60.7% of MIBC tumors overexpressed *PD-1* and *PD-L1*, respectively, whereas the proportion of overexpression was low in NMIBC samples (22.5% and 4.2%, respectively) (Suppl. Data 2). Similarly, 84.5% and 92.9% of MIBC tumors overexpressed *CTLA4* and its main

ligand *CD80*, respectively, whereas the proportion of overexpression was low in NMIBC samples (35.2% and 46.5%, respectively).

In the NMIBC subgroup, except for *PD-L1*, the expression of all genes significantly differed by stage (Ta vs. T1) (Suppl. Data 3). In contrast, the expression of only *PD-1*, *PD-L2*, and *CD86* differed by grade but at the limit of significance ($P = 0.05$, $P = 0.05$, and $P = 0.04$, respectively).

3.2. Protein expression of PD-1 and PD-L1

PD-L1-positive immunostaining ($\geq 1\%$) was noted in 50.9% (55/108) of tumor specimens. However, the proportion of PD-L1-positive tumors was 30.0% (15/50) in NMIBC samples and 69.0% (40/58) in MIBC samples ($P < 0.001$) (Table 3). The protein expression ($\geq 1+$) of PD-L1 and PD-1 on IC was significantly more common in MIBC than NMIBC ($P = 0.015$ and $P = 0.0002$, respectively).

3.3. Correlation between mRNA and protein expression

The mRNA and protein expression were highly concordant for *PD-1* and its ligands ($r_s = 0.75$ for *PD-L1*, 0.81 for *PD-L2*, $P < 0.0000001$), between *CTLA4* and its 2 ligands ($r_s = 0.89$ for *CD80*, 0.81 for *CD86*, $P < 0.0000001$), and between CD28 and its 2 ligands ($r_s = 0.80$ for *CD80*, 0.79 for *CD86*, $P < 0.0000001$) (Suppl. Data 4). The 2 pathways were highly correlated ($r_s = 0.88$ between *PD-1* and *CTLA4*, $P < 0.0000001$). We found high correlation between PD-1 and PD-L1 protein expression in IC ($P = 0.0017$) and between PD-L1 expression in tumor cells and PD-1 expression in IC ($P = 0.0032$).

Importantly, we found a strong correlation between reverse transcription PCR (RT-PCR) and immunohistochemistry findings, that is, a high correlation between mRNA and protein expression for both PD-1 and PD-L1 (Table 4). A cutoff value of $\geq 1+$ membrane staining of IC

Table 2
mRNA expression levels of studied genes in normal and tumor bladder samples

Genes	Normal (n = 15)	NMIBC (n = 71)	MIBC (n = 84)	MIBC/NMIBC P value ^a	ROC-AUC ^b	NMIBC/N P value ^a	ROC-AUC ^b	MIBC/N P value ^a	ROC-AUC ^b
PD-L1	1.00 [0.31–2.68] ^c	0.60 [0.08–7.96] ^c	3.91 [0.09–45.68] ^c	<0.0000001	0.861	0.13	0.376	0.000037	0.835
PD-L2	1.00 [0.43–1.92]	0.17 [0.01–3.54]	1.33 [0.06–26.77]	<0.0000001	0.877	0.00000025	0.074	0.29	0.586
PD-1	1.00 [0.00–1.67]	0.79 [0.00–11.27]	4.26 [0.28–106.99]	<0.0000001	0.814	0.26	0.526	0.0000037	0.876
CTLA4	1.00 [0.00–5.35]	1.63 [0.00–25.08]	8.90 [0.39–306.94]	<0.0000001	0.806	0.085	0.613	0.00000026	0.919
CD28	1.00 [0.18–3.86]	0.64 [0.02–8.28]	1.57 [0.07–14.06]	<0.0000001	0.763	0.61	0.343	0.046	0.662
CD80	1.00 [0.00–5.39]	2.46 [0.00–24.17]	12.37 [1.00–185.95]	<0.0000001	0.853	0.024	0.700	< 0.0000001	0.983
CD86	1.00 [0.29–2.23]	0.45 [0.07–5.98]	2.07 [0.12–24.28]	<0.0000001	0.825	0.38	0.257	0.0048	0.729

Bold values are significant values according to the definition given in M and M: $p < 0.05$.

^aKruskal-Wallis *H* test.

^bROC (receiver operating characteristics)-AUC (area under curve) analysis.

^cMedian mRNA value [range].

Table 3

Immunohistochemistry staining of PD-L1 in tumor cells and PD-L1 and PD-1 in immune cells, for the 108 available tumor samples

	PD-L1 (tumor cells)			<i>P</i> ^a
	<1%	1%–<10%	≥10%	
All tumors (<i>n</i> = 108)	53 (49.1)	39 (36.1)	16 (14.8)	0.000054
NMIBC (<i>n</i> = 50)	35 (70.0)	15 (30.0)	0 (0.0)	
MIBC (<i>n</i> = 58)	18 (31.0)	24 (41.4)	16 (27.6)	

	PD-L1 (immune cells)			<i>P</i> ^b	PD-1 (immune cells)			<i>P</i> ^b
	0+ (%)	1+ (%)	2+ (%)		0+ (%)	1+ (%)	2+ (%)	
All tumors (<i>n</i> = 108)	47 (43.5)	44 (40.7)	17 (15.8)	0.015	44 (40.7)	39 (36.1)	25 (23.2)	0.0002
NMIBC (<i>n</i> = 50)	28 (56.0)	14 (28.0)	8 (16.0)		30 (60.0)	13 (26.0)	7 (14.0)	
MIBC (<i>n</i> = 58)	19 (32.8)	30 (51.7)	9 (15.5)		14 (24.2)	26 (44.8)	18 (31.0)	

Bold values are significant values according to the definition given in M and M: *p* < 0.05.^aChi-square test (<1% vs. ≥1%).^bChi-square test (0+ vs. 1+/2+).

and ≥1% membrane staining of tumor cells significantly identified tumors with gene overexpression.

3.4. Prognostic value of the selected genes

On analyzing the association of clinical variables and gene levels, only *CTLA4* mRNA overexpression was significantly associated with high tumor grade and stage in NMIBC samples (*P* = 0.01 and *P* = 0.05, respectively) (Table 5). On multivariate analyses, the levels of the 7 selected genes were not associated with prognosis in relapse or progression of NMIBC or in recurrence-free and overall survival for MIBC. Expression of the 7 investigated genes showed no association with response to BCG therapy (Suppl. Data 5).

4. Discussion

Early results of clinical studies of CTLA4 and PD-L1 inhibitors are propelling immune modulating drugs to the forefront of emerging treatments for bladder cancer. Here, we

evaluated the association between the mRNA and protein expression and possible prognostic value of the 2 gene pathways during bladder carcinogenesis. As compared with normal bladder tissue, tumor samples showed overexpression of *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA4*, and *CD80*. The results of RT-PCR analysis were confirmed by immunohistochemistry, with good correlation between mRNA and protein expression endorsing the useful role of immune checkpoints, especially for a large subgroup of MIBC cases.

