



HAL
open science

Caractérisation du phénomène de fluorescence périmembranaire permettant la mise en évidence des cellules urothéliales tumorales dans les urines dans la méthode exploitée par VitaDX

Charly Gutierrez

► **To cite this version:**

Charly Gutierrez. Caractérisation du phénomène de fluorescence périmembranaire permettant la mise en évidence des cellules urothéliales tumorales dans les urines dans la méthode exploitée par VitaDX. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2022. Français. NNT : 2022REN1B017 . tel-03860621

HAL Id: tel-03860621

<https://theses.hal.science/tel-03860621v1>

Submitted on 18 Nov 2022

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Cancérologie

Par

Charly GUTIERREZ

Caractérisation du phénomène de fluorescence périmembranaire permettant la mise en évidence des cellules urothéliales tumorales dans les urines dans la méthode exploitée par VitaDX

Thèse présentée et soutenue à Rennes , le 2 mai 2022

Unité de recherche : Unité INSERM UMR1242 Oncogenesis Stress Signaling (OSS)

Rapporteurs avant soutenance :

Evangelos Xylinas PU-PH, Hôpital Bichat - Claude-Bernard, Paris
Sophie Ferlicot PU-PH, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre

Composition du Jury :

Président : Christophe Massard PU-PH, Université Paris-Saclay
Examineurs : Halima Ahidouch PU-PH, Université de Picardie Jules Verne, Amiens
 Evangelos Xylinas PU-PH, Hôpital Bichat - Claude-Bernard, Paris
 Sophie Ferlicot PU-PH, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre

Dir. de thèse : Rémy Pedoux
Co-dir. de thèse : Laëtitia Lallement

Chargé de recherches, Université de Rennes 1, Rennes
Chef de projet, VitaDX, Rennes

Résumé

Pour détecter le cancer de la vessie (CV), la cytologie urinaire et la cystoscopie sont les premiers tests diagnostiques utilisés. La cytologie urinaire est non invasive, facile à collecter, avec une sensibilité moyenne et une spécificité élevée. C'est un moyen efficace de détecter les CV de haut grade, mais elle est moins efficace sur ceux de bas grade. Récemment, les propriétés fluorescentes des membranes plasmiques des cellules tumorales urothéliales, appelées fluorescence périmembranaire (FPM), trouvées dans la cytologie urinaire, se sont avérées être d'une utilité potentielle pour améliorer la détection précoce du CV. L'objectif principal de cette thèse a été de caractériser la FPM permettant la détection des cellules tumorales urothéliales dans l'urine.

Durant ces travaux, nous nous sommes intéressés au rôle que joue la caractéristique morphologique de la cellule urothéliale tumorale dans la FPM. Nous avons ensuite essayé de trouver un modèle de lignées cellulaires qui ne présentait pas de FPM dans l'objectif de cribler sa composition protéique et lipidique avec notre modèle du CV. Pour analyser de façon précise la moindre fluctuation de fluorescence, un logiciel de quantification de la FPM a été mis en place. Ne parvenant pas à trouver de lignées sans FPM, nous avons analysé la FPM des cellules urothéliales récupérées dans les urines de rat avec celles récupérées directement dans l'urothélium de rat. En constatant une différence de FPM en fonction d'où les cellules ont été récupérées, nous avons voulu déterminer quel phénomène cellulaire pouvait intervenir dans la modification de la FPM quand la cellule urothéliale passe de l'urothélium aux urines.

Les résultats obtenus ont donc permis de mieux comprendre et caractériser le phénomène de FPM. Au regard de nos résultats, nous suggérons que la forte résistance des cellules tumorales aux agressions extérieures leur permet de mieux survivre dans les urines, contrairement aux cellules saines qui, une fois en suspension, sont plus sensibles à ces agressions responsables de la perte de leur FPM.

Abstract

To detect bladder cancer (BC), urine cytology and cystoscopy are the primary diagnostic tests used. Urine cytology is noninvasive, easy to collect, with moderate sensitivity and high specificity. It is an effective way to detect high-grade BCs, but it is less effective on low-grade ones. Recently, the fluorescent properties of plasma membranes of urothelial tumor cells, called perimembrane fluorescence (PMF), found in urine cytology, have been shown to be of potential use in improving early detection of BC. The main objective of this thesis was to characterize PMF for the detection of urothelial tumor cells in urine.

During this work we were interested in the role that the morphological characteristic of the urothelial tumor cell plays in the PMF. We then tried to find a cell line model that did not show PMF in order to screen its protein and lipid composition with our BC model. To accurately analyze the slightest fluctuation in fluorescence, a PMF quantification software was implemented. Failing to find lines without PMF, we analyzed the PMF of urothelial cells recovered from rat urine with those recovered directly from rat urothelium. Noting a difference in PMF depending on where the cells were recovered, we wanted to determine what cellular phenomenon might be involved in the change in PMF when the urothelial cell moves from urothelium to urine.

The results obtained thus allowed us to better understand and characterize the PMF phenomenon. In view of our results, we suggest that the strong resistance of tumor cells to external aggression allow them to survive better in urine, contrary to healthy cells which, once in suspension, are more sensitive to these aggressions responsible for the loss of their PMF.

Remerciements

Je tiens à adresser mes sincères remerciements au Professeur Sophie Ferlicot et au Docteur Evangelos Xylinas et d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse, ainsi qu'aux Professeurs Christophe Massard et Halima Ahidouch d'avoir accepté de juger et d'assister à la soutenance de cette thèse.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers l'entreprise VitaDX et plus particulièrement envers Allan Rodriguez et Laëtitia Lallement pour m'avoir fait confiance dans cette aventure. Merci encore Laëtitia, pour l'encadrement et tout le temps passé sur le projet.

J'adresse également mes remerciements à mon directeur de thèse, le Docteur Rémy Pedoux. Merci pour la confiance qu'il m'a accordée, l'autonomie qu'il m'a laissée sur ce projet de thèse, les conseils qu'il m'a prodigués et son suivi constant.

Je remercie Louise qui, en ce moment, promène notre chienne à ma place parce que, comme souvent, je me suis mal organisé. Merci d'avoir été présente, tant pour les hauts que pour les bas.

Je remercie ma famille, mes parents et mes sœurs à qui je pense souvent, malgré l'éloignement. Quoique je ne donne pas souvent de nouvelles, je les aime et les remercie de m'avoir soutenu aveuglément dans ce projet.

Je remercie tout particulièrement Madame Valérie Bosq qui a consacré énormément de temps à relire mes écrits et qui a sûrement voulu, à certains moments, se percer les yeux. Je n'ai qu'un mot à dire : « pipi » !

Merci à tous mes colocataires pour leur soutien et leur bonne humeur. Merci à Greg, Arthur, Matthieu et Adrien, qui m'ont permis de rester encore un temps dans la vie étudiante et avec qui je ne garde que de bons souvenirs. Je remercie également Charlotte (une pharmacienne à la maison, quel plaisir !) et Anne-Lise (qui, disons-le, a provoqué une véritable tornade lorsqu'elle est entrée dans ma vie). Merci, Morgane, pour ces souvenirs incroyables et très old fashions. Merci de m'avoir contaminé avec tes passions pour l'écologie et le sport (plus l'une que l'autre, soyons honnête). Je t'attends pour jouer aux 7 Wonders avec Guillaume. Je remercie également Patxi, le coup de foudre de la coloc qui nous a quittés trop tôt. Merci à mes colocs actuels. Merci Pépé, pour ces partis de fléchettes endiablées. Merci Mathou, pour les discussions et les fous rires sur, je cite, « l'in*@~fi\$/dé \$ lité ». Je remercie également Bleuenn et ses rhumes chroniques, qui m'ont montré que tousser n'empêchait pas de chanter (ou presque !). Enfin, merci au plus jeune coloc, Clément, dont le principal talent est de gérer la musique et faire de la vinaigrette, passé 3 grammes du matin. Merci à tous, vous allez me manquer !

Remerciements

Merci Alice, une collègue devenue une amie avec qui j'ai ri jusqu'à oublier que l'on travaillait ensemble.
Merci, pour ce moment incroyable où tu as chanté « prout prout prout ».

Merci Laura ! Ton départ nous a brisé le cœur, mais les bons souvenirs perdurent, en particulier cette partie de fléchettes déchaînée au Tivoli, on les a bien battus.

Merci à la Famille Bosq, ce n'est que le début d'une aventure !

Merci à Kathleen pour tout le temps qu'elle m'a consacré. Merci pour ta patience face à mon manque d'organisation.

Merci à tous mes collègues du Labo. Merci Simon, mon compagnon de rage de tous les jours. Merci Raph, sans qui le projet n'aurait pas tant avancé (et merci pour la découverte de Dragon Quest et des 250 heures de jeux qui ont suivi). Un grand merci à Xavier pour le logiciel. Merci à Vesna, Federica, Federico et tous les autres qui m'ont aidé durant ma thèse, malgré le fait que mon sujet soit un O.V.N.I. dans ce labo.

Merci à tous mes amis de la région parisienne qui m'ont terriblement manqué durant ces trois années.
Merci à ceux qui sont venus me voir, on a vraiment bien rigolé ! Je reviens enfin !

Merci à ma professeure de cancérologie, dont j'ai oublié le nom qui m'a transmis son virus !

Merci à Franck Lebrun qui m'a fait découvrir le monde de la recherche.

Merci à Catherine Monnot qui m'a donné ma chance en master et qui m'a soutenu pour obtenir cette thèse.

Merci à ma chienne de m'avoir obligé à sortir tous les jours et ainsi éviter de grossir plus !

Enfin Merci à Marine Charpentier, cette dernière année était la meilleure des 3 !

Table des matières

Résumé	1
Abstract	2
Remerciements	3
Table des matières	5
Table des figures	8
Liste des abréviations	10
Introduction	12
1 Le cancer	12
1.1 Épidémiologie	12
1.2 Facteurs de risque	13
1.2.1 Modifiables	13
1.2.2 Non modifiables	14
1.3 La cancérogenèse	16
1.3.1 Les étapes de la cancérogenèse	17
1.3.1.1 L'initiation	17
1.3.1.2 La promotion	19
1.3.1.3 La progression	19
1.3.1.3.1 La résistance à la mort cellulaire	20
1.3.1.3.1.1 L'apoptose	20
1.3.1.3.1.1.1 La voie extrinsèque	20
1.3.1.3.1.1.2 La voie intrinsèque	21
1.3.1.3.1.1.3 Dérégulation de l'apoptose	21
1.3.1.3.1.2 Autophagie	22
1.3.1.3.1.2.1 Dérégulation de l'autophagie	22
1.3.1.3.1.3 Nécroptose	23
1.3.1.3.1.3.1 Dérégulation de la nécroptose	23
1.3.1.3.1.4 La sénescence	24
1.3.1.3.1.4.1 Les mécanismes d'échappement	26
1.3.1.3.2 L'angiogenèse tumorale	26
1.3.1.3.2.1 Le système vasculaire	26
1.3.1.3.2.2 L'angiogenèse pathologique	27
1.3.1.4 La dissémination métastatique	28
1.3.1.5 La transition épithélio-mésenchymateuse	29
1.3.1.5.1 L'anoïkis	30
1.3.1.5.2 Dérégulation de l'anoïkis	30
1.3.1.5.3 Initiations de la TEM	31
1.3.1.6 L'intravasation	31
1.3.1.7 L'extravasation	32
1.3.1.8 La transition mésenchymateuse-épithéliale	33
2 Le carcinome urothélial de la vessie	35
2.1 La vessie	35
2.1.1 Composition de la vessie	36
2.1.1.1 L'urothélium	36
2.1.1.1.1 La couche apicale	36
2.1.1.1.2 La couche intermédiaire	37
2.1.1.1.3 La couche basale	37
2.1.1.2 La lamina propria	38
2.1.1.3 La lamina muscularis mucosae	38
2.1.1.4 La membrane séreuse	38

Table des matières

2.1.1.5	L'adventice	38
2.2	Épidémiologie	38
2.3	Étiologie.....	40
2.4	Classification des Cancers de la Vessie.....	42
2.4.1	Les TVNIM.....	43
2.4.1.1	Les tumeurs papillaires non invasives (Ta).....	43
2.4.1.2	Les carcinomes in situ (Tis).....	43
2.4.1.3	Les tumeurs envahissant la lamina propria (T1)	43
2.4.2	Les TVIM	45
3	Les urines	46
3.1	Prélèvement des urines.....	47
3.1.1	La collecte non invasive.....	47
3.1.2	La collecte invasive.....	47
3.1.2.1	Le cathétérisme urétral.....	48
3.1.2.2	La ponction vésicale sus-pubienne.....	48
3.2	Analyse physique des urines	49
3.3	Analyse chimique et microscopique des urines	49
3.3.1	Les composés non cellulaires retrouvés dans les urines.....	50
3.3.2	Les composés cellulaires retrouvés dans les urines.....	50
3.3.2.1	Les cellules sanguines.....	50
3.3.2.1.1	L'hématurie	50
3.3.2.1.2	La leucocyturie	51
3.3.2.2	Les micro-organismes.....	51
3.3.2.2.1	Les bactéries.....	51
3.3.2.2.2	Les champignons	52
3.3.2.3	Les parasites	52
3.3.2.4	Les cellules épithéliales	52
3.3.2.4.1	Les cellules tubulaires rénales.....	52
3.3.2.4.2	Les cellules pavimenteuses	53
3.3.2.4.3	Les cellules de l'urothélium.....	53
4	Le diagnostic.....	54
4.1	La cytologie urinaire	54
4.1.1	Coloration au Papanicolaou	54
4.1.2	La classification : le Système de Paris.....	55
4.1.2.1	Les cellules négatives au cancer urothélial de haut grade.....	55
4.1.2.2	Les cellules urothéliales atypiques.....	56
4.1.2.3	Les suspicions de CUHG.....	58
4.1.2.4	Les cellules positives au CUHG	59
4.1.2.5	Les cellules positives au cancer urothéliale de bas grade (CUBG)	60
4.1.2.5.1	Les papillomes urothéliaux.....	61
4.1.2.5.2	Les tumeurs papillaires urothéliales à faible potentiel de malignité	61
4.1.2.5.3	Les carcinomes papillaires de bas grade	61
4.1.2.5.4	Les tumeurs plates de bas grade.....	61
4.1.2.5.5	Harmonisation.....	62
4.1.2.6	Les autres tumeurs malignes/métastatiques/lésions diverses	62
4.1.2.7	En conclusion.....	63
4.2	La cystoscopie.....	63
4.3	Les biomarqueurs urinaires.....	64
4.3.1	La détection de l'antigène BTA par les tests BTA-TRAK™ et BTA-STAT™.....	64
4.3.2	La détection de la protéine NMP22 par les tests Alere NMP22® et NMP22 BladderChek®	65
4.3.3	L'immunocytofluorescence : Immunocyt™/uCyt+™	65