The relevance of PD-1/PD-L1 inhibitors in bladder cancer was first mentioned by a phase I study evaluating a human monoclonal antibody against PD-L1 (MPDL3280A) in 67 pretreated patients with advanced or metastatic disease [7]. An overall response rate of 52% was documented and the treatment was well tolerated. Promising results from 2 phase I trials assessing pembrolizumab and atezolizumab have pointed to the safety and efficacy of PD-1 pathway blockade [13,14]. More recently, Rosenberg et al. [6] investigated the role of atezolizumab in patients with disease progression after first-line treatment with platinum-based chemotherapy in an international multicentre phase II trial. Overall, the treatment

Table 4

Correlation between PD-1/PD-L1 mRNA and protein expression levels

				<i>P</i> value ^a
<i>Protein expression in immune cells</i>				
Gene expression	0+	1+	2+	0.045
PD-L1 mRNA ^b	0.80 [0.08–19.68]	2.17 [0.09–14.13]	2.34 [0.36–28.52]	
PD-1 mRNA ^b	0.64 [0.00–16.75]	2.20 [0.00–25.63]	4.80 [0.67–28.89]	
<i>Protein expression in tumor cells</i>				
Gene expression	<1%	1%–10%	≥10%	0.0001
PD-L1 mRNA ^b	0.74 [0.09–19.68]	2.03 [0.08–15.67]	5.63 [0.60–28.52]	

Bold values are significant values according to the definition given in M and M: *p* < 0.05.^aKruskal-Wallis *H* test.^bMedian mRNA value [range].^cSpearman's test.

Table 5
Relationship between CTLA4 mRNA level and clinical variables for the 71 patients with NMIBC

	Total population n (%)	CTLA4 mRNA expression ≤ 3 relative to normal tissue n (%)	CTLA4 mRNA expression > 3 relative to normal tissue n (%)	P ^a
Total	71 (100)	46 (64.8)	25 (35.2)	
Age				
≤ 60	17 (23.9)	10 (58.8)	7 (41.2)	0.55
> 60	54 (76.1)	36 (66.7)	18 (33.3)	
Sex				
Male	63 (88.7)	40 (63.5)	23 (36.5)	0.52
Female	8 (11.3)	6 (75.0)	2 (25.0)	
Smoking status				
Nonsmoker	33 (46.5)	24 (72.7)	9 (27.3)	0.19
Smoker	38 (53.5)	22 (57.9)	16 (42.1)	
History of NMIBC				
No	39 (54.9)	24 (61.5)	15 (38.5)	0.53
Yes	32 (45.1)	22 (68.7)	10 (31.3)	
Associated pTis				
No	69 (97.2)	45 (65.2)	24 (34.8)	0.66
Yes	2 (2.8)	1 (50.0)	1 (50.0)	
Grade				
Low	25 (35.2)	21 (84.0)	4 (16.0)	0.01
High	46 (64.8)	25 (54.3)	21 (45.7)	
Tumor stage				
pTa	42 (59.2)	31 (73.8)	11 (26.2)	0.05
pT1	29 (40.8)	15 (51.7)	14 (48.3)	

^aChi-square test.

was found safe and well tolerated, with only 16% of grade 3/4 adverse events. Treatment with atezolizumab resulted in an objective response rate of 15% in the entire cohort of 310 patients, with a median overall survival of 7.9 months. Blockade of the CTLA4 pathway is also under active investigation as another immunotherapy strategy in bladder cancers. Neoadjuvant treatment strategies with ipilimumab in localized bladder cancer before cystectomy demonstrated the safety and the feasibility of this approach [15]. Collectively, these novel therapeutic targets and treatment strategies hold promise to improve the outcome of patients with this malignancy. However, in light of the treatment cost, their accurate prescription is warranted and response to treatment should be correctly assessed. It will likely be interesting to assess the correlation of gene expression with response to systemic therapies.

Rosenberg et al. [6] emphasized higher objective response rates in patients with PD-L1 overexpression in IC (IC 2/3 $\geq 5\%$). Although these findings are encouraging, responding patients among those with PD-L1-negative IC highlights the importance of efforts to standardize biomarkers of response and to identify patients who are most likely to benefit. Little is known on this topic in urothelial carcinogenesis, which justifies our present study of 7 genes involved in PD-1 and CTLA4 pathways. To our knowledge, this is the first study to assess correlations between the gene and protein levels of PD-1 and PD-L1. This study is of outmost

importance because expression levels and prognostic value of PD-1 or PD-L1 still remain controversial [2,16–18]. These discrepancies may be explained by differences in the techniques used. Immunohistochemical results may vary with the choice and quality of antibodies (e.g., at least 6 different antibodies are available for PD-L1), and pathologist-dependent interpretation. Moreover, cutoff points among assays with different anti-PD-L1 antibodies vary. However, quantitative real-time RT-PCR is a sensitive, accurate, and rapid method but is not always available in clinical practice. Because the best technique is not clear, we must understand whether gene and protein expression profiles are correlated. Our immunohistochemistry findings confirmed mRNA overexpression for *PD-1* and *PD-L1* in both tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes, with good correlation. According to the optimal cutoff value, $\geq 1+$ membrane staining of IC and $\geq 1\%$ membrane staining of tumor cells are correctly identified tumors with gene overexpression.

Our results regarding PD-1 pathway activation in MIBC agree with previously published studies [16–18]. Moreover, we observed *PD-1* and *CTLA4* overexpression in the same tumor samples, with high correlation, which reveals the well-known costimulation of these 2 pathways in MIBC. This point is particularly remarkable in light of ongoing clinical trials based on preclinical evidence that anti-CTLA4 therapies efficiently synergize with anti-PD-1/PD-L1 antibodies and provide better response rate than single therapy.

So far, immunotherapies have been used only in advanced cancer forms. However, the novel immune checkpoint inhibitors exhibit specific and unique mechanisms of action and also feature good safety profiles, which must be considered in cases of NMIBC [19,20]. In previous studies, gene expression has been mainly assessed in MIBC samples, and we have little data on the role of immune checkpoints in NMIBC [16–18]. In our study, we included an equal amount of non-muscle-invasive and muscle-invasive tissue, with recurrence and progression rates in agreement with those usually reported. We found low overexpression of the 7 selected genes in NMIBC tissue, with no significant difference in mRNA expression as compared with normal bladder tissue (except for *CD80* and *PDL-2*), which suggests a minor role for the immune checkpoints in the early stages of bladder carcinogenesis. However, analysis of mRNA expression of the 7 selected genes in NMIBC tissue by stage and grade showed significant overexpression in pT1 tumors compared with pTa tumors, especially for *CTLA4* and its ligand *CD80*, which were overexpressed 3-fold in this subgroup. Overexpression of *CTLA4* was significantly associated with T1 stage and high tumor grade, so it may be a marker of aggressiveness during urothelial carcinogenesis.

Our results should be viewed with caution in that longer follow-up or a larger cohort of patients may be needed to reach significance for prognostic analysis. In addition, none of our patients had received immunotherapy at the time of metastatic disease. Therefore, we could not study the value

of our putative molecular markers as predictors of treatment response in the MIBC cohort. Prospective clinical studies associated with molecular evaluation of tumors are still needed to dissect the mechanisms of variable response rate and identify biomarkers of clinical response. Molecular analysis could be used similar to immunohistochemistry, depending on the experience of the investigators and the accessibility of the technique, because of good correlation between mRNA and protein expression.

In conclusion, our results support the involvement of the PD-1 and CTLA4 pathways in MIBC, with good correlation between PD-1/PD-L1 mRNA and protein expression levels.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.01.014>.