Table des matières

4.3.4	Le test d'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence : Urovysion™	66
4.3.5	Le test Xpert Bladder Cancer Monitor.....	66
4.3.6	Le test CxBladder Monitor.....	67
4.3.7	Tests urinaires non invasifs pour le diagnostic ou la détection des récives du cancer de la vessie	69
4.4	Recommandations.....	92
4.5	Méthode exploitée par VitaDX.....	93
4.5.1	Visiocyto®	94
4.5.1.1	L'analyse cytologique en lumière transmise	95
4.5.1.2	L'analyse cytologique en lumière émise	96
4.5.1.3	En conclusion.....	97
Objectifs	98
Résultats	99
1	Matériels et méthodes des résultats absents de l'article	100
1.1	Culture cellulaire	100
1.2	Marquage immunofluorescent	100
1.3	Westernblot,.....	100
1.4	Cytométrie en flux.....	101
1.5	Différenciation.....	101
1.6	isolation de la membrane plasmique	101
1.7	Expérience avec les urines	101
2	Différenciation des cellules urothéliales basales en cellules urothéliales superficielles...	102
3	Article.....	104
3.1	Résumé.....	104
3.2	Résumé des résultats	104
3.2.1	Rôle du noyau cellulaire et du cytoplasme dans le phénomène de FPM	104
3.2.2	FPM exprimée sur différentes lignées cellulaires	105
3.2.3	Cellules urothéliales recueillies dans l'urine contre les cellules urothéliales recueillies dans l'urothélium	107
3.2.4	Rôle de l'intégrité de la membrane plasmique sur la FPM	107
3.2.5	Influence des stress cellulaires sur le FPM.....	108
3.2.6	Influence de la mort cellulaire dans la modulation de la FPM.....	109
3.2.7	Conclusion	110
3.3	Article	111
3.4	Supplementals.....	132
3.4.1	Supplementals legends.....	132
3.4.2	Supplementals Figures	134
4	isolation et coloration de la membrane plasmique.....	142
5	Impacte de l'urine sur la FPM	142
Discussion et perspectives	144
Bibliographie.....		151

Table des figures

Figure 1 : Nombre de cas, de décès en 2018 et évolution du taux d'incidence entre 2010 et 2018.	12
Figure 2 : Nombre de nouveaux cas de cancers attribuables aux facteurs liés au mode de vie et à l'environnement chez les adultes.	13
Figure 3 : Exemples du processus tumoral de certains cancers en fonction du temps.	16
Figure 4 : Régulation du cycle cellulaire par les gènes suppresseurs de tumeurs.	18
Figure 5 : Schéma basique du développement progressif du cancer.	19
Figure 6 : Représentation schématique des principales voies moléculaires menant à l'apoptose.	21
Figure 7 : schéma illustrant la régulation de la voie autophagique sous diverses conditions de stress dans les cellules cancéreuses.	22
Figure 8 : Mécanisme moléculaire de l'apoptose et de la nécroptose.	24
Figure 9 : raccourcissement progressif des télomères au cours de la division cellulaire.	25
Figure 10 : Caractéristiques de la sénescence cellulaire.	25
Figure 11 : dérégulation angiogénique.	28
Figure 12 : Transition épithélio-mésenchymateuse.	29
Figure 13 : Extravasation de l'endothélium vasculaire par les cellules cancéreuses.	33
Figure 14 : Anatomie de la vessie chez la femme.	35
Figure 15 : Anatomie de la vessie chez l'homme.	35
Figure 16 : Vue postérieure de la vessie et de la prostate.	36
Figure 17 : Anatomie de la paroi et de la muqueuse de la vessie.	37
Figure 18 : : Nombre de nouveau de cas de cancer et de décès causés par le cancer sexe et âge confondu en 2020 dans le monde.	39
Figure 19 : Taux d'incidence standardisés sur l'âge du cancer de la vessie dans le monde et selon le sexe.	39
Figure 20 : Évolution et classification du cancer de la vessie.	43
Figure 21 : prise en charge des TVNIM.	44
Figure 22 : Cathétérisme urétral chez l'homme et la femme.	48
Figure 23 : Ponction vésicale sus-pubienne chez l'homme et la femme.	48
Figure 24 : Exemple des tests et des résultats colorés retrouvés sur les bandelettes multi-usages urinaires.	49
Figure 25 : Exemple de cellules urothéliales superficielles négatives.	56
Figure 26 : Exemple de cellules urothéliales atypiques avec des rapports N/C élevés, et des noyaux hyperchromies nucléaires chez une patiente de 36 ans.	57
Figure 27 : Exemples de cellules classées suspicion de carcinome urothélial de haut grade.	59

Figure 28 : Exemples de cellules positives au carcinome urothélial de haut grade.	60
Figure 29 : Exemple de cellules négatives pour le CUHG avec un commentaire suggérant un CUBG.	61
Figure 30 : Calendrier de traitement endovésicales et de suivi des TVNIM en fonction français bizarre de risque.	92
Figure 31 : Image d'une cytologie urinaire acquise en lumière blanche et en lumière émise (488 nm).	93
Figure 32 : Schéma récapitulatif du traitement automatisé de l'échantillon jusqu'à sa numérisation dans le cadre du Protocol VisioCyt®.	94
Figure 33 : Algorithme employé pour l'IA pour identifier le type d'objet et attribuer le score de chaque cellule analysée.	95
Figure 34 : Algorithme employé pour l'IA pour déterminer la présence d'une FPM ou non.	96
Figure 35 : Schéma hypothétique de la différenciation des cellules urothéliales basales en cellules urothéliales superficielles.	102
Figure 36 : détermination des différents marqueurs de différenciation des cellules de l'urothélium.	103
Figure 37 : Coloration des membranes plasmiques isolées de T24 et de cellules urothéliales originaire d'une vessie de cochon.	142
Figure 38 : Quantification de la FPM après traitement des T24 avec des urines humaines.	143

Liste des abréviations

- **38-MAPK** : P38 Mitogen-Activated Protein Kinases
- **ABL1** : ABL Proto-Oncogene 1
- **ADN** : Acide DésoxyriboNucléique
- **ADNtc** : ADN Tumoral Circulant
- **AMPK** : AMP-activated Protein kinase
- **ANXA10** : AnneXin A10
- **AP-HP** : Assistance Publique — Hôpitaux de Paris
- **APLN** : APeLiNe
- **ARID1A** : AT-Rich Interaction Domain 1A
- **ARNm** : Acide RiboNucléique messenger
- **ATG** : autophagy-related
- **ATM** : Ataxia Telangiectasia Mutated
- **BAX** : protéine Bcl-2 — associated X
- **Bcl-2** : B-cell lymphoma 2
- **BTA** : Bladder tumor antigen
- **CAM** : cell adhesion molecule
- **CDK** : cyclin dependent kinase
- **CDKN2A** : cyclin dependent kinase inhibitor 2A
- **CEA** : Antigène carcinoembryonnaire
- **CIRC** : Centre International de Recherche contre le Cancer
- **CK** : cytokératine
- **CMLV** : cellules musculaires lisses vasculaires
- **CMR** : chimiques cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques
- **CNU** : carcinome non urothélial
- **CP** : cellules en parapluie
- **CPBG** : carcinomes papillaires de bas grade
- **CRH** : corticotropin-releasing hormone
- **CSF1R** : colony stimulating factor 1 receptor
- **CTC** : Cellules Tumorales Circulantes
- **CTCol** : Cellules du tube collecteur
- **CTCP** : cellules du tubule contourné proximal
- **CU** : carcinome urothéliale
- **CUA** : cellules urothéliales atypiques
- **CUBG** : carcinome urothéliale de bas grade
- **CUHG** : Carcinomes urothéliale de haut grade
- **CUR** : cellules urothéliales
- **CURT** : cellules urothéliales tumorales
- **CURU** : cellules urothéliales recueillies dans les Urines
- **CURUT** : cellules urothéliales recueillies dans l'UroThélium
- **CV** : cancer de la vessie
- **CXCR2** : C-X-C Motif Chemokine Receptor 2
- **DAMP** : Damage-associated molecular pattern
- **DDR** : DNA Damage Response
- **Diablo** : Diablo IAP-Binding Mitochondrial Protein
- **DLL4** : Delta like-4
- **EA 50** : Éosine-Azure 50
- **ECBU** : examen cyto bactériologique des urines
- **ERBB2** : Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
- **FDA** : Food and Drug Administration
- **FGF-2** : fibroblast growth factor 2
- **FGFR3** : fibroblast growth factor receptor 3
- **FISH** : fluorescence in situ hybridization
- **FITC** : Fluorescein isothiocyanate
- **FPM** : fluorescence périmembranaire
- **GPI** : Glycosylphosphatidylinositol
- **GPI** : lycosylphosphatidylinositols
- **hCFHrp** : human complement factor H-related protein
- **HIF** : Hypoxia Inducible Factors
- **HOXA13** : Homeobox A13
- **HSPG** : Heparan Sulphate Protoglycans
- **hTERT** : Telomerase reverse transcriptase
- **HtrA2** : HtrA Serine Peptidase 2
- **I/N** : irradiée/non traitée
- **I/T** : irradiée/traitée
- **IA** : intelligence artificielle
- **IAPX** : X-linked inhibitor of apoptosis protein
- **IGF2** : insulin-like growth factor II
- **IGFBP5** : Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5
- **IgSF CAMs** : Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecules
- **IL** : InterLeukin
- **INCa** : Institut National du Cancer
- **IU** : infections urinaires
- **KDM6A** : lysine demethylase 6A

Liste des abréviations

- **K-RasV12** : mutant K-ras(V12)
- **LBG** : lésion de bas grade
- **LE** : leucocyte estérase
- **MAUB** : Mucin Antigen Associated with Bladder Cancer
- **MDK** : Midkine
- **MDM2** : murine double minute 2
- **MEC** : matrice extracellulaire
- **MLKL** : mixed lineage kinase domain like pseudo-kinase
- **MP22** : Nuclear Matrix Protein Number 22
- **mTOR** : mammalian target of rapamycin
- **N/C** : noyau/cytoplasme
- **N/N** : non irradiées/non traitées
- **NCS** : NéoCarzinoStatine
- **NK** : Natural Killer
- **OG 6** : orange green 6
- **Omi** : HtrA serine peptidase 2
- **OMS** : Organisation mondiale de la santé
- **P.T24** : T24 perméabilisées au Triton 0,2 %
- **P53** : Tumor Protein P53
- **PC** : PhosphatidylCholine
- **PDGF** : Platelet Derived Growth Factor
- **PIK3CA** : PhosphatidyInositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
- **POC** : point of care
- **PTP** : Permeability transition pore
- **PUMA** : p53 upregulated modulator of apoptosis
- **PVC** : PolyVinyl Chloride
- **RAF** : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
- **RAS** : at sarcoma virus
- **RB1** : retinoblastoma protein
- **RF** : ratio de fluorescence
- **RIPK** : receptor interacting protein kinase
- **RM** : récepteurs de mort
- **ROCK** : Rho-associated protein kinase
- **ROS** : espèces réactives à l'oxygène
- **RTK** : Receptor tyrosine kinase
- **RT-PCR** : reverse transcription-polymerase chain reaction
- **S1P** : sphingosine 1-phosphate
- **S1P2R** : Sphingosine-1-phosphate receptor-2
- **SASP** : Senescence-associated secretory phenotype
- **SMS** : Spermine synthase
- **STAG2** : Stromal Antigen 2
- **TCC** : carcinomes à cellules transitionnelles
- **TEM** : transition épithélio-mésenchymateuse
- **TF** : Thomsen-Friedenreich
- **TGF-β** : transforming growth factor
- **TME** : transition mésenchymateuse-épithéliale
- **TNF** : Tumor Necrosis Factor
- **TVIM** : tumeurs infiltrant le muscle vésical
- **TVNIM** : tumeurs de la vessie n'infiltrant pas le muscle vésical/muscularis propria
- **UFC** : Unités Formant Colonie
- **UPIIIa** : UroPlakine IIIa
- **UPK1B** : Uroplakin 1B
- **UPR** : Unfolded Protein Response
- **UV** : Ultra Violet
- **VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor
- **VEGFR1** : Vascular endothelial growth factor receptor 1

Introduction

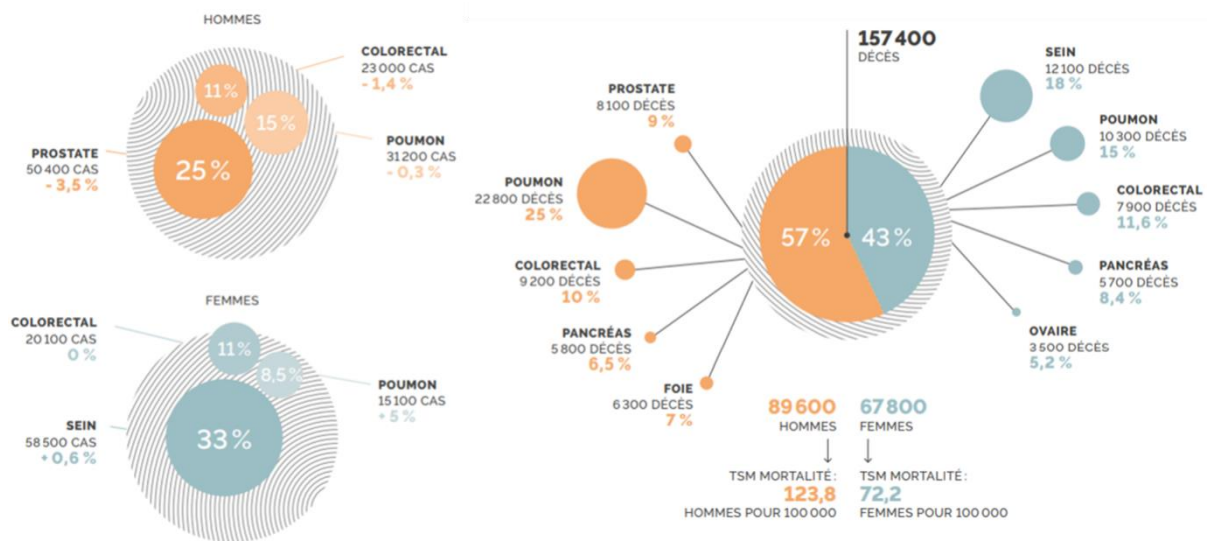
1 Le cancer

Le terme cancer, selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), regroupe « un grand groupe de maladies pouvant toucher n'importe quelle partie de l'organisme » caractérisé par « la multiplication rapide de cellules anormales à la croissance inhabituelle, qui peuvent ensuite envahir des parties voisines de l'organisme puis migrer vers d'autres organes. » Cette dernière étape, appelée métastase, constitue la principale cause du décès par cancer. Le cancer peut également être désigné par les termes « néoplasme », « carcinome » ou « tumeur maligne »¹.

1.1 Épidémiologie

Selon les estimations de l'OMS, en 2019, le cancer serait la première ou la deuxième cause de décès avant l'âge de 70 ans dans un très grand nombre de pays, notamment en raison de la réduction du taux de mortalité d'autres maladies — maladies coronariennes ou accidents vasculaires cérébraux — grâce au progrès médical². Le grand nombre de décès par cancer permettrait d'expliquer l'arrêt de l'augmentation de l'espérance de vie dans le monde.

En 2019, l'Institut National du Cancer (INCa) a estimé à environ 380 000 le nombre de nouveaux cas de cancer en France métropolitaine ($\pm 200\ 000$ chez l'homme et $\pm 180\ 000$ chez la femme) provoquant près de 160 000 décès (90 000, chez l'homme et 70 000, chez la femme). Chez l'homme, le cancer le plus fréquent est celui de la prostate, suivi du cancer du poumon et du cancer colorectal. Chez la



Introduction

femme, la première place est occupée par le cancer du sein, puis le cancer colorectal et le cancer du poumon³ (**Figure 1**).

En l'état actuel, l'incidence et la mortalité du cancer sont en hausse partout dans le monde. Cette augmentation est principalement due au vieillissement de la population, mais aussi à l'augmentation de la démographie. En France par exemple, la population a augmenté de 20 % pour les hommes et 23 % pour les femmes, et le vieillissement de 39 % pour les premiers et de 23 % pour les secondes. Parallèlement, le nombre de cas de cancers a augmenté de 65 % chez l'homme et de 26 % chez la femme³, avec une hausse de la mortalité de 6 % pour les premiers et de 26 % chez les secondes. Le vieillissement et l'augmentation de la population sont deux facteurs normaux d'évolution du cancer qui ne peuvent être éludés, contrairement à certaines habitudes liées au mode de vie ou aux facteurs environnementaux associés au développement socioéconomique.

1.2 Facteurs de risque

1.2.1 Modifiables

En juin 2018, un rapport publié par le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC), associé à plusieurs établissements de recherche, a mis en évidence l'impact du mode de vie et d'environnement sur l'apparition de cancers. Une modification de ces éléments permettrait d'éviter une partie des cancers. En effet, les facteurs de risque liés au mode de vie (consommation de tabac, de boissons alcoolisées, alimentation, inactivité physique, etc.) ou à l'environnement (expositions professionnelles, rayonnement ultra-violet, substances chimiques, etc.) sont modifiables (**Figure 2**).

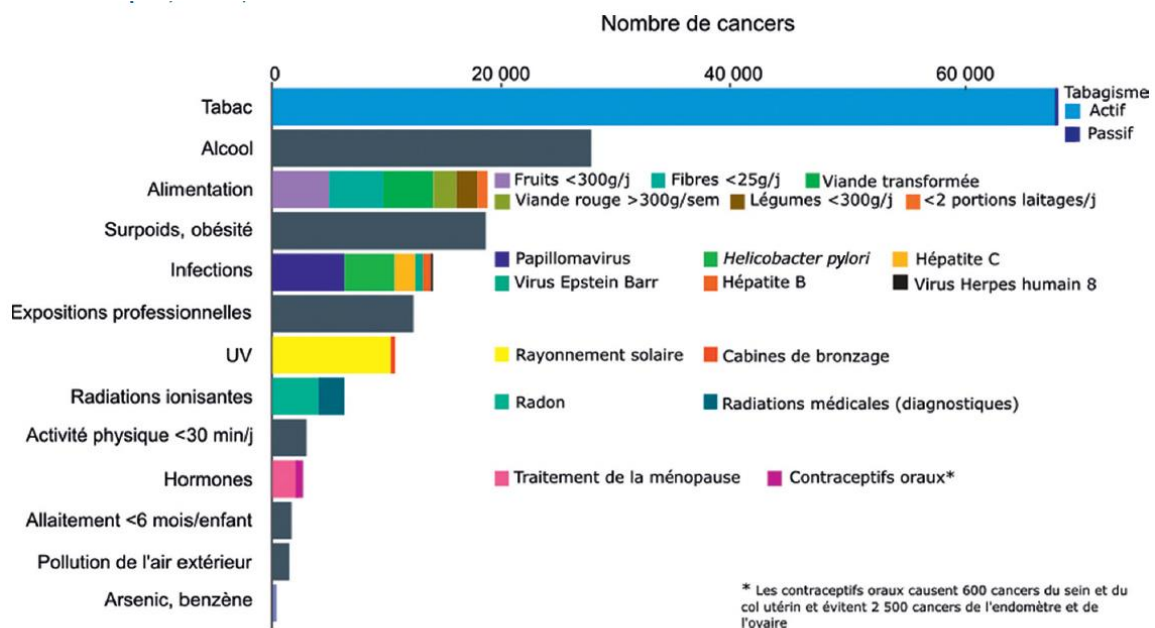


Figure 2 : Nombre de nouveaux cas de cancers attribuables aux facteurs liés au mode de vie et à l'environnement chez les adultes. Adapté de Marant Micallef et al. ⁴

Introduction

Le CIRC a montré qu'en 2015, 41 % des cancers diagnostiqués auraient pu être évités en changeant nos habitudes de vie ou en agissant sur les conditions professionnelles. Hommes et femmes confondus, le tabagisme est la première cause de cancers évitables avec 20 % des cas, puis vient la consommation d'alcool (8 %), et l'alimentation en lien avec le surpoids et l'obésité (5,4 %) ⁴ (**Figure 2**).

En outre, certains cancers ne peuvent se développer qu'en présence d'un agent infectieux. Ces agents infectieux sont considérés comme des facteurs de risque modifiables. Par exemple, le cancer du col de l'utérus est obligatoirement lié à l'exposition au papillomavirus humain, le sarcome de Kaposi, à celle à l'herpès virus, et les carcinomes hépatocellulaires, au virus de l'hépatite B. Ces facteurs de risque infectieux représentent 4 % de l'incidence des cancers en France.

La seconde partie des facteurs de risque modifiables est constituée par l'environnement. En France, par exemple, les expositions professionnelles représentent 3,6 % de l'incidence des cancers. L'industrie chimique (dont la pharmacie) est le principal secteur concerné, en raison de l'importante production et de l'utilisation d'agents chimiques cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques (CMR) ⁵. Ces derniers sont divisés en 3 grandes familles : les composés aromatiques comme le benzène utilisé comme solvant ou réactif de synthèse, les composés aliphatiques comme le formaldéhyde retrouvé dans de nombreux produits de construction et de consommation d'usage courant et les halogènes chlorés comme le chlorure de vinyle retrouvé dans la synthèse du PVC.

Malheureusement, l'impact des expositions à des produits CMR reste difficile à évaluer, car différents types d'agents interviennent, souvent de manière répétée. L'exposition à un agent chimique pourra provoquer ou non un cancer en fonction de l'individu et de sa capacité à éliminer cet agent.

1.2.2 Non modifiables

L'âge est le meilleur exemple des facteurs de risque non modifiables. Les risques de développer un cancer augmentent avec l'âge. En effet, le cancer est une pathologie multigénique qui apparaît à la suite de nombreuses mutations se succédant sur plusieurs dizaines d'années. Plus nous vieillissons, plus les altérations s'accumulent dans le génome de nos cellules et plus le risque de développer une tumeur augmente. Ainsi, l'âge médian des diagnostics est de 68 ans pour l'homme et 67 ans chez la femme, et celui des décès de 73 ans chez l'homme et de 77 ans chez la femme⁶.

En outre, la prise d'hormones chez la femme ou la production hormonale naturelle, caractéristique de la puberté, de la ménopause et liée au nombre de grossesses, constituent des facteurs déclenchants. Par exemple, le Diéthylstilbestrol, un œstrogène de synthèse utilisé pour prévenir les fausses-couches entre les années 1950 et 1980, a provoqué des cancers gynécologiques chez les filles dont les mères avaient reçu ce traitement⁷.

Introduction

Parmi les facteurs de risque non modifiables, les facteurs héréditaires sont responsables de 5 à 10 % des cancers. Par exemple, 5 à 10 % des cancers de l'ovaire et du sein et 3 % des cancers du côlon seraient liés à une prédisposition génétique héréditaire⁸. Certains cancers présentent presque systématiquement un facteur héréditaire, tels que les rétinoblastomes ou certaines tumeurs du rein (tumeur de Wilms). Les altérations ou supplétions génétiques et chromosomiques, acquises au cours de la vie ou héréditaires, sont responsables de cancers. Par exemple, chez les enfants atteints du syndrome de Down, la présence de trois exemplaires du chromosome 21 augmente le risque de développer une leucémie aiguë de 50 fois par rapport aux enfants, de même âge, pris dans la population générale⁹. L'altération de certains gènes suppresseurs de tumeurs induit généralement l'apparition de tumeurs, le plus connu étant P53 et est présente chez les familles atteintes du syndrome de Li-Fraumeni.

Les maladies inflammatoires ou auto-immunes sont associées à une augmentation du risque de cancers ou de lymphomes. En effet, une maladie inflammatoire, en particulier dans des cas chroniques, s'accompagne de la libération, de façon répétée et continue, de médiateurs pro-inflammatoires. Plusieurs de ces médiateurs (TNF, IL-1 α , l'IL-1 β ...) jouent un rôle essentiel dans la suppression de l'apoptose, la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion et la métastase¹⁰. Dans le cas des maladies auto-immunes, l'augmentation du risque de lymphomes est bien établie. L'association entre un dysfonctionnement du système immunitaire et l'apparition de cancers est connue depuis les premières descriptions de lymphomes chez les transplantés d'organes, il y a une quarantaine d'années. Depuis, une augmentation de l'incidence de lymphomes chez les patients atteints de maladies auto-immunes a été mise en évidence¹¹.

Enfin, un dernier risque non modifiable est la prise de traitements, tels que la radiothérapie, la chimiothérapie ou l'administration d'immunosuppresseurs. Si la radiothérapie et la chimiothérapie sont des traitements incontournables et dont la balance bénéfice-risque est avantageuse, ils sont particulièrement agressifs. Le risque de cancer secondaire est lié à la dose totale reçue et peut être augmenté si ces traitements sont combinés. La radiothérapie augmente le risque de développer une leucémie secondaire ou une tumeur solide. La chimiothérapie (agents alkylants, anthracyclines, inhibiteurs de la topoisomérase II...) augmente également le risque de développer une leucémie secondaire¹².

1.3 La cancérogenèse

Le cancer est le résultat d'un long processus divisé en plusieurs étapes : une cellule, dont les fonctions et la forme sont normales, dérive progressivement vers une cellule tumorale. Ce processus est alimenté par l'acquisition lente de nouvelles mutations. Au fur et à mesure des divisions cellulaires, de nouvelles mutations vont être acquises de façon aléatoire, générant ainsi une sous-population présentant de nouvelles modifications. À force de se diviser, les cellules tumorales vont accumuler différentes mutations, donnant à la tumeur une grande hétérogénéité génomique. Ce processus tumoral, appelé cancérogenèse, se déroule généralement sur plusieurs années chez l'adulte (**Figure 3**).