References

- [1] Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8:793–800.
- [2] Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:1173–82.
- [3] Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2002;20:29–53. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.091101.091806>.
- [4] Sharma P, Old LJ, Allison JP. Immunotherapeutic strategies for high-risk bladder cancer. *Semin Oncol* 2007;34:165–72.
- [5] Wu Y, Enting D, Rudman S, Chowdhury S. Immunotherapy for urothelial cancer: from BCG to checkpoint inhibitors and beyond. *Expert Rev Anticancer Ther* 2015;15:509–23.
- [6] Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, 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* 2016;387:1909–20.
- [7] Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 2014;515:558–62.
- [8] Aoun F, Kourie HR, Sideris S, Roumequère T, van Velthoven R, Gil T. Checkpoint inhibitors in bladder and renal cancers: results and perspectives. *Immunotherapy* 2015;7:1259–71.
- [9] Zibelman M, Ramamurthy C, Plimack ER. Emerging role of immunotherapy in urothelial carcinoma—advanced disease. *Urol Oncol* 2016;34:538–47.
- [10] Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. International Union Against Cancer, 7th ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2009;p.262–5.
- [11] Molinié V. Classification of bladder tumors in 2006. *Prog Urol FMC* 2006;16:7–10.
- [12] Pignot G, Bieche I, Vacher S, Güet C, Vieillefond A, Debré B, et al. Large-scale real-time reverse transcription-PCR approach of angiogenic pathways in human transitional cell carcinoma of the bladder: identification of VEGFA as a major independent prognostic marker. *Eur Urol* 2009;56:678–88.
- [13] Petrylak DP, Powles T, Bellmunt J, et al. A phase I study of MPDL3280A (anti-PDL1): updated response and survival data in urothelial bladder cancer (UBC). *J Clin Oncol* 2015;33(Suppl):[abstr 4501].
- [14] Plimack ER, Bellmunt J, Gupta S, et al. Pembrolizumab (MK-3475) for advanced urothelial cancer: updated results and biomarker analysis from KEYNOTE-012. *J Clin Oncol* 2015;33(Suppl):[abstr 4502].
- [15] Carthon BC, Wolchok JD, Yuan J, Kamat A, Ng Tang DS, Sun J, et al. Preoperative CTLA-4 blockade: tolerability and immune monitoring in the setting of presurgical clinical trial. *Clin Cancer Res* 2010;16:2861–71.
- [16] Inman BA, Sebo TJ, Frigola X, Dong H, Bergstralh EJ, Frank I, et al. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer* 2007;109:1499–505.
- [17] Boorjian SA, Sheinin Y, Crispen PL, Farmer SA, Lohse CM, Kuntz SM, et al. T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival. *Clin Cancer Res* 2008;14:4800–8.
- [18] Xylinas E, Robinson BD, Kluth LA, Volkmer BG, Hautmann R, Küfer R, et al. Association of T-cell co-regulatory protein expression with clinical outcomes following radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder. *Eur J Surg Oncol* 2014;40:121–7.
- [19] Vandeveer AJ, Fallon JK, Tighe R, Sabzevari H, Schlom J, Greiner JW. Systemic immunotherapy of non-muscle invasive mouse bladder cancer with avelumab, an anti-PD-L1 immune checkpoint inhibitor. *Cancer Immunol Res* 2016;4:452–62.
- [20] Boyerinas B, Jochems C, Fantini M, Heery CR, Gulley JL, Tsang KY, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity activity of a novel anti-PD-L1 antibody avelumab (MSB0010718C) on human tumor cells. *Cancer Immunol Res* 2015;3:1148–57.

Annexe 2. 3e article issu de la cohorte publié durant les années de thèse

ONCOLOGY LETTERS 18: 3471-3480, 2019

***PLEKHS1*: A new molecular marker predicting risk of progression of non-muscle-invasive bladder cancer**

GÉRALDINE PIGNOT¹, CONSTANCE LE GOUX², SOPHIE VACHER²,
ANNE SCHNITZLER², FRANÇOIS RADVANYI³, YVES ALLORY⁴,
FRANÇOIS LALLEMAND², NICOLAS BARRY DELONGCHAMPS⁵, MARC ZERBIB⁵,
BENOIT TERRIS⁶, DIANE DAMOTTE^{6,7} and IVAN BIECHE^{2,8}

¹Unit of Oncological Surgery 2, Paoli-Calmettes Institute, Marseille F-13009; ²Pharmacogenomics Unit, Genetics Department, Institut Curie; ³Molecular Oncology Team, Institut Curie, UMR 144-CNRS; ⁴Pathology Department, Institut Curie, Paris F-75005; ⁵Urology Department, Cochin Hospital, Paris Descartes University; ⁶Pathology Department, Cochin Hospital, Paris Descartes University, Paris F-75014; ⁷Cancer and Anti-tumor Immunity, INSERM U1138, Cordeliers Research Center; ⁸Inserm U1016, Cochin Institute, Paris Descartes University, Paris F-75006, France

Received February 28, 2019; Accepted June 3, 2019

DOI: 10.3892/ol.2019.10706

Abstract. Promoter mutations of pleckstrin homology domain-containing S1 (*PLEKHS1*) are frequent in several cancer types. To evaluate the DNA mutations, the mRNA expression and prognostic value of *PLEKHS1* was evaluated in bladder cancer. We investigated DNA mutations and mRNA expression of *PLEKHS1* in a first series of 154 bladder tumors [71 non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) and 83 muscle-invasive bladder cancers (MIBC)] from patients who underwent transurethral bladder resection or radical cystectomy between 2001 and 2006, and 20 normal bladder samples. Results were then validated in a second series of 181 bladder tumors (91 NMIBC and 90 MIBC). All patients have signed an informed consent form. DNA mutations were analysed by high-resolution melt analysis and sanger sequencing. The mRNA expression was measured by real-time reverse-transcriptase quantitative PCR. The results of the molecular analysis were compared with survival data. *PLEKHS1* mutations occurred in 25.0 and 32.2% of NMIBC and MIBC, respectively in the first series. These results were confirmed in the second series (33.0 and 37.8% of NMIBC and MIBC, respectively). In MIBC, DNA mutations were significantly more frequent with the basal than non-basal phenotype (61.5 vs. 27.1%; $P=0.0025$). The *PLEKHS1* mRNA level was increased in 22.5 and 27.7% of NMIBC and MIBC tumors

but was not associated with DNA mutations. In NMIBC, *PLEKHS1* mRNA overexpression was significantly associated with progression to muscle-invasive disease ($P=0.0069$) and remained an independent prognostic factor on multivariate analysis ($P=0.034$). DNA mutations of *PLEKHS1* occurred in one-third of bladder tumors and was frequent in the basal MIBC phenotype. *PLEKHS1* mRNA overexpression may be an independent prognostic factor of progression-free survival in NMIBC.

Introduction

Bladder cancer is the sixth most common cause of cancer mortality and its incidence has increased markedly in recent decades (1,2) as well as an increasing prevalence of established risk factors such as smoking, overweight, physical inactivity, and changing reproductive patterns associated with urbanization and economic development. Based on GLOBOCAN estimates, about 14.1 million new cancer cases and 8.2 million deaths occurred in 2012 worldwide. Over the years, the burden has shifted to less developed countries, which currently account for about 57% of cases and 65% of cancer deaths worldwide. Lung cancer is the leading cause of cancer death among males in both more and less developed countries, and has surpassed breast cancer as the leading cause of cancer death among females in more developed countries; breast cancer remains the leading cause of cancer death among females in less developed countries. Other leading causes of cancer death in more developed countries include colorectal cancer among males and females and prostate cancer among males. In less developed countries, liver and stomach cancer among males and cervical cancer among females are also leading causes of cancer death. Although incidence rates for all cancers combined are nearly twice as high in more developed than in less developed countries in both males and females, mortality rates are only 8 to 15% higher in more

Correspondence to: Dr Constance Le Goux, Pharmacogenomics Unit, Genetics Department, Institut Curie, 26 Rue d'Ulm, Paris F-75005, France
E-mail: constance.legoux@gmail.com

Key words: bladder cancer, DNA mutations, molecular marker, prognosis, reverse transcription-PCR

developed countries. This disparity reflects regional differences in the mix of cancers, which is affected by risk factors and detection practices, and/or the availability of treatment. Risk factors associated with the leading causes of cancer death include tobacco use (lung, colorectal, stomach, and liver cancer). Current prognostic factors, namely TNM stage and pathological grade, insufficiently predict outcome at the individual level. The different outcome for patients with the same stage and grade calls for new prognostic molecular markers that may also serve as therapeutic targets.