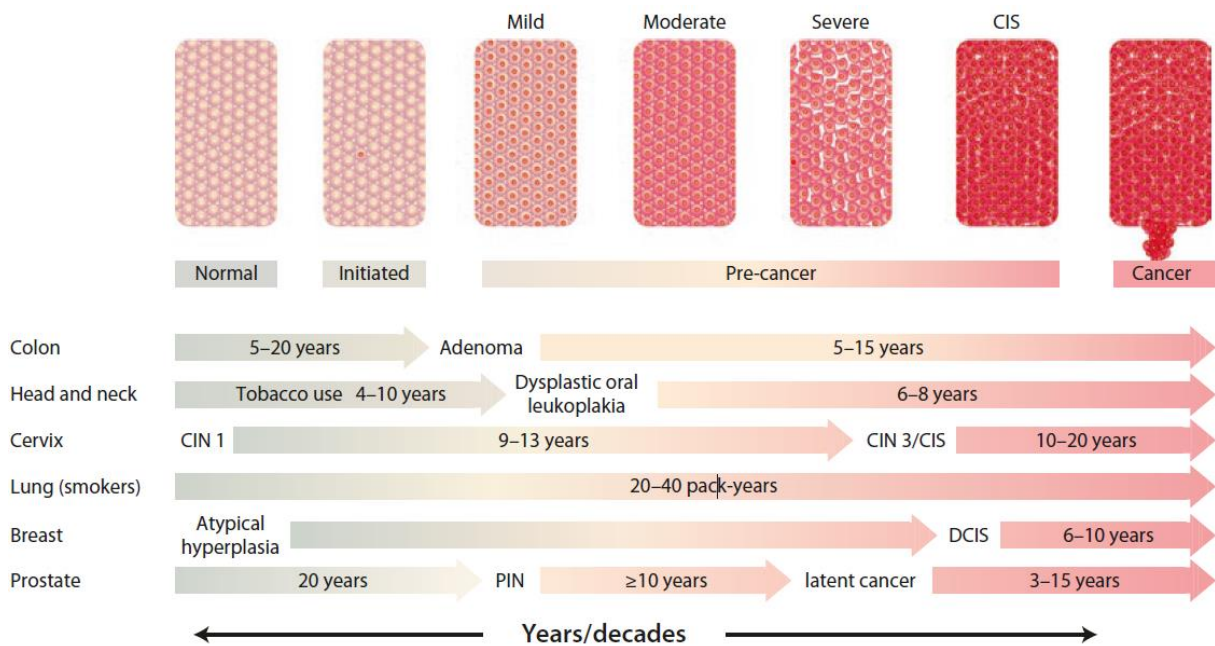


Figure 3 : Exemples du processus tumoral de certains cancers en fonction du temps. Adapté de Compton et al. ¹³

Les mutations déclenchant ce processus sont généralement retrouvées sur des gènes qui contrôlent la division cellulaire. Les gènes impactés par ces mutations sont divisés en deux classes : les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs.

Les proto-oncogènes (ou oncogènes) régulent positivement le cycle cellulaire. Leur hyperactivité favorise la prolifération cellulaire.

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont eux-mêmes divisés en deux sous-classes : les « *gatekeeper* » et les « *caretaker* ». Les « *gatekeeper* » sont des régulateurs négatifs du cycle cellulaire et la mort cellulaire, ils veillent à ce que l'équilibre entre la division cellulaire et la mort cellulaire soit maintenu. Leur inactivation à l'état homozygote entraîne une dérégulation de la croissance et de la différenciation. Les « *caretaker* » sont impliqués dans le maintien de la structure normale de l'ADN et leur inactivation induit une instabilité dans le génome (modifications de la séquence nucléotidique de l'ADN et instabilité chromosomique résultant d'un réarrangement inapproprié des chromosomes).

Introduction

Ces mutations peuvent apparaître de manière indépendante ou en se combinant. L'apparition des premières mutations est appelée l'initiation.

1.3.1 Les étapes de la cancérogenèse

1.3.1.1 L'initiation

Lors de la phase d'initiation, une cellule normale de l'organisme va acquérir une modification génétique initialement absente durant la division cellulaire. Il s'agit d'une mutation « somatique ». Ce type de mutation peut parfois être héritée d'un (ou des) parent(s) et se retrouve alors présente dans l'organisme dès la naissance. Il s'agit d'une mutation « germinale ».

La cellule ainsi mutée, appelée cellule mère, se divise en cellules filles. La cellule mère transmet la mutation aux cellules filles. Si la mutation touche un proto-oncogène, la cellule fille acquiert un avantage sur le plan de la prolifération par rapport aux cellules normales équivalentes. Si la mutation a lieu sur un gène suppresseur de tumeur, la cellule va perdre sa capacité de maintien de son état génétique normal. À l'inverse des proto-oncogènes, la mutation d'un gène suppresseur de tumeur ne permet pas l'acquisition d'un avantage prolifératif, mais un avantage de survie de la cellule initiée¹³.

Selon la position de la mutation sur le proto-oncogène, le style prolifératif de la cellule mutée est différent¹⁴. Il peut y avoir :

- Une régulation activatrice autocrine de la production de facteurs de croissance
- Une surexpression importante de récepteurs de facteurs de croissance à la surface de la cellule.
- Une mutation de récepteurs de facteurs de croissance, provoquant leur activation constitutive et indépendante de son agoniste.
- Une mutation induisant une production constitutive de protéines impliquées dans la régulation positive de la prolifération.
- Une augmentation dans la production de cytokines, molécules qui stimulent la production de facteurs de croissance des cellules normales environnantes de manière paracrine.

Chacun de ces mécanismes, seuls ou en combinaison, a pour effet de stimuler intensément la division cellulaire et de façon continue.

Dans le cas des gènes suppresseurs de tumeurs, les modifications épigénétiques jouent un rôle important dans leur inactivation. La majeure partie de l'inactivation aurait pour origine l'hyperméthylation de la région promotrice du gène induisant une inactivation de la transcription du gène normal¹⁵. Cette hyperméthylation peut avoir lieu sur un unique allèle, réduisant l'expression de la protéine, ou

Introduction

directement sur les deux allèles, induisant une perte totale d'expression. L'hyperméthylation est considérée comme un mécanisme très courant par lequel la fonction des gènes suppresseurs de tumeurs est perdue. D'autres modifications épigénétiques, comme la désacétylation des histones ou les protéines de liaison à l'ADN peuvent empêcher l'ADN polymérase de transcrire efficacement les séquences souhaitées, comme celles qui contiennent des gènes suppresseurs de tumeurs¹⁶.

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont subdivisés en fonction de leur rôle principal dans la cellule, en deux catégories, les « *gatekeepers* » et les « *caretakers* »¹⁴.

Les gènes « *gatekeeper* » impliqués dans « régulation de la croissance » codent pour des protéines qui contrôlent la progression des cellules dans le cycle cellulaire à des points définis du cycle ou la mort

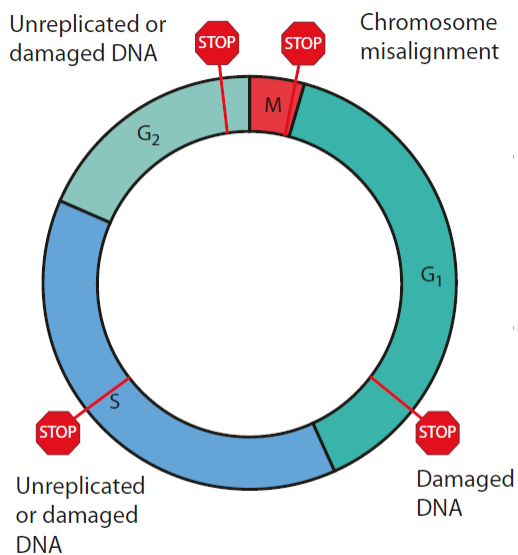


Figure 4 : Régulation du cycle cellulaire par les gènes suppresseurs de tumeurs. Adapté de Cooper et al. ¹⁷

cellulaire (**Figure 4**)¹⁷. Ces protéines peuvent arrêter la poursuite de la progression du cycle lorsqu'elles détectent de l'ADN endommagé afin de le réparer. Différents mécanismes de réparations vont entrer en jeu tels que la réparation par excision des nucléotides, la réparation par excision des bases, les voies de recombinaison par jonction des extrémités non homologues, les voies de réparation des mésappariements et le métabolisme des télomères. Les cellules présentant des mutations ou des dommages de l'ADN qui n'ont pas réussi à être réparés vont alors entrer en apoptose. Toutes les mutations inactivant des gènes codants pour des protéines impliquées dans le mécanisme d'inhibition de la prolifération indui-

sent une perte du contrôle par rétroaction négative et facilitent une signalisation continue de la prolifération.

Les gènes « *caretaker* » intervenant dans le « maintien de l'intégrité » codent pour des protéines qui empêchent la transmission de mutations à une nouvelle génération de cellules. Ces protéines réalisent toutes les activités liées à la détection et à la réparation des mutations acquises. Lorsque les lésions de l'ADN et/ou les mutations qui en résultent ne peuvent pas être réparées, la cellule entre en mort cellulaire.

L'exemple le plus emblématique de gènes « *caretaker* » est le gène TP53. Il est responsable de l'expression de nombreux facteurs de transcription impliqués dans le phénomène « réparer ou mourir ». Il joue également un rôle important dans la sénescence cellulaire causée par le raccourcissement des

Introduction

télomères. La protéine P53, codée par ce gène, est la protéine suppresseur de tumeur la plus importante et la plus connue. Elle contrôle d'autres protéines « *caretaker* », comme celles qui inhibent la survie et la division des cellules anormales par une combinaison d'actions qui arrêtent le cycle cellulaire et induisent l'apoptose de la cellule endommagée. La perte de P53 induit ainsi une perte du contrôle de la croissance et de l'induction de l'apoptose, permettant la progression tumorale. TP53 est le gène le plus fréquemment muté dans le cancer.

1.3.1.2 La promotion

Une fois modifiée, la cellule présente une capacité de prolifération indéfinie en se divisant plus rapidement ou en survivant tout en se divisant « normalement ». Cette étape est appelée la « promotion » (**Figure 5**). Durant cette étape, la cellule mutée se divise et donne naissance à un clone d'elle-même, appelé « cellule fille », qui contient la mutation initiale. Cette étape n'implique pas l'acquisition de nouvelles mutations¹³.

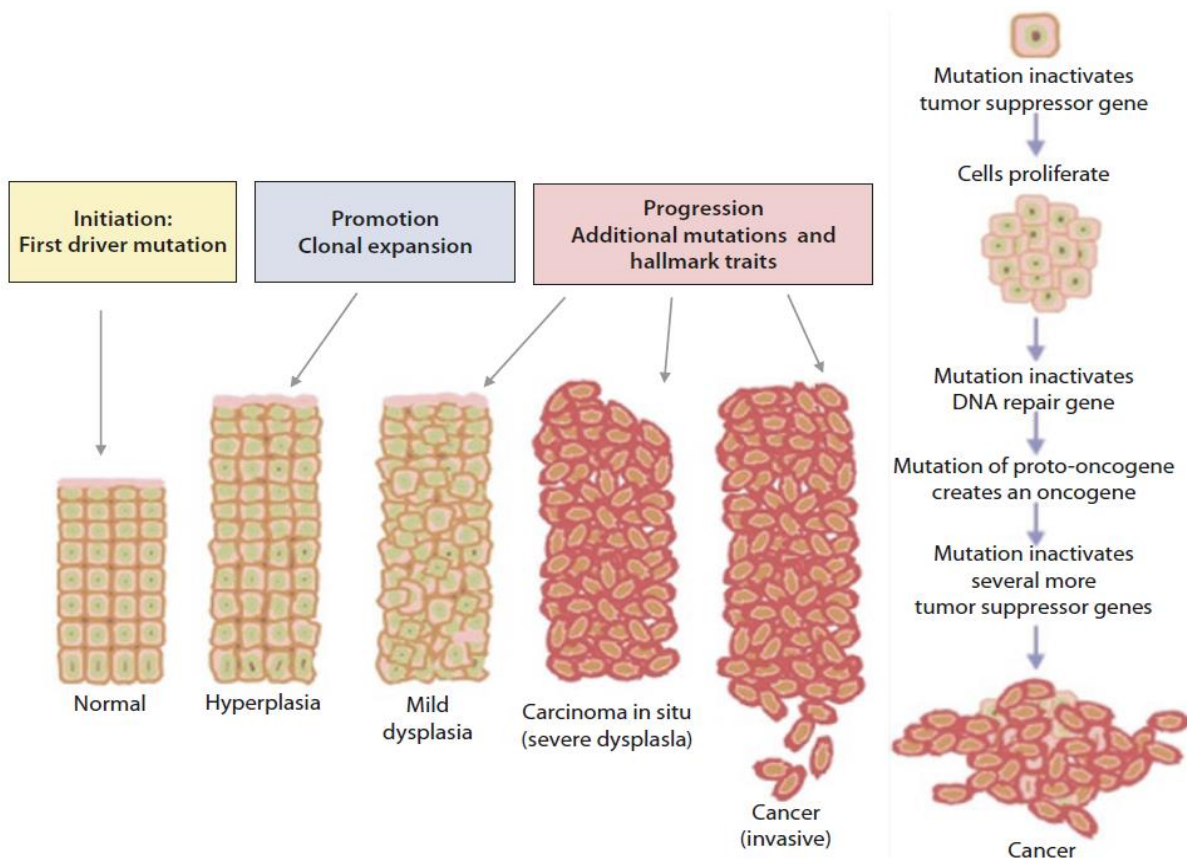


Figure 5 : Schéma basique du développement progressif du cancer. Adapté de Compton et al. ¹⁴

1.3.1.3 La progression

Au fur et à mesure que la cellule mutée se divise en cellules filles, une ou plusieurs mutations aléatoires peuvent apparaître. Ces nouvelles mutations sont également transmises aux descendantes des cellules filles qui se divisent, formant ainsi une sous-famille. Cette étape est appelée « la progression » ¹³.

Introduction

Ces mutations entraînent l'apparition d'un cancer malin, présentant une diversité cellulaire importante et en constante évolution tout au long du développement du cancer. La progression du cancer est plutôt lente, s'étalant sur de nombreuses années, entraînant la création de générations de sous-familles très hétérogènes (**Figure 3**). Au cours de cette progression, parce qu'elles présentent des mutations plus avantageuses en matière de croissance et de survie, les sous-familles cellulaires cancéreuses les plus robustes sont sélectionnées et se développent plus facilement. La présence de multiples sous-types de cellules cancéreuses fait de la tumeur une véritable mosaïque cellulaire. Cependant, la question du caractère aléatoire ou ciblé de l'acquisition de nouvelles mutations au cours de la progression n'a toujours pas été résolue. Pour certains types de cancers, comme les cancers du côlon, l'analyse systématique des phases progressives de la croissance tumorale a montré que les mutations sont souvent acquises suivant une séquence préférée. Cependant, ce type de séquences prédéfinies n'a pas été retrouvé dans tous les cancers.

Les mutations généralement concernées lors de la progression touchent des gènes régulant la mort cellulaire, la signalisation cellulaire, la sénescence cellulaire et la différenciation cellulaire.

1.3.1.3.1 La résistance à la mort cellulaire

1.3.1.3.1.1 L'apoptose

Dans une cellule normale, la mort cellulaire ou apoptose est un processus parfaitement réglé, programmé et contrôlé. Ce processus maintient un équilibre entre le nombre de nouvelles cellules générées par mitose et le nombre de cellules endommagées ou non désirées qui sont éliminées. Ce phénomène auto-induit est régulé par deux voies d'initiation dans les cellules normales, indépendantes l'une de l'autre, mais qui interagissent l'une avec l'autre. Ces deux voies provoquent chacune l'activation d'une cascade de réactions enzymatiques impliquant différentes caspases, responsables de l'apoptose. Une fois la cascade de réactions initiée, le phénomène d'apoptose devient irréversible (**Figure 6**)¹⁸.

1.3.1.3.1.1.1 La voie extrinsèque

Elle est activée par la fixation des facteurs extérieurs, produits et utilisés par les lymphocytes *Natural Killer* (NK) ou les macrophages, sur des récepteurs cellulaires. Ces récepteurs appartiennent à la super-famille de protéines des récepteurs au facteur de nécrose tumorale, appelé communément récepteur de mort (RM). La fixation des facteurs aux RM active une cascade de réactions enzymatiques (les caspases) et entraînant ainsi l'apoptose¹⁹. En plus d'initier l'apoptose, ces récepteurs ont la capacité d'initier d'autres voies de signalisation non liées à l'apoptose, mais impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire, la production de cytokines et, en particulier, les réponses inflammatoires favorisant la cancérogenèse.

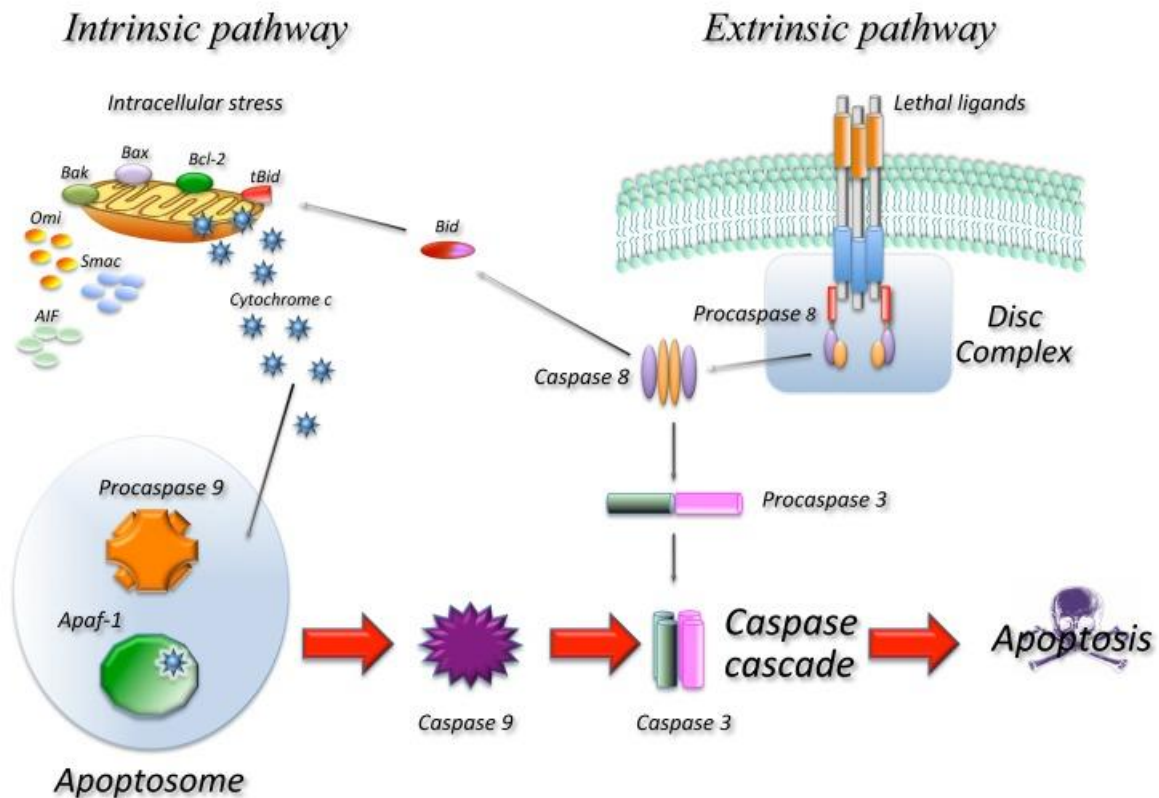


Figure 6 : Représentation schématique des principales voies moléculaires menant à l'apoptose. Adapté de B. Favaloro et al.¹⁸

1.3.1.3.1.1.2 La voie intrinsèque

Appelée voie mitochondriale de l'apoptose, elle est activée par des facteurs libérés par les mitochondries. Elle est initiée par des voies de régulation positives ou négatives. Son activation induit une libération par la mitochondrie d'une variété de *stimuli* agissant sur de multiples cibles au sein de la cellule. Les voies de régulation négatives sont induites par l'absence de cytokines, d'hormones et de facteurs de croissance dans l'environnement de la cellule. L'absence de ces signaux provoque l'expression de protéines proapoptotiques normalement inhibées (PUMA, NOXA et BAX par exemple). Les voies d'activations positives de l'apoptose sont régies par l'exposition à l'hypoxie, aux toxines, aux rayonnements, aux espèces réactives de l'oxygène, aux virus et à divers agents toxiques²⁰.

1.3.1.3.1.1.3 Dérégulation de l'apoptose

Quelle que soit la voie d'activation de l'apoptose, sa régulation est essentielle. Une régulation altérée, comme dans le cas du cancer, a un effet désastreux sur l'équilibre cellulaire.

L'altération la plus courante est la mutation du gène TP53, évoquée plus haut. Cette mutation fait perdre à ce gène sa fonction de détection des dommages de l'ADN, l'empêchant d'induire l'apoptose par la voie intrinsèque. L'expression de molécules régulatrices anti-apoptotiques peut également être augmentée.

Introduction

Les récepteurs de mort peuvent être affectés, soit par une diminution de leur expression, soit par une mutation empêchant leur activation par un ligand.

Enfin, des altérations ou des dérèglements des caspases peuvent entraîner une diminution de l'apoptose.

1.3.1.3.1.2 Autophagie

L'autophagie, également appelée « autocannibalisme cellulaire », est un système de recyclage intracellulaire et un processus d'autodégradation cellulaire qui maintient le métabolisme et l'homéostasie de la cellule. Ce mécanisme sert, entre autres, à dégrader et éliminer les protéines mal repliées et les organites endommagés impliqués dans l'adaptation à la privation de nourriture, la croissance cellulaire, la mort cellulaire et la suppression des tumeurs. Ce mécanisme initie la formation d'autophagosomes qui capturent les composants dégradés et fusionnent ensuite avec les lysosomes pour les recycler. Le processus autophagique est régulé par la protéine mTOR (*mammalian target of rapamycin*) qui, normalement, inhibe l'autophagie en inhibant la protéine ATG (*autophagy-related protein*). Dans des conditions de stress, l'augmentation de la protéine AMPK (*AMP-activated protein kinase*) induit l'inhibition de mTOR et provoque ainsi l'arrêt de l'inhibition de ATG, ce qui aura pour effet l'activation de l'autophagie²¹.

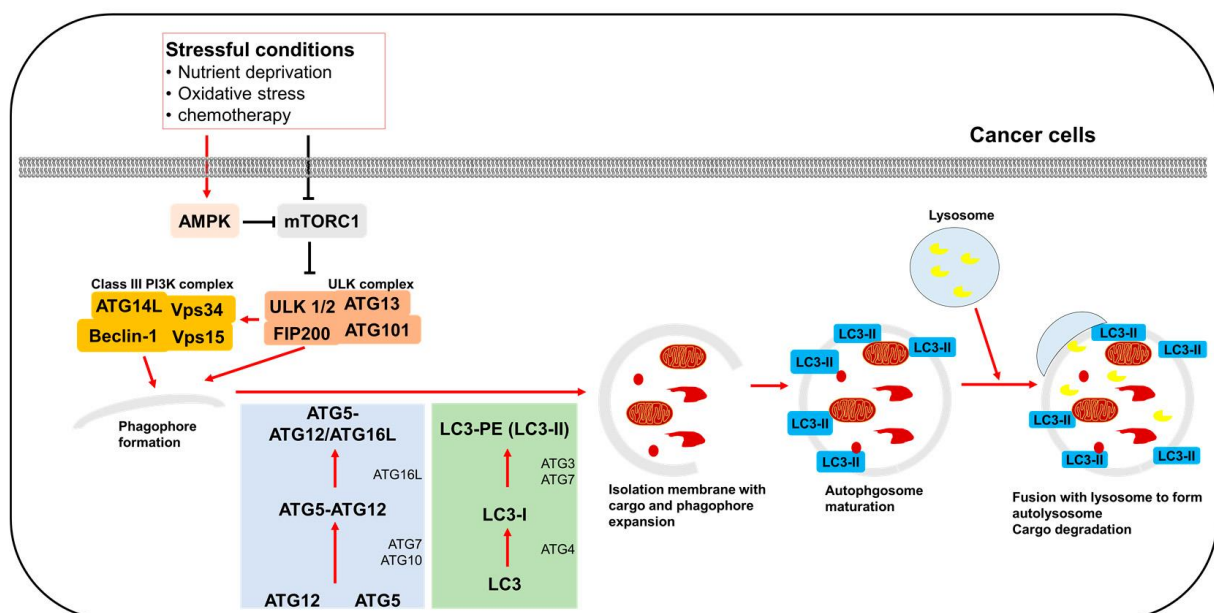


Figure 7 : schéma illustrant la régulation de la voie autophagique sous diverses conditions de stress dans les cellules cancéreuses. Adapté de Yun et al.²¹

1.3.1.3.1.2.1 Dérégulation de l'autophagie

Dans le cas du cancer, l'autophagie joue un double rôle : il contribue au développement et à la prolifération des cellules cancéreuses d'une part, et, d'autre part, agit sur la suppression des tumeurs. Par exemple, des facteurs de suppression des tumeurs peuvent être régulés négativement par mTOR et

Introduction

AMPK, ce qui entraîne l'induction de l'autophagie et la suppression de l'initiation du cancer. Néanmoins, mTOR et AMPK peuvent, au contraire, activer des oncogènes responsables de la suppression de l'autophagie, accélérant ainsi la formation du cancer (**Figure 7**)²¹. Il est alors possible qu'une autophagie réduite ou anormale empêche la dégradation des composants ou des protéines endommagés dans les cellules soumises à un stress oxydatif, ce qui entraîne le développement d'un cancer. Dans d'autres cas, l'autophagie est activée dans la partie centrale des tumeurs solides, où les cellules vivent dans des conditions extrêmes. Cela favorise la survie des cellules tumorales en améliorant la tolérance au stress et en fournissant des nutriments pour répondre aux exigences métaboliques des tumeurs.