Several high-throughput studies have focused on delineating genomic changes and gene expression in the various stages of bladder-cancer development and progression. Recent genomic analyses, part of The Cancer Genome Atlas, have identified several new target genes not previously described in bladder carcinogenesis (3-6).

Pleckstrin homology domain-containing S1 (*PLEKHS1*) is one of the most remarkable targets, because after telomerase reverse transcriptase (*TERT*), it is the second gene of the human genome showing frequent somatic non-coding mutations within its promoter (7). This gene, located on chromosome 10q25.3, encodes the *PLEKHS1* protein with unknown function. These mutations are single-nucleotide substitutions in the *PLEKHS1* proximal promoter (in intron 1 with a non-coding exon 1 from NM_024889.4): substitutions that effect guanine at position Chr.10: 115511590 and cytosine at position Chr.10: 115511593 from the GRCh37 (*hg19*) genomic coordinate (or c.-20+70G and c.-20+73C from NM_024889.4). These mutations are close to the translation start site of the *PLEKHS1* gene (-3,447 and -3,444 bp upstream of the translation start site) and are flanked by stretches of 10 bp on both sides that are palindromic to each other. The two *PLEKHS1* promoter mutations could be considered among the most common noncoding mutations in cancer. In bladder cancer, almost 40% of tumors could be affected by promoter mutations of this gene (8). However, data on messenger ribonucleic acid (mRNA) expression levels in bladder cancer are still lacking.

We analyzed the frequency of promoter mutations and mRNA expression of *PLEKHS1* in two large series of 335 bladder tumors: 162 non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) (71 and 91, respectively) and 173 muscle-invasive bladder cancers (MIBC) (83 and 90, respectively). A retrospective review of patient outcomes allowed for performing survival analyses to highlight the putative prognostic value of this gene.

Patients and methods

Patients and samples. We analyzed samples from two series of patients with urothelial carcinoma of the bladder. The first series consisted of 154 patients who had undergone transurethral bladder resection or a radical cystectomy in our hospital between 2002 and 2007. Immediately after surgery, tumor samples from each patient were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C [for DNA (deoxyribonucleic acid) and RNA extraction] and fixed in formaldehyde. Specimens of normal bladder tissue from 20 patients undergoing surgery unrelated to bladder tumors (transurethral resection of the prostate, prostatic adenomelectomy) were used as sources of normal bladder tissues.

Each tumor was reviewed by two pathologists (DD and MS) who were blinded to the clinical outcomes. Tumors were re-staged according to the 2009 TNM classification of bladder tumors (9) and were graded according to the WHO 2004 tumor-grading scheme (10). Standard follow-up visits followed current guidelines.

The second series was collected from 181 patients treated surgically between 1988 and 2006 at Henri Mondor Hospital, Institut Gustave Roussy (Villejuif, France) and Foch Hospital (Suresnes, France). Pure SCC and pure adenocarcinoma were excluded. Immediately after surgery, tumor samples from each patient were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C (for DNA and RNA extraction) and fixed in formaldehyde. For non muscle invasive cases (stage Ta or T1), TURB material was used; for muscle invasive cases, TURB or cystectomy material was used, without prior neoadjuvant chemotherapy, as previously described in Rebouissou *et al* (11).

All patients provided written informed consent. These studies received approval from an institutional review board, Centre d'Éthique Clinique de l'Hôpital Cochin, and was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

DNA mutation analysis. *PLEKHS1* has two mutational spots that are well described. The assessment was performed by a screening with high-resolution melt (HRM) analysis followed by Sanger sequencing of samples with a mutated profile on HRM to validate the HRM data and determine the nomenclature of mutations found. The nucleotide sequences for the primers were for *PLEKHS1*-U (5'-CTCCAAGGCTGGGATGATCTA-3') and *PLEKHS1*-L (5'-AAGAAAGTGCCATAACAGAAATACA-3') (polymerase chain reaction (PCR) product of 107 bp).

Real-time RT-qPCR. The theoretical basis, primers and PCR consumables, RNA extraction, complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) synthesis, and PCR-reaction conditions were previously described in detail (12). One endogenous RNA control gene was chosen, namely *TBP* (GenBank accession no. NM_003194), which encodes the TATA box-binding protein. Because *PLEKHS1* was expressed in tumor samples but not normal bladder tissue, values were normalized so that a Ct value of 35 was set to 1. Taking into account the optimal cut-off for *PLEKHS1*, mRNA values ≥ 100 were considered overexpression.

Primers were chosen with the assistance of the Oligo 6.0 computer program (National Biosciences, Plymouth, MN). The nucleotide primer sequences were *PLEKHS1*-U (5'-AAGATGTTTAAATGCCACCCTGATG-3') and *PLEKHS1*-L (5'-CCAGTCTTTAATCTTCTCCCTGTCGT-3') (PCR product of 99 bp). Experiments were performed in duplicate for each data point.

Statistical analysis. The clinicopathologic features of NMIBC and MIBC were tested for their association with tumor recurrence and survival by Student's t-test for continuous variables or χ^2 test for qualitative variables. The distribution of mRNA levels was described with medians (range). Relationships between clinical and histological variables and mRNA levels of *PLEKHS1* were tested by the non-parametric Mann-Whitney

Table I. Clinical, pathological and survival characteristics of the 71 NMIBC of the first series.

Characteristic	Whole population, n (%)	No recurrence, n (%)	Recurrence		Muscle-invasive progression	
			n (%)	P-value ^a	n (%)	P-value ^b
Total population	71 (100.0)	25 (35.2)	36 (50.7)		10 (14.1)	
Age (years)						0.08
≥60	56 (78.9)	19 (76.0)	27 (75.0)	0.93	10 (100.0)	
<60	15 (21.1)	6 (24.0)	9 (25.0)		0 (0.0)	
Sex						
Male	63 (88.7)	22 (88.0)	32 (88.9)	0.91	9 (90.0)	0.89
Female	8 (11.3)	3 (12.0)	4 (11.1)		1 (10.0)	
Smoking status						
Non-smoker	33 (46.5)	13 (52.0)	15 (41.7)	0.43	5 (50.0)	0.81
Smoker	38 (53.5)	12 (48.0)	21 (58.3)		5 (50.0)	
History of NMIBC						
No	39 (54.9)	22 (88.0)	13 (36.1)	<0.0001	4 (40.0)	0.31
Yes	32 (45.1)	3 (12.0)	23 (63.9)		6 (60.0)	
Associated pTis						
No	69 (97.2)	25 (100.0)	36 (100.0)	0.99	8 (80.0)	0.0004
Yes	2 (2.8)	0 (0.0)	0 (0.0)		2 (20.0)	
Grade						
Low	25 (35.2)	10 (40.0)	14 (38.9)	0.93	1 (10.0)	0.07
High	46 (64.8)	15 (60.0)	22 (61.1)		9 (90.0)	
Tumor stage						
Ta	42 (59.2)	15 (60.0)	24 (66.7)	0.59	3 (30.0)	0.043
T1	29 (40.8)	10 (40.0)	12 (33.3)		7 (70.0)	

^aχ² test (recurrence vs no recurrence); ^bχ² test (muscle-invasive progression vs. others). NMIBC, non-muscle-invasive bladder cancer.