1.3.1.3.1.3 Nécroptose

La nécrose a été définie classiquement comme une forme non programmée de mort cellulaire qui se produit en réponse à une agression chimique ou physique majeure. Les forces externes qui peuvent provoquer cette mort cellulaire accidentelle peuvent être une température physique ou une pression extrême, un stress chimique ou un choc osmotique. La rupture de la cellule, caractéristique de la nécrose, s'accompagne d'une fuite du contenu cellulaire dans l'espace extracellulaire. Cela entraîne la libération de biomolécules, appelées motif moléculaire associé aux dégâts (DAMP), qui peuvent être reconnues par les cellules immunitaires et déclencher une réponse immunitaire pro inflammatoire. Longtemps considérée comme une mort cellulaire accidentelle, non contrôlée et déclenchée par des stress non spécifiques et non physiologiques, la nécrose peut cependant présenter, dans certaines conditions, des modifications biochimiques habituellement détectées lors de processus cellulaires programmés. Ce phénomène est appelé nécroptose, car il présente des caractéristiques morphologiques similaires à celui de la nécrose (rupture de la membrane cellulaire, translucidité progressive du cytoplasme et gonflement des organites) et de l'apoptose (*blebbing* de la membrane, rétrécissement cellulaire, fragmentation du noyau et une condensation de la chromatine)²². La nécroptose est indépendante des caspases contrairement à l'apoptose, mais plusieurs des éléments de signalisation en amont de l'apoptose sont partagés²³. L'activation étroitement régulée de ces différentes signalisations entraîne la perméabilisation de la membrane cellulaire (**Figure 8**), contrairement à la nécrose, suivie d'une libération du contenu des cellules et de réponses inflammatoires robustes.

1.3.1.3.1.3.1 Dérégulation de la nécroptose

Comme pour la nécrose, il a été montré que certaines tumeurs exprimaient un niveau plus bas de molécules clés dans les voies de signalisation nécroptotiques, ce qui suggère que les cellules cancéreuses peuvent échapper à la nécroptose pour survivre²². Au contraire, dans certains cas, une augmentation de la nécroptose est capable de déclencher des réponses inflammatoires et favoriserait les métastases cancéreuses et l'immunosuppression²².

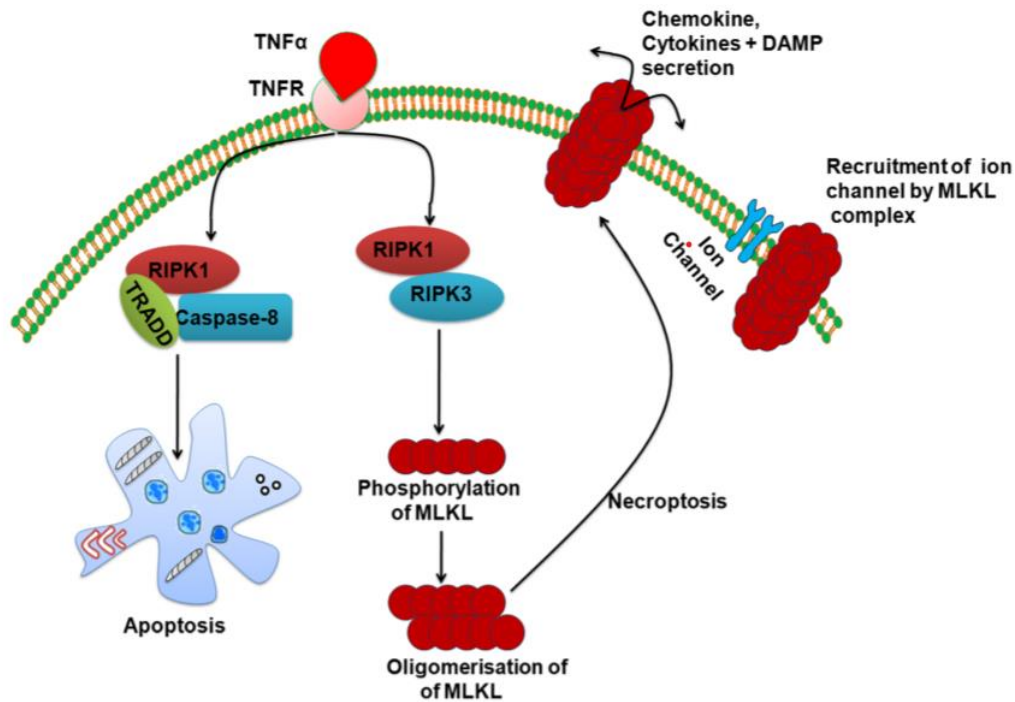


Figure 8 : Mécanisme moléculaire de l'apoptose et de la nécroptose. Le récepteur de mort est le médiateur de l'apoptose extrinsèque et de la nécroptose ; RIPK1 [*receptor interacting protein kinase 1*] joue un rôle clé dans l'apoptose et la nécroptose. L'activation de la caspase-8 conduit la voie vers l'apoptose tandis que son inhibition conduit à la nécroptose. Au cours de la nécroptose, RIPK1 et RIPK3 interagissent l'un avec l'autre, entraînant la formation d'un complexe hétérodimère fonctionnel ; ce complexe favorise l'oligomérisation de MLKL [*mixed lineage kinase domain like pseudokinase*] en le phosphorylant. La forme oligomère de MLKL transloque du cytosol vers la membrane plasmique, entraînant la formation du pore et provoquant une réponse inflammatoire. Malgré la formation du pore, la MLKL exerce également son effet après avoir interagi avec les canaux ioniques. *Adapté de Dhuriya Sharma et al.*²³

1.3.1.3.1.4 La sénescence

La sénescence désigne un changement complexe de l'état cellulaire aboutissant à la perte de la capacité de prolifération. Elle est aussi impliquée dans diverses voies comme la modulation immunitaire, l'inflammation, la régulation et le maintien de la matrice extracellulaire (MEC), et l'angiogenèse²⁴. Ce phénomène, constituant un facteur clé du processus de vieillissement, concerne particulièrement les tissus et les cellules âgées.

Selon l'importance et la durée du *stimulus* extérieur, on distingue deux types de sénescence : la sénescence aiguë ou la sénescence chronique. La sénescence aiguë est déclenchée à court terme pour limiter une réponse inflammatoire ou un processus physiologique (cicatrisation ou développement embryonnaire²⁵). La sénescence chronique, responsable du déclin des fonctions tissulaires lié à l'âge, est déclenchée par une stimulation prolongée dans le temps. Toutefois, certaines stimulations prolongées se sont avérées impliquées de nombreuses maladies comme l'athérosclérose, l'arthrite, les maladies neurodégénératives ou le diabète²⁶.

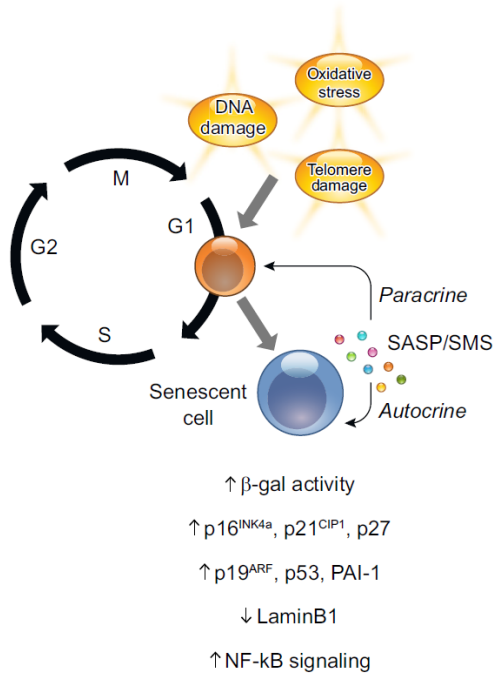


Figure 10 : Caractéristiques de la sénescence cellulaire. Adapté de Calcinotto et al. ²⁶

Il existe plusieurs voies de régulation capables d'activer la sénescence (**Figure 9**)²⁶, la principale étant celle induite par le raccourcissement des télomères. Les télomères sont composés d'ADN non codant caractérisé par la répétition de six paires de bases TTAGGG qui se trouvent aux extrémités de chaque chromosome. Ils ont pour rôle de protéger la détérioration des extrémités des chromosomes ou leur fusion avec des chromosomes adjacents²⁶. Lors de la division cellulaire, les télomères se raccourcissent progressivement au cours des différents cycles de division, conduisant petit à petit à leur disparition (**Figure 10**). Ce phénomène « d'érosion » est néanmoins ralenti par la télomérase, une enzyme capable d'ajouter des bases à l'extrémité des télomères. Cependant, lorsque les télomères disparaissent, ils ne peuvent plus jouer leur rôle de protection

et les dommages de l'ADN s'accumulent. Ces derniers vont déclencher une réponse cellulaire appelée, en anglais, « DNA Damage Response » [DDR]. La DDR est une voie de signalisation aboutissant à l'activation de P53. Une fois P53 activé, il peut induire la transcription du gène codant pour la protéine P21 [*cyclin-dependent kinase inhibitor 1*], protéine capable d'inhiber certains complexes protéique, conduisant ainsi à un arrêt transitoire du cycle cellulaire. On parle de sénescence répliquative. Si la cellule est capable de réparer les dommages de l'ADN, le cycle reprendra ; sinon, la cellule entre en sénescence.

La sénescence peut également être induite par le stress oxydatif qui va conduire à la régulation de gènes impliqués dans le cycle cellulaire^{27,28}. Le stress oxydatif est causé par un déséquilibre entre la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la capacité d'un système biologique à détoxifier facilement ou à réparer les dommages qui en résultent. Le stress oxydatif peut, en outre, induire une

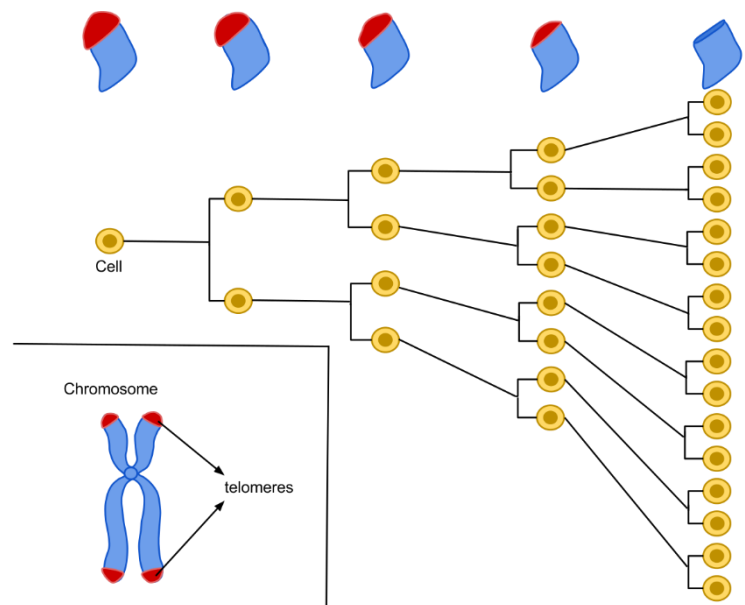


Figure 9 : raccourcissement progressif des télomères au cours de la division cellulaire. Adapté de Compton et al.¹⁴

Introduction

accumulation de la lamine B1 conduisant à des altérations de l'architecture nucléaire capable d'activer la sénescence²⁹.

Différents agents de traitement sont capables d'endommager l'ADN et ainsi d'induire la sénescence. Parmi ces agents, on retrouve les UV, l'irradiation ou les agents de chimiothérapie anticancéreux (telle que la neocarzinostatin). On parle alors de sénescence induite par la thérapie²⁶.

La réaction immunitaire peut être un facteur décisif dans la sénescence, en particulier lors de l'état pro-inflammatoire systémique qui se produit avec le vieillissement³⁰.

Enfin, la sénescence est aussi impliquée dans la réponse aux protéines mal repliées [réponse UPR, *Unfolded Protein Response*]. La réponse UPR est activée en réponse à une accumulation de protéines dépliées ou mal repliées dans la lumière du réticulum endoplasmique. La réponse UPR a pour objectif de restaurer la fonction normale de la cellule en arrêtant la traduction des protéines, en dégradant les protéines mal repliées et en activant les voies de signalisation qui conduisent à l'augmentation de la production des chaperons moléculaires impliqués dans le repliement des protéines³¹.

1.3.1.3.1.4.1 Les mécanismes d'échappement

Atteindre et maintenir un état d'immortalité répliquative est l'une des caractéristiques cruciales du développement du cancer qui implique deux mécanismes. Le premier est l'échappement aux différents facteurs d'arrêt du cycle cellulaire [P53 ou P16] et le second, qui concerne plus de 90 % des cancers³² est le maintien de la longueur des télomères grâce à la modification de l'expression de la télomérase. Cette modification est due à une mutation de la région promotrice du gène hTERT qui code pour la *télomérase reverse transcriptase*. Cette mutation entraîne une augmentation de la transcription de la télomérase qui pourra alors davantage contrer l'érosion progressive des télomères. La cellule tumorale devient alors capable de déjouer le phénomène de sénescence et de se multiplier éternellement et sans contrôle.

1.3.1.3.2 L'angiogenèse tumorale

1.3.1.3.2.1 Le système vasculaire

L'une des tâches les plus importantes du système vasculaire est l'apport en dioxygène et en nutriments ainsi que l'évacuation des déchets produits par l'organisme. Cette fonction, assurée par le sang circulant, est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme et implique la formation permanente de nouveaux vaisseaux sanguins en fonction des besoins des différents organes et tissus.

La paroi des vaisseaux sanguins est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales jointives et interconnectées les unes aux autres. Pour permettre une perfusion optimale, ces cellules sont polarisées et alignées avec la direction du flux sanguin. Les vaisseaux sanguins ne sont pas uniquement

Introduction

composés de cellules endothéliales. On y retrouve aussi les cellules murales qui jouent un rôle important dans la formation, la stabilisation et la survie des vaisseaux sanguins. Elles régulent également la perméabilité et contrôlent le diamètre de ces derniers.

La mise en place de ces vaisseaux sanguins et d'un réseau vasculaire fonctionnel se fait suivant deux mécanismes distincts : la vasculogenèse et l'angiogenèse.

La vasculogenèse permet la création de nouveaux vaisseaux par recrutement des précurseurs endothéliaux. Ce mécanisme intervient en particulier au cours du développement embryonnaire et aboutit à l'établissement du plexus vasculaire primitif.

L'angiogenèse assure la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants, permettant ainsi le remodelage du réseau vasculaire formé lors de la vasculogenèse.

1.3.1.3.2.2 L'angiogenèse pathologique

Comme tous les tissus de l'organisme, les cellules tumorales ont besoin de dioxygène et de nutriments pour vivre et proliférer. Cet apport ne peut être assuré que par la circulation sanguine, recrutée par le parenchyme tumoral en induisant l'angiogenèse.

L'angiogenèse physiologique est parfaitement régulée, et se produit durant le développement, la cicatrisation ou le cycle menstruel et s'interrompt lorsque le besoin en nouveaux vaisseaux sanguins n'est plus nécessaire. En revanche, l'angiogenèse tumorale est fortement dérégulée³³. En effet, le réseau vasculaire sort de son état de quiescence et les cellules endothéliales deviennent très actives. L'angiogenèse tumorale est alors exacerbée, notamment à cause de la dérégulation de la balance entre facteurs pro- et anti-angiogéniques provenant des cellules tumorales, des cellules stromales (cellules endothéliales, inflammatoires et fibroblastes associés au cancer), mais aussi du sang et de la MEC. Les cellules tumorales et les cellules du micro-environnement tumoral interagissent en permanence entre eux pour créer un milieu dynamique et favorable au développement de la tumeur³⁴.

La perte de cette balance crée un déséquilibre durable dans le micro-environnement tumoral. Pour que la vascularisation soit efficace, elle est caractérisée par une division bien agencée et suit un schéma précis, partant des artères pour finir en veines ; ce qui n'est pas le cas des cancers. En effet, la présence d'une signalisation pro angiogénique constante conduit à une organisation tortueuse, une morphologie très dilatée, une importante perméabilité résultant de perturbations des jonctions endothéliales, d'une absence de maturité du réseau vasculaire³⁵ et de la présence de cellules murales partiellement détachés et répartie de manière irrégulière sur les vaisseaux sanguins. Le mauvais maintien de la structure a pour conséquence d'augmenter la fragilité des vaisseaux et les risques d'hémorragie³⁶⁻³⁸(**Figure 11**). La présence d'un tel réseau hétérogène dans le parenchyme tumoral entraîne une

Introduction

irrégularité du flux sanguin à travers les vaisseaux mal organisés et mal formés conduisant à des zones d'hypoxie persistante ou intermittente, induisant la surexpression de nombreux facteurs pro-angiogéniques^{39,40}.

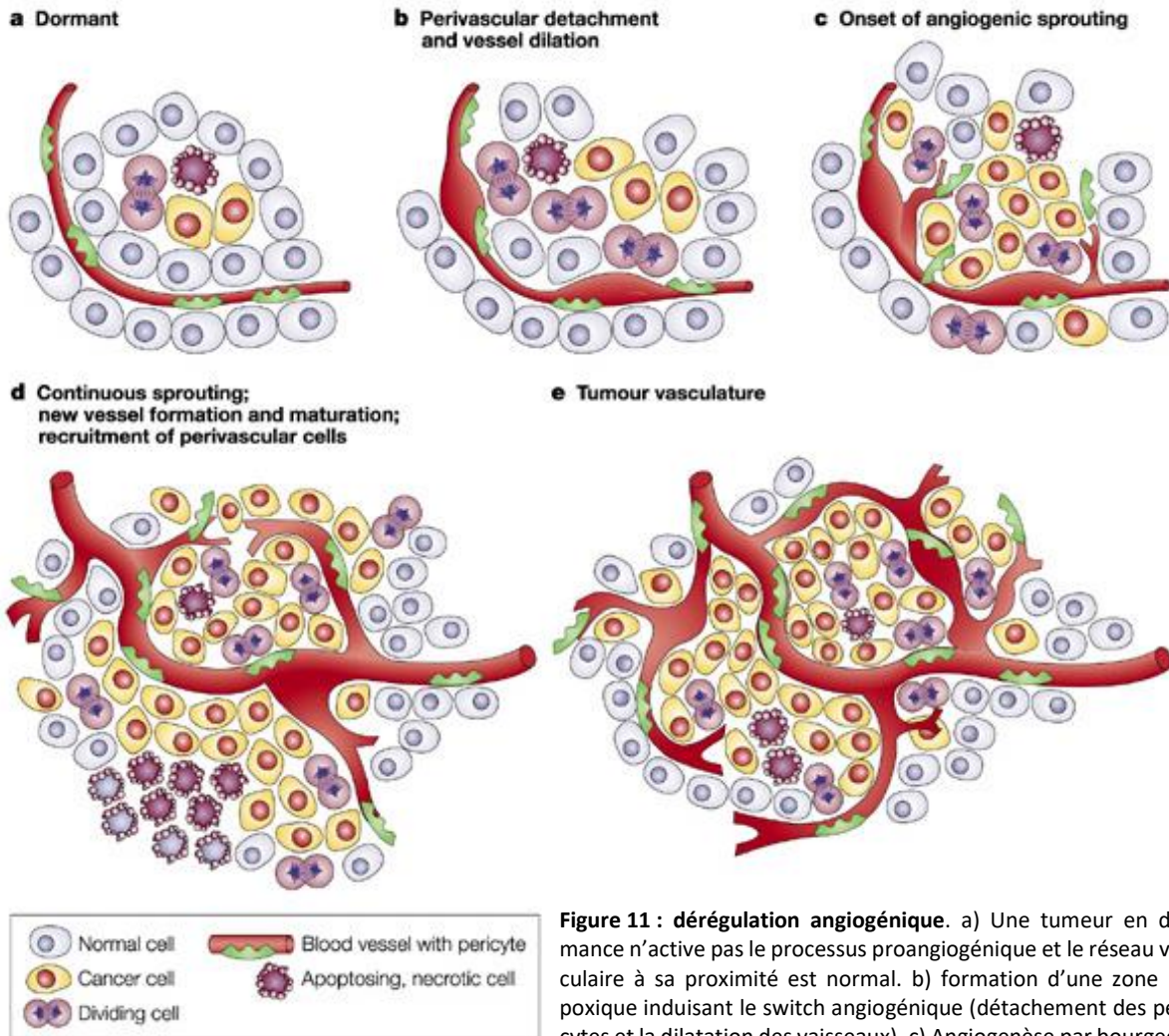


Figure 11 : dérégulation angiogénique. a) Une tumeur en dormance n'active pas le processus proangiogénique et le réseau vasculaire à sa proximité est normal. b) formation d'une zone hypoxique induisant le switch angiogénique (détachement des péricytes et la dilatation des vaisseaux). c) Angiogenèse par bourgeonnement. d) Croissance des nouveaux. e) invasion par le réseau vasculaire tumoral en rapport avec le développement tumoral. Adapté de Berger et al. ³⁷

L'angiogenèse est un processus majeur indispensable à la croissance tumorale, la survie et la dissémination métastatique.

1.3.1.4 La dissémination métastatique

Il s'agit de la dernière étape de progression du cancer, ce processus est divisé en plusieurs étapes. Les cellules normales sont polarisées, attachées latéralement aux cellules adjacentes et reposent sur la membrane basale sous-jacente. Normalement, les cellules épithéliales sont fixées et immobiles. Dans le cas de la dissémination métastatique, les cellules tumorales épithéliales sont capables de modifier leurs caractéristiques, de gagner en mobilité et ainsi de se détacher de la tumeur primaire pour

Introduction

coloniser des organes distants en empruntant les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Il s'agit de la caractéristique la plus mortelle des cellules tumorales.

Pour quitter la tumeur principale, les cellules tumorales doivent être capables de digérer, de rompre et de pénétrer leur membrane basale, mais avant tout, de se libérer des attaches cellulaires basales et d'acquérir une mobilité. L'acquisition de ce phénotype mobile, migratoire et invasif est appelée la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

1.3.1.5 La transition épithélio-mésenchymateuse

Il s'agit d'un processus retrouvé de façon normale durant l'embryogenèse et la cicatrisation et qui va être détourné par la cellule tumorale pour potentiellement poursuivre sa progression. Les cellules vont subir une transformation dynamique, leur permettant de passer d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux (**Figure 12**). Ce changement de phénotype leur donne la capacité de se déplacer librement en dehors de la tumeur primaire, sous forme de cellules uniques ou en petits groupes. À cette fin, les cellules doivent obligatoirement perdre leur capacité d'adhésion les unes aux autres, à la MEC, modifier l'expression de molécules de surface cellulaire, restructurer le cytosquelette et exprimer des protéines de type mésenchymateux qui ne sont normalement pas produites par les cellules épithéliales.

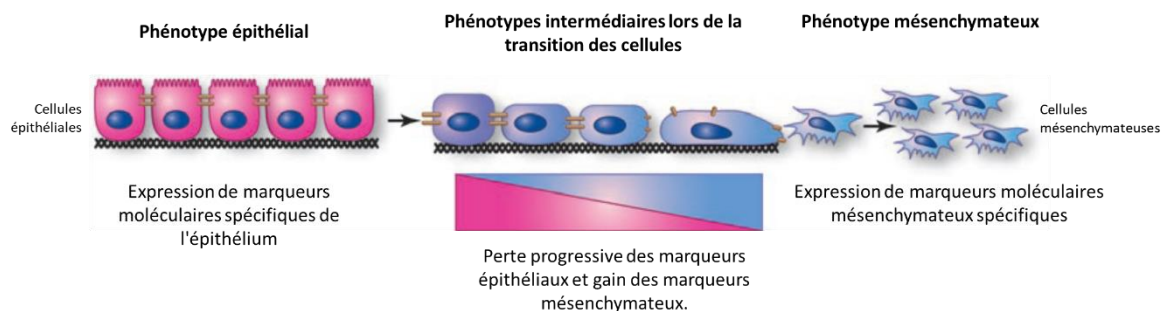


Figure 12 : Transition épithélio-mésenchymateuse. Adapté de Compton et al.¹³

Les protéines d'adhésion cellulaire (CAMs, *cell adhesion molecule*) sont responsables de la fixation des cellules épithéliales entre elles et à leur MEC. Elles sont divisées en 4 grandes classes de protéines. Ces protéines, généralement transmembranaires, sont liées aux protéines intracellulaires du cytosquelette.

La première catégorie est la super famille des *Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecules* (IgSF CAMs) qui présente la plus grande diversité parmi les CAMs⁴¹. Ils assurent la médiation de l'adhésion cellule-cellule indépendante du calcium en se liant à d'autres domaines de type Ig de même structure sur une surface cellulaire opposée (adhésion homophile) ou en interagissant avec des intégrines et des hydrates de carbone (adhésion hétérophile)⁴².

Introduction

La seconde catégorie, les intégrines, constitue une classe majeure de récepteurs impliqués dans l'adhésion cellulaire qui contrôlent le développement et assurent la liaison avec la MEC. Les intégrines jouent aussi un rôle très important dans la transmission de signaux à travers la membrane plasmique, régulant ainsi la migration, la survie et la croissance des cellules.

Les cadhérines constituent la troisième catégorie. Elles sont responsables de l'adhésion cellule-cellule durant l'embryogenèse, du maintien de l'architecture normale des tissus, de la différenciation et de la régulation de l'anoïkis. Ces glycoprotéines se lient uniquement aux caténines et donnent des jonctions adhérentes ou des desmosomes, qui sont cruciaux pour l'adhésion cellule-cellule⁴³.

Quatrième et dernière catégorie, les sélectines sont des molécules d'adhésion vasculaire exprimées par les cellules dérivées de la moelle osseuse et les cellules endothéliales. Elles régulent les interactions entre les leucocytes, les plaquettes sanguines et les cellules endothéliales. Elles jouent un rôle important dans l'inflammation, l'immunité et l'hémostase⁴⁴.

Dans de nombreux cancers, la TEM est induite par la mutation des gènes codant pour l'E-cadhérine et/ou l'intégrine. Ces mutations entraînent une modification des jonctions cellules-cellules et un dérèglement de l'anoïkis.

1.3.1.5.1 L'anoïkis

L'anoïkis est un mécanisme d'élimination des cellules mal placées ou détachées, que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Ce mécanisme est essentiel pour empêcher la croissance et la fixation de cellules indépendantes à une MEC inappropriée, évitant ainsi la colonisation d'organes distants^{45,46}. L'initiation et l'exécution de l'anoïkis sont médiées par différentes voies, qui convergent toutes vers l'activation des caspases et des voies moléculaires en aval, responsable de l'activation de l'apoptose (**Figure 6**). Les cellules épithéliales sont normalement protégées de l'anoïkis lorsqu'elles adhèrent à la MEC grâce à leurs liaisons intégrine – MEC. Cette liaison permet d'inhiber l'activation de l'apoptose en induisant des signaux anti-apoptotiques et pro survivants de la part de la MEC⁴⁵

1.3.1.5.2 Dérégulation de l'anoïkis

En principe, les cellules qui ne sont plus en contact avec leurs voisines et avec la MEC devraient être éliminées par apoptose. La perte de l'anoïkis entraîne ainsi la survie des cellules tumorales détachées, devenues insensibles à l'apoptose. Les cellules cancéreuses développent une résistance à l'anoïkis grâce à plusieurs mécanismes, notamment la modification du répertoire des intégrines leur permettant de se développer dans différentes niches, l'activation d'un grand nombre de signaux de survie, comme la suractivation des récepteurs due à des boucles autocrines soutenues, l'activation d'oncogènes, la surexpression des récepteurs de facteurs de croissance ou la mutation/régulation d'enzymes clés impliquées dans la signalisation des intégrines ou des récepteurs de facteurs de croissance⁴⁵. Tous

Introduction

ces évènements aident les cellules cancéreuses à inhiber la machinerie d'apoptose et à maintenir les signaux de survie après le détachement, contrant ainsi l'anoïkis.