U test and Kruskal-Wallis H-test. Overall survival (OS) was calculated from the date of surgery until death or the last follow-up. Recurrence-free survival (RFS) was defined as the time from the date of surgery to the first local relapse or first metastasis. For NMIBC, progression-free survival (PFS) was defined as the time from the date of surgery to progression to muscle-invasive disease. Survival curves were derived from Kaplan-Meier estimates. The log-rank test was used to compare survival between subgroups. The prognostic impact of mRNA levels, adjusted for the other prognostic factors, was assessed by Cox proportional-hazards regression analysis, estimating hazard ratios and 95% confidence intervals. The variables significant in univariate analysis (P<0.10) were included in multivariate analysis. Differences were considered significant at P<0.05.

Results

Clinicopathologic characteristics of the cohorts. Complete clinical, histological and survival data were obtained from medical records for these 154 patients [129 men and 25 women; median age 70 years (range, 31-91)]. Pathological staging showed NMIBC in 71 patients (25 low-grade pTa,

17 high-grade pTa, 29 high-grade pT1) and high-grade MIBC in 83 patients. For NMIBC, the median follow-up was 57.4 months (range, 1-158 months; mean follow-up, 61 months). For MIBC, the median follow-up was 12.5 months (range, 1-152 months; mean follow-up, 29 months). In the MIBC cohort, 12 patients (14.5%) received neoadjuvant chemotherapy before cystectomy and 25 (30.1%) received adjuvant chemotherapy taking into account pathological characteristics of the tumor and renal function. Clinical, histological and survival characteristics for the first series are presented in Tables I and II.

The second series consisted of an independent cohort of 181 patients with bladder cancer [150 men and 31 women; median age 67 years (range, 30-95)]. Pathological staging showed NMIBC in 91 patients (33 low-grade pTa, 17 high-grade pTa, 41 high-grade pT1) and high-grade MIBC in 90 patients. In this second cohort, molecular subgroups (basal phenotype, called MC7, vs non-basal phenotype) were previously determined by using the CIT (Carte d'Identité des Tumeurs) classification (11) we identified an MIBC subgroup accounting for 23.5% of MIBC, associated with shorter survival and displaying a basal-like phenotype, as shown by the expression of epithelial basal cell

Table II. Clinical, pathological and survival characteristics of the 83 muscle-invasive bladder cancer of the first series.

Characteristic	Whole population, n (%)	Disease-free survival		Overall survival	
		Number of events (%) ^a	P-value ^c	Number of events (%) ^b	P-value ^c
Total population	83 (100.0)	48 (57.8)		46 (55.4)	
Age (years)					
≥60	61 (73.5)	40 (65.5)	0.017	39 (63.9)	0.009
<60	22 (26.5)	8 (36.4)		7 (31.8)	
Sex					
Male	66 (79.5)	36 (54.5)	0.23	38 (57.6)	0.44
Female	17 (20.5)	12 (70.6)		8 (47.1)	
Smoking status					
Non-smoker	34 (41.0)	18 (52.9)	0.45	12 (35.3)	0.002
Smoker	49 (59.0)	30 (61.2)		34 (69.4)	
History of NMIBC					
No	59 (71.1)	30 (50.8)	0.043	31 (52.5)	0.41
Yes	24 (28.9)	18 (75.0)		15 (62.5)	
Associated pTis					
No	73 (88.0)	43 (58.9)	0.59	40 (54.8)	0.76
Yes	10 (12.0)	5 (50.0)		6 (60.0)	
Tumor stage					
T2	34 (41.0)	17 (50.0)	0.10	13 (38.2)	0.009
≥T3	49 (59.0)	31 (63.3)		33 (67.3)	
Lymph node status					
N-	58 (69.9)	27 (46.6)	0.002	25 (43.1)	0.0006
N+	25 (30.1)	21 (84.0)		21 (84.0)	

^aFirst recurrence (local or metastatic); ^bDeath; ^c χ^2 test. NMIBC, non-muscle-invasive bladder cancer.

markers. Basal-like tumors presented an activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR). None patient of the second cohort received neoadjuvant chemotherapy. As in the first cohort, patients received adjuvant chemotherapy taking into account pathological characteristics of the tumor if they were eligible. Clinical and histological variables did not differ between the two series, except for history of NMIBC (Table III).

DNA mutations of *PLEKHS1*. DNA mutation analysis involved 103 available tumor DNA samples (44 NMIBC and 59 MIBC) from the first series and 18 normal bladder samples, then the 181 tumor samples (91 NMIBC and 90 MIBC) from the second series.

In the first series, 11/44 NMIBC (25.0%) and 19/59 MIBC (32.2%) samples had a promoter-mutated profile (Table IV). The *PLEKHS1* promoter exhibited recurrent mutations at two genomic positions: c.-20+70 (G>A and G>C) and c.-20+73 (C>A, C>T and C>G). NMIBC and MIBC samples did not differ by type of mutation (P=0.43).

In the second series, 30/91 NMIBC (33.0%) and 34/90 MIBC (37.8%) samples had a promoter-mutated profile (Table IV). The DNA-mutated profile was not significantly associated with clinical parameters for patients with NMIBC

(Table V) or MIBC (Table VI). Regarding molecular subgroups in MIBC, a DNA-mutated profile was significantly more frequent with the basal phenotype (MC7) than the non-basal phenotype (61.5 vs. 27.1%, P=0.0025). *PLEKHS1* DNA mutation was not associated with prognosis, in terms of recurrence or progression with NMIBC and in terms of RFS or OS with MIBC (data not shown).

mRNA expression of *PLEKHS1*. The mRNA expression of *PLEKHS1* was assessed in the first series (n=154). The median mRNA *PLEKHS1* level was 19.7 [range, 0.0-972.6] with NMIBC and 25.7 [0.0-2288.1] with MIBC, vs. 0.0 [0.0-21.4] in normal bladder samples. *PLEKHS1* was overexpressed in NMIBC and MIBC versus normal bladder tissue (P=0.00031 and P=0.000025), with no difference in level between NMIBC and MIBC (P=0.51). Overall, 22.5 and 27.7% of NMIBC and MIBC tumors showed *PLEKHS1* overexpression (vs. 0% in normal bladder samples, P<0.01). *PLEKHS1* mRNA level was not associated with DNA mutations in NMIBC (P=0.39) or MIBC (P=0.84).

Prognostic value of *PLEKHS1* mRNA overexpression. *PLEKHS1* mRNA overexpression was not significantly associated with clinical variables in NMIBC (Table VII) or MIBC

Table III. Clinical and pathological characteristics of NMIBC and MIBC the two series.

A, NMIBC				
Characteristic	Whole population, n (%)	First series, n (%)	Second series, n (%)	P-value ^b
Total population	162 (100.0)	71 (100.0)	91 (100.0)	
Age (years) ^a				
≥60	108 (72.0)	56 (78.9)	52 (65.8)	0.08
<60	42 (28.0)	15 (21.1)	27 (34.2)	
Sex				
Male	138 (85.2)	63 (88.7)	75 (82.4)	0.26
Female	24 (14.8)	8 (11.3)	16 (17.6)	
History of NMIBC ^b				
No	108 (71.5)	39 (54.9)	69 (86.3)	<0.0001
Yes	43 (28.5)	32 (45.1)	11 (13.7)	
Associated pTis ^c				
No	134 (93.7)	69 (97.2)	65 (90.3)	0.09
Yes	9 (6.3)	2 (2.8)	7 (9.7)	
Grade				
Low	58 (35.8)	25 (35.2)	33 (36.3)	0.89
High	104 (64.2)	46 (64.8)	58 (63.7)	
Tumor stage				
Ta	92 (56.8)	42 (59.2)	50 (54.9)	0.59
T1	70 (43.2)	29 (40.8)	41 (45.1)	
B, MIBC				
Characteristic	Whole population, n (%)	First series, n (%)	Second series, n (%)	P-value ^b
Total population	173 (100.0)	83 (100.0)	90 (100.0)	
Age (years) ^d				
≥60	124 (73.8)	61 (73.5)	63 (74.1)	0.93
<60	44 (26.6)	22 (26.5)	22 (25.9)	
Sex				
Male	141 (81.5)	66 (79.5)	75 (83.3)	0.52
Female	32 (18.5)	17 (20.5)	15 (16.7)	
History of NMIBC ^e				
No	135 (84.4)	73 (88.0)	62 (80.5)	0.20
Yes	25 (15.6)	10 (12.0)	15 (19.5)	
Associated pTis ^f				
No	135 (84.4)	73 (88.0)	62 (80.5)	0.20
Yes	25 (15.6)	10 (12.0)	15 (19.5)	
Tumor stage				
T2	66 (38.2)	34 (41.0)	32 (35.6)	0.46
≥T3	107 (61.8)	49 (59.0)	58 (64.4)	
Lymph node status ^g				
N ⁻	93 (63.7)	58 (69.9)	35 (55.6)	0.07
N ⁺	53 (36.3)	25 (30.1)	28 (44.4)	

^aData available for 79 patients; ^bdata available for 80 patients; ^cdata available for 72 patients, in the second series; ^ddata available for 85 patients; ^edata available for 83 patients; ^fdata available for 77 patients; ^gdata available for 63 patients, in the second series. ^hχ² test. NMIBC, non-muscle-invasive bladder cancer; MIBC, muscle-invasive bladder cancer.

(Table VIII). With NMIBC, *PLEKHS1* overexpression was associated with worse PFS on univariate analysis (P=0.0069) (Fig. 1). Five- and 10-year PFS rates were 72.4 and 38.8%

with *PLEKHS1* overexpression versus 88.9 and 88.7% without *PLEKHS1* overexpression. Other clinical variables affecting PFS on univariate analysis with P<0.10 on log-rank test

Table IV. Frequency of mutations in the *PLEKHS1* promoter in the two series.

<i>PLEKHS1</i> profile	First series (n=103)			Second series (n=181)		
	Mutated n (%)	Not mutated n (%)	P-value ^a	Mutated n (%)	Not mutated n (%)	P-value ^a
All tumors	30 (29.1)	73 (70.9)	0.43	64 (35.4)	117 (64.4)	0.50
NMIBC	11 (25.0)	33 (75.0)		30 (33.0)	61 (67.0)	
MIBC	19 (32.2)	40 (67.8)		34 (37.8)	56 (62.2)	

^a χ^2 test. *PLEKHS1*, pleckstrin homology domain-containing S1; NMIBC, non-muscle-invasive bladder cancer; MIBC, muscle-invasive bladder cancer.

Table V. Association of clinicopathological variables and *PLEKHS1* DNA mutated profile with NMIBC from the second series.

Characteristic	Total population, n (%)	<i>PLEKHS1</i> mutated, n (%)	Not mutated, n (%)	P-value ^a
Total	91 (100.0)	30 (33.0)	61 (67.0)	
Age (years) ^b				0.95
≥60	52 (65.8)	17 (32.7)	35 (67.3)	
<60	27 (34.2)	9 (33.3)	18 (66.7)	
Sex				0.74
Male	75 (82.4)	26 (35.1)	48 (64.9)	
Female	16 (17.6)	4 (26.7)	11 (73.3)	
History of NMIBC ^c				0.36
No	69 (86.3)	26 (37.7)	43 (62.3)	
Yes	11 (13.7)	2 (18.2)	9 (81.8)	
Associated pTis ^d				0.37
No	65 (90.3)	21 (32.3)	44 (67.7)	
Yes	7 (9.7)	4 (57.1)	3 (42.9)	
Grade				0.098
Low	33 (36.3)	7 (21.2)	26 (78.8)	
High	58 (63.7)	21 (38.2)	34 (61.8)	
Tumor stage				0.27
Ta	50 (54.9)	14 (28.0)	36 (72.0)	
T1	41 (45.1)	16 (39.0)	25 (61.0)	
Phenotype ^e				0.76
Basal	1 (1.3)	0 (0.0)	1 (100.0)	
Non-basal	78 (98.7)	26 (33.3)	52 (66.7)	

^a χ^2 test. ^bData available for 79 patients; ^cdata available for 80 patients; ^ddata available for 72 patients; ^edata available for 79 patients. *PLEKHS1*, pleckstrin homology domain-containing S1; NMIBC, non-muscle-invasive bladder cancer.

included T stage and grade and were retained for multivariate analysis. On multivariate analysis, *PLEKHS1* overexpression remained an independent prognostic factor of PFS (P=0.034) (Table IX).

Overall, 21/28 patients (75%) who received Bacillus Calmette-Guérin (BCG) therapy showed recurrent NMIBC or progression to an invasive tumor during follow-up, including 15 (53.6%) within the first 2 years. The median *PLEKHS1* mRNA level was higher but not significantly with BCG-refractory tumor or early recurrence (<24 months)

than for BCG responders (no recurrence or >24 months): 40.8 [range, 0.0-375.5] vs. 15.2 [0.6-381.6] (P=0.80).

With MIBC, *PLEKHS1* overexpression was not associated with RFS or OS (P=0.33 and P=0.057, respectively).

Discussion

Mutations of *PLEKHS1* are non-coding and are located in the gene promoter and therefore cannot be detected by whole-exome analyses. This is also the case for non-coding

Table VI. Association of clinicopathological variables and *PLEKHS1* DNA mutated profile with MIBC from the second series.

Characteristic	Total population, n (%)	<i>PLEKHS1</i> mutated, n (%)	Not mutated, n (%)	P-value ^a
Total	90 (100)	34 (64.8)	56 (35.2)	
Age ^b				
≥60	63 (74.1)	26 (41.3)	37 (58.7)	0.24
>60	22 (25.9)	6 (27.3)	16 (72.7)	
Sex				
Male	75 (83.3)	29 (38.7)	46 (61.3)	0.70
Female	15 (16.7)	5 (33.3)	10 (66.7)	
History of NMIBC ^c				
No	71 (85.5)	26 (36.6)	45 (63.4)	0.38
Yes	12 (14.5)	6 (50.0)	6 (50.0)	
Associated pTis ^d				
No	62 (80.5)	25 (40.3)	37 (59.7)	0.62
Yes	15 (19.5)	5 (33.3)	10 (66.7)	
Tumor stage				
T2	32 (35.6)	16 (50.0)	16 (50.0)	0.076
≥T3	58 (64.4)	18 (31.0)	40 (69.0)	
Lymph node status ^e				
N-	35 (55.6)	14 (40.0)	21 (60.0)	0.52
N+	28 (44.4)	9 (32.1)	19 (67.9)	
Phenotype ^f				
Basal	26 (30.6)	16 (61.5)	10 (38.5)	0.0025
Non-basal	59 (69.4)	16 (27.1)	43 (72.9)	

^a χ^2 test. ^bData available for 85 patients; ^cdata available for 83 patients; ^ddata available for 77 patients; ^edata available for 63 patients; ^fdata available for 85 patients. *PLEKHS1*, pleckstrin homology domain-containing S1; MIBC, muscle-invasive bladder cancer.

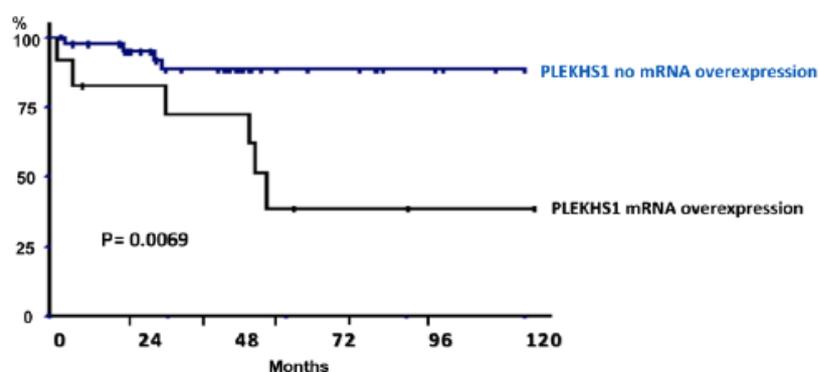


Figure 1. Progression-free survival with non-muscle-invasive bladder cancer by *PLEKHS1* mRNA expression. *PLEKHS1*, pleckstrin homology domain-containing S1.

mutations located on the upstream regulatory sequences for genes such as *TERT*, WD repeat domain 74 (*WDR74*) and succinate dehydrogenase complex subunit D (*SDHD*) (8). Point mutations in the *TERT* promoter are the best known and occur in a subset of tumors with clinical interest. In bladder urothelial carcinomas, almost two thirds of tumors show somatic test mutations (13).

To our knowledge, this is the first study to assess *PLEKHS1* DNA mutations and mRNA expression in bladder cancer. This assessment is of utmost importance because the association of gene expression and the prognostic impact of promoter mutations in the cancer remain unknown. Whole-genome sequencing of non-coding somatic mutations, rather than these exome studies, might provide answers to these deliberations.

Table VII. Association of clinicopathological variables and *PLEKHS1* mRNA level with NMIBC from the first series.

Characteristic	Total population, n (%)	<i>PLEKHS1</i> mRNA no overexpression, n (%)	<i>PLEKHS1</i> mRNA overexpression, n (%)	P-value ^a
Total	71 (100)	55 (77.5)	16 (22.5)	
Age				
≥60	56 (78.9)	43 (76.8)	13 (23.2)	0.79
<60	15 (21.1)	12 (80.0)	3 (20.0)	
Sex				
Male	63 (88.7)	48 (76.2)	15 (23.8)	0.79
Female	8 (11.3)	7 (87.5)	1 (12.5)	
Smoking status				
Non-smoker	33 (46.5)	25 (75.8)	8 (24.2)	0.75
Smoker	38 (53.5)	30 (78.9)	8 (21.1)	
History of NMIBC				
No	39 (54.9)	31 (79.5)	8 (20.5)	0.65
Yes	32 (45.1)	24 (75.0)	8 (25.0)	
Associated pTis				
No	69 (97.2)	54 (78.3)	15 (21.7)	0.35
Yes	2 (2.8)	1 (50.0)	1 (50.0)	
Grade				
Low	25 (35.2)	21 (84.0)	4 (16.0)	0.33
High	46 (64.8)	34 (73.9)	12 (26.1)	
Tumor stage				
pTa	42 (59.2)	35 (83.3)	7 (16.7)	0.15
pT1	29 (40.8)	20 (69.0)	9 (31.0)	

^aχ² test. *PLEKHS1*, pleckstrin homology domain-containing S1; NMIBC, non-muscle-invasive bladder cancer.

We investigated DNA mutations and mRNA expression in a large series of 154 bladder cancer cases. The results of DNA analysis were then validated in an independent second series (n=181). In these two series, tumors were half non-muscle invasive and half muscle invasive. Characteristics of both populations are consistent with urothelial carcinoma presentation. Moreover, we observed the classical prognostic factors (TNM stage and grade).

We showed a high frequency of promoter DNA mutations for *PLEKHS1*, detected in about one-third of bladder tumors (NMIBC and MIBC). Our results are consistent with the princeps study of Weinhold *et al* describing *PLEKHS1* DNA mutations in 8/20 samples (40%) of bladder cancer (8). This high rate of DNA mutations supports the concept of an essential involvement of this gene in bladder carcinogenesis, possibly similar to human *TERT*. It is also of interest as a biomarker to detect circulating tumor DNA that can be used for a variety of clinical and research purposes for bladder cancer.

In our study, *PLEKHS1* mutations were particularly frequent with the basal MIBC phenotype, which is known to have poor prognosis but is associated with improved survival after neoadjuvant chemotherapy (14). Further research is needed to assess the role of *PLEKHS1* in the chemosensitivity of MIBC.

PLEKHS1 mRNA was overexpressed in approximately one-quarter of bladder tumors, regardless of stage and grade.

As well, the expression was particularly high in some tumor samples, but normal bladder tissue showed very low levels.

Although the rates of mutations appear to be almost the same as the proportion of mRNA overexpression, we did not find an association between DNA alterations and mRNA expression. This is an unexpected result suggesting that mutations in the *PLEKHS1* promoter probably do not affect transcription and are not responsible for the increased mRNA expression in our bladder tumor series. Our results disagree with those of Weinhold *et al.*, who showed *PLEKHS1* mutations inversely correlated with mRNA expression level in a small series of 20 bladder tumors (8). In contrast, somatic mutations in the *TERT* promoter increased the expression of telomerase (13).

In NMIBC, *PLEKHS1* overexpression was associated with poor prognosis and increased risk of progression to muscle-invasive disease. The overexpression remained an independent prognostic factor on multivariate analysis, which is quite remarkable. Indeed, except for TNM stage and pathological grade, we have no molecular markers to distinguish tumors that would be able to progress in muscle-invasive disease during follow-up. This is especially crucial for pT1 high-grade tumors, which have been shown to progress in 30 to 50% of cases during the first 5 years. Early identification of patients at risk of disease progression

Table VIII. Association of clinicopathological variables and *PLEKHS1* mRNA level with MIBC from the first series.

Characteristic	Total population, n (%)	<i>PLEKHS1</i> mRNA no overexpression, n (%)	<i>PLEKHS1</i> mRNA overexpression, n (%)	P-value ^a
Total	83 (100)	60 (72.3)	23 (27.7)	
Age				
≥60	61 (73.5)	44 (72.1)	17 (27.9)	0.96
<60	22 (26.5)	16 (72.7)	6 (27.3)	
Sex				
Male	66 (79.5)	45 (68.2)	21 (31.8)	0.10
Female	17 (20.5)	15 (88.2)	2 (11.8)	
Smoking status				
Non-smoker	34 (41.0)	23 (67.6)	11 (32.4)	0.43
Smoker	49 (59.0)	37 (75.5)	12 (24.5)	
History of NMIBC				
No	59 (71.1)	39 (66.1)	20 (33.9)	0.05
Yes	24 (28.9)	21 (87.5)	3 (12.5)	
Associated pTis				
No	73 (88.0)	52 (71.2)	21 (28.7)	0.56
Yes	10 (12.0)	8 (80.0)	2 (20.0)	
Grade				
Low	34 (41.0)	25 (73.5)	9 (26.5)	0.83
High	49 (59.0)	35 (71.4)	14 (28.6)	
Tumor stage				
pTa	58 (69.9)	39 (68.4)	19 (32.8)	0.12
pT1	25 (30.1)	21 (84.0)	4 (16.0)	

^a χ^2 test. *PLEKHS1*, pleckstrin homology domain-containing S1; NMIBC, non-muscle-invasive bladder cancer.

Table IX. Cox proportional-hazards regression analysis of factors affecting progression-free survival with non-muscle-invasive bladder cancer.

Prognostic factor	Progression-free survival		
	HR	95% CI	P-value
T stage	3.92	(0.79-19.36)	0.093
Grade	2.19	(0.20-24.58)	0.52
<i>PLEKHS1</i> overexpression	4.01	(1.11-14.50)	0.034

PLEKHS1, pleckstrin homology domain-containing S1; HR, hazard ratio.

may lead to more aggressive therapeutic strategies, such as early cystectomy. One of the main issues is the potential response of these tumors to BCG therapy. In our series, even though *PLEKHS1* mRNA expression was three times higher with early recurrent or refractory tumor than other tumors, *PLEKHS1* was not a significant predictive factor of response to BCG therapy. However, the small number of patients who received BCG may explain the lack of statistical power in our study.

One limitation of our study is that a longer follow-up or a larger cohort of patients may be needed to show significance, especially for pT1 tumors and response to BCG. To confirm these data, prospective clinical studies associated with a molecular evaluation of tumors are needed. We tried to assess protein expression by western blot analysis and immunohistochemistry, but the two primary anti-*PLEKHS1* antibodies used (i.e., HPA037583, Sigma and H00079949-T01, Abnova) showed no specific protein bands on western blot analysis or on immunostaining (data not shown), which suggests no qualitative antibody available for *PLEKHS1*. Functional analyses should probably be done in parallel to investigate the role of *PLEKHS1* in carcinogenesis. Recently, Grossmann et al. identified an interaction between PIK3R3 (p55c regulatory subunit of PI3 kinase) and *PLEKHS1* (15), but the significance of this protein interaction remains uncertain. In our series, even if *PLEKHS1* mutations were significantly more frequent with the basal than non-basal MIBC phenotype, we did not identify any other associated gene or pathway alterations. Therefore, despite its prognostic value, *PLEKHS1* cannot be considered a therapeutic target at this time.

Our results support the involvement of *PLEKHS1* in bladder carcinogenesis. DNA mutations were observed in almost one-third of bladder cancers and approximately one quarter of NMIBC and MIBC tumors showed mRNA

overexpression. In MIBC, *PLEKHS1* mutations seem frequent with the basal phenotype. In NMIBC, *PLEKHS1* overexpression may be an independent prognostic factor of progression to muscle-invasive disease. Our study has many biases since it is a retrospective clinical study, small cohort and can only be considered as a preliminary study. The clinical interest remains to be demonstrated by a prospective study centered on high grade NMIBC. Further studies are needed to dissect the mechanisms of action and the specific role of *PLEKHS1* in bladder carcinogenesis and to develop therapeutic inhibitors.

Acknowledgements

Not applicable.

Funding

No funding was received.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

GP and CLG contributed to the acquisition and interpretation of data, and manuscript writing. SV, AS and FL contributed to the acquisition of data. FR, YA, NBD, MZ and BT acquired the data. DD contributed to acquisition and interpretation of data. IB contributed to the conception and design of the study, and interpretation of data. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The present study was approved by the local ethics and research committee of Mondor and Foch Hospitals, Centre d'Éthique Clinique de l'Hôpital Cochin (descriptive retrospective study). All patients provided written informed consent.

Patient consent for publication

All patients provided informed consent.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A: Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65: 87-108, 2015.

2. Lebreton T, Hervé JM, Yonneau L, Barré P, Lugagne PM, Butreau M, Molinié V and Botto H: Study of survival after cystectomy for bladder cancer. Report of 504 cases. *Prog Urol* 10: 553-560, 2000 (In French).
3. Salvi S, Calistri D, Gurioli G, Carretta E, Serra L, Gunelli R, Zoli W and Casadio V: Copy number analysis of 24 oncogenes: MDM4 identified as a putative marker for low recurrence risk in non muscle invasive bladder cancer. *Int J Mol Sci* 15: 12458-12468, 2014.
4. Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 507: 315-322, 2014.
5. Williams SV, Hurst CD and Knowles MA: Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum Mol Genet* 22: 795-803, 2013.
6. Massari F, Bria E, Ciccarese C, Munari E, Modena A, Zamboni V, Sperduti I, Artibani W, Cheng L, Martignoni G, *et al.*: Prognostic value of beta-tubulin-3 and c-Myc in muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder. *PLoS One* 10: e0127908, 2015.
7. Pignot G, le Goux C and Bieche I: Recent advances in bladder urothelial carcinogenesis. *Bull Cancer* 102: 1020-1035, 2015 (In French).
8. Weinhold N, Jacobsen A, Schultz N, Sander C and Lee W: Genome-wide analysis of noncoding regulatory mutations in cancer. *Nat Genet* 46: 1160-1165, 2014.
9. Sobin L, Gospodarowicz M and Wittekind C (eds.): TNM Classification of Malignant Tumors. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, USA, pp 262-265, 2009.
10. Molinié V: Classification of bladder tumors in 2006. In: *Prog Urol FMC*, pp16: 7-10, 2006.
11. Rebouissou S, Bernard-Pierrot I, de Reyniès A, Lepage ML, Krucker C, Chapeaublanc E, Hérault A, Kamoun A, Caillaud A, Letouzé E, *et al.*: EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Sci Transl Med* 6: 244ra91, 2014.
12. Pignot G, Bieche I, Vacher S, Güet C, Vieillefond A, Debré B, Lidereau R and Amsellem-Ouazana D: Large-scale real-time reverse transcription-PCR approach of angiogenic pathways in human transitional cell carcinoma of the bladder: Identification of VEGFA as a major independent prognostic marker. *Eur Urol* 56: 678-688, 2009.
13. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA Jr, Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovannella BC, *et al.*: TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 6021-6026, 2013.
14. McConkey DJ, Choi W, Shen Y, Lee IL, Porten S, Matin SF, Kamat AM, Corn P, Millikan RE, Dinney C, *et al.*: A prognostic gene expression signature in the molecular classification of chemotherapy-naïve urothelial cancer is predictive of clinical outcomes from neoadjuvant chemotherapy: A phase 2 trial of dose-dense methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin with bevacizumab in urothelial cancer. *Eur Urol* 69: 855-862, 2016.
15. Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, Speights VO, Vogelzang NJ, Trump DL, deVere White RW, Sarosdy MF, Wood DP Jr, Raghavan D and Crawford ED: Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med* 349: 859-866, 2003.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) License.