1.3.1.5.3 Initiations de la TEM

Pour initier la TEM, la cellule tumorale va modifier l'expression des molécules d'adhésion cellule-cellule. En modifiant cette expression, un phénotype mésenchymateuse qu'épithélial¹⁴ sera davantage exprimé, lui octroyant ainsi la capacité à se détacher. Une fois la capacité acquise, la cellule traverse la MEC. À cette fin, elle exprime des protéases, comme des métalloprotéases et la plasmine, lui donnant la capacité de dégrader et détruire la MEC, et lui permettant alors d'envahir la membrane basale et le tissu conjonctif sous-jacent. Une fois ces différentes caractéristiques acquises durant la TEM, les cellules cancéreuses auront accès à un large réseau de vaisseaux sanguins et lymphatiques. L'accès à ces réseaux n'est possible que si la cellule tumorale acquiert la capacité à traverser la paroi des vaisseaux, on parle alors d'intravasation.

1.3.1.6 L'intravasation

L'intravasation est un phénomène physiologique normal. Il est utilisé par les thymocytes et d'autres cellules immunitaires pour entrer dans la circulation sanguine et lymphatique de la peau et des muqueuses ou pour rejoindre un site d'inflammation⁴⁷. Les cellules tumorales détournent ce mécanisme pour traverser la paroi des vaisseaux, se disséminer jusqu'aux sites propices à leur prolifération et développer des métastases. Les cellules circulant dans les vaisseaux sont alors appelées Cellules Tumorales Circulantes (CTC).

L'intravasation concerne généralement le réseau lymphatique plutôt que le réseau sanguin. En effet, contrairement aux vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques sont composés d'un endothélium extrêmement fin ne présentant pas de jonctions intercellulaires endothéliales denses, d'une paroi souple et la circulation lymphatique y est plus lente. Les caractéristiques de ces vaisseaux, et notamment le faible flux, permettent à la cellule tumorale de pénétrer facilement le réseau lymphatique. Par ailleurs, la faiblesse du flux permet la formation de micro-embolus souvent à l'origine de foyers secondaires⁴⁸. La cellule tumorale, alors présente dans les vaisseaux lymphatiques, va atteindre le ganglion lymphatique le plus proche, appelé ganglion sentinelle. Les CTC s'y accumulent et constitueront des précurseurs de métastases. Elles circulent ensuite dans le réseau lymphatique pour atteindre les vaisseaux sanguins.

Bien que les cellules tumorales empruntent préférentiellement le réseau lymphatique, elles peuvent parfois entrer dans les vaisseaux sanguins, selon plusieurs types de mécanismes.

L'intravasation de type amiboïde induite par la signalisation Rho/ROCK est caractérisée par la formation de protubérances et de bulles. Cette particularité permet à la cellule tumorale de traverser la paroi

Introduction

des vaisseaux sanguins au niveau de sites remodelés par la cellule en elle-même, mais aussi par la forte perméabilité des vaisseaux^{49,50}.

Le deuxième mécanisme d'intravasation sanguine est induit par les macrophages associés à la tumeur. Les macrophages périvasculaires produisent du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) attirant par chimiotactisme les cellules tumorales qui expriment le récepteur du VEGF. Les cellules tumorales, ainsi activées par le VEGF, attirent les macrophages et les incitent à produire davantage de VEGF. Les macrophages modifient également la perméabilité des vaisseaux facilitant l'intravasation des cellules tumorales⁵¹.

L'intravasation reste à ce jour mal comprise, et plusieurs hypothèses sont encore à l'étude, par exemple, l'intravasation associée à l'extrusion qui serait régulée par la voie de signalisation S1P/S1PR, voie capable d'expulser la cellule en apoptose en dehors de la couche épithéliale et détournée par la cellule tumorale, on parle d'extrusion apicale^{52,53}.

L'intravasation pourrait également être facilitée par la fusion des cellules tumorales avec des macrophages, fusion qui permet aux cellules tumorales d'acquérir certaines propriétés spécifiques des macrophages, en particulier la production de métalloprotéases, de cytokines, de ligands et de récepteurs typiques donnant lieu à l'intravasation⁴⁷.

La CTC sort ensuite du vaisseau par extravasation.

1.3.1.7 L'extravasation

Il a été démontré que l'extravasation des CTCs est très similaire à l'extravasation des leucocytes au cours de la réponse inflammatoire où une multitude de molécules sont impliquées ; entre autres : plusieurs sélectines, des immunoglobulines, des intégrines, des cadhérines et de nombreuses cytokines (**Figure 13**). Les cytokines inflammatoires sécrétées par la cellule cancéreuse et la réponse immunitaire jouent un rôle très important dans l'activation des CAMs des cellules endothéliales et des CTCs. Elles permettent l'initiation de l'extravasation en se fixant à des glycoprotéines, des sélectines et à l'antigène Thomsen-Friedenreich (TF) de l'endothélium microvasculaire. De plus, la forte expression de cytokines induit la production de ROS qui endommagent de façon irréversible l'endothélium. La présence importante de CAMs induit une réorganisation du cytosquelette d'actine des cellules endothéliales et perturbant leurs jonctions, facilitant ainsi l'adhésion des CTCs. Enfin les leucocytes du micro-environnement eux-mêmes peuvent faciliter l'adhésion des CTCs⁵⁴. Les CTCs sont piégées dans les capillaires ou les vaisseaux sinusoïdaux à cause de leur taille ; ce qui favoriserait également leur fixation.

Introduction

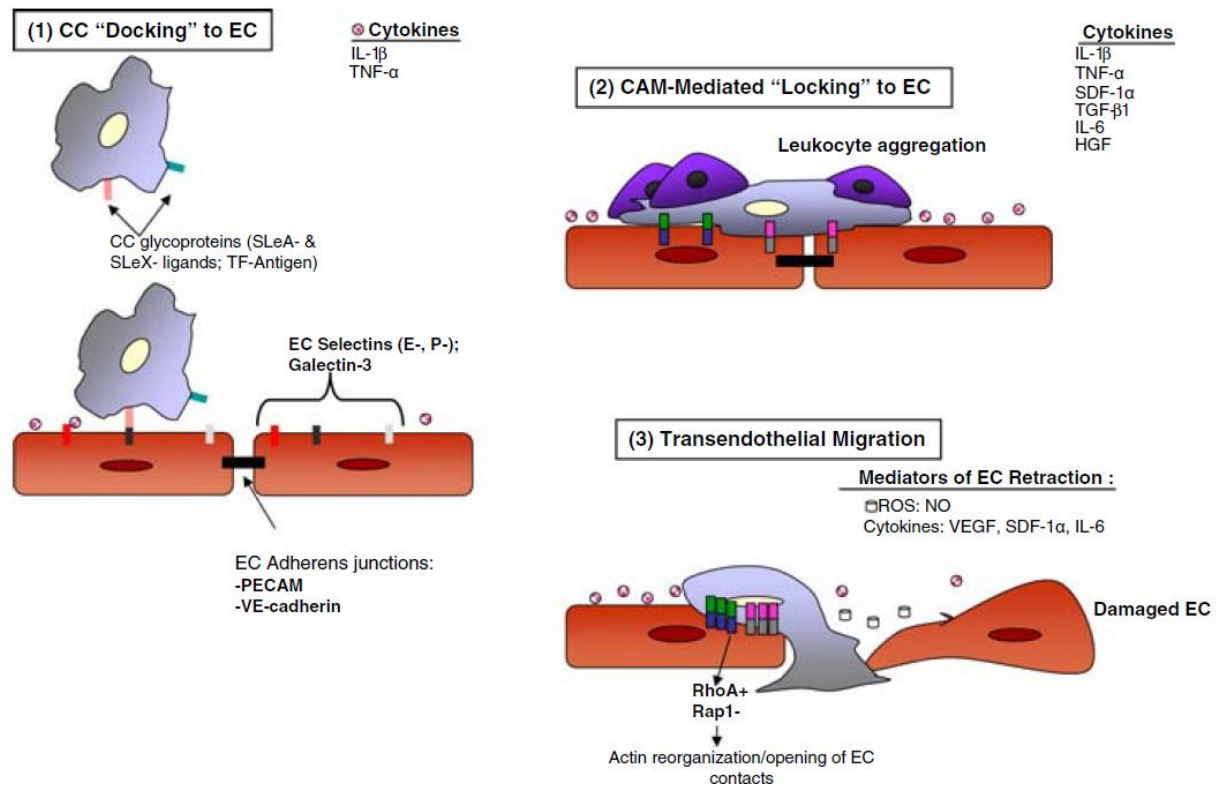


Figure 13 : Extravasation de l'endothélium vasculaire par les cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses peuvent se fixer à l'endothélium microvasculaire activé par les cytokines par l'intermédiaire de glycoprotéines et des sélectines endothéliales correspondantes et de l'antigène TF. Le « verrouillage » a été démontré dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses et est médié par la liaison de diverses CAM à leurs ligands endothéliaux respectifs. *Adapté de Miles et al.* ⁵⁴

Une fois la CTC sortie du vaisseau, elle va rétablir ses caractéristiques épithéliales. Pour ce faire, elle inverse le processus de TEM, en un processus appelé « transition mésenchymateuse — épithéliale » (TME).

1.3.1.8 La transition mésenchymateuse-épithéliale

Il s'agit encore une fois d'un processus normal impliqué dans le développement et détourné en faveur de la CTC⁵⁵. Les mécanismes exacts permettant cette transition ont été bien moins étudiés que la TEM et restent aujourd'hui encore incompris. Des études ont montré que les cellules tumorales augmentent leur expression de E-cadhérine et acquièrent un phénotype caractéristique de cellules épithéliales différenciées⁵⁶. Il est aussi suggéré que l'environnement tumoral joue un rôle important dans le passage à la TME. En effet, au début de la TEM, la tumeur primaire exprime beaucoup de facteurs induisant la TEM, mais une fois la CTC éloignée du site primaire, elle est retrouvée éloignée de ces facteurs. La perte de ces signaux fait simplement revenir la cellule à un état épithélial^{57,58}. Enfin, il est suggéré que la TME aide les cellules tumorales à établir des connexions avec les cellules normales résidentes et que des connexions étroites existent entre les cellules tumorales et les cellules normales du tissu envahi^{59,60}.

Après avoir réalisé la TME, les cellules tumorales colonisent un nouvel environnement et y prolifèrent. Le processus de métastase peut se produire simultanément dans un ou plusieurs site(s) anatomique(s)

Introduction

différent(s), mais le choix de cet environnement n'est pas aléatoire. En effet, depuis l'hypothèse du sol et de la graine de Stephen Paget⁶¹, on sait que la cellule tumorale s'implante de préférence dans les micro-environnements qui répondent le mieux à ses besoins de croissance. L'efficacité de l'implantation dépend à la fois des caractéristiques du cancer et des caractéristiques du micro-environnement dans lequel la cellule s'est développée. Une fois les cellules implantées, elles peuvent communiquer avec les cellules environnantes grâce aux cytokines tumorales et inflammatoires produites. Cette communication influence directement le comportement adhérent, migratoire et invasif des cellules cancéreuses, participant ainsi à leurs survies et à leur croissance dans le nouveau site¹⁴.

Le processus métastatique reste néanmoins un processus très infructueux. De nombreuses cellules tumorales peuvent quitter la tumeur primaire, mais très peu d'entre elles sont capables de produire des métastases. Seules les cellules les plus agressives possèdent les capacités nécessaires pour créer un deuxième foyer. C'est pourquoi la présence de métastase présage une issue funeste.

L'inefficacité des cellules à former des métastases est une caractéristique clinique intéressante permettant la détection et le suivi du cancer. En effet, les CTCs peuvent facilement être détectées visuellement dans diverses biopsies liquides. Elles peuvent aussi ne pas survivre et/ou être détruites, entraînant un relargage de nombreux fragments de leur matériel génétique, mais aussi des protéines que l'on peut retrouver dans les analyses (de l'ADN tumoral libre circulant [ADNtc] ou des exosomes par exemple), donnant de nombreuses et précieuses informations sur le cancer. La détection des CTCs et de diverses molécules est très utile dans le cas du cancer de la vessie (CV). De nombreuses cellules tumorales et molécules associées au CV peuvent être détectées directement dans les urines d'une personne malade. À l'heure actuelle, l'étude des urines dans le cas du CV fait l'œuvre de nombreuses recherches.

2 Le carcinome urothélial de la vessie

2.1 La vessie

La vessie urinaire est un réservoir musculaire situé dans l'espace extrapéritonéal du bassin, derrière les os pubiens. Il s'agit d'un réservoir capable de stocker l'urine produite par les néphrons des reins, et transportée jusqu'à la vessie par l'uretère avant d'y être expulsée par l'urètre.

Au fur et à mesure que la vessie se remplit, elle s'élargit vers le haut de sorte qu'elle se trouve au plus profond de la paroi abdominale antérieure, changeant radicalement de forme. L'action de s'étirer active des mécanorécepteurs qui vont stimuler le système nerveux afférent puis engendrer une réponse efférente entraînant la contraction de la vessie et la relaxation du sphincter urétral. D'autres facteurs jouent un rôle crucial dans le déclenchement de la miction, tels que des facteurs psychologiques (*i.e.* le stress), le sentiment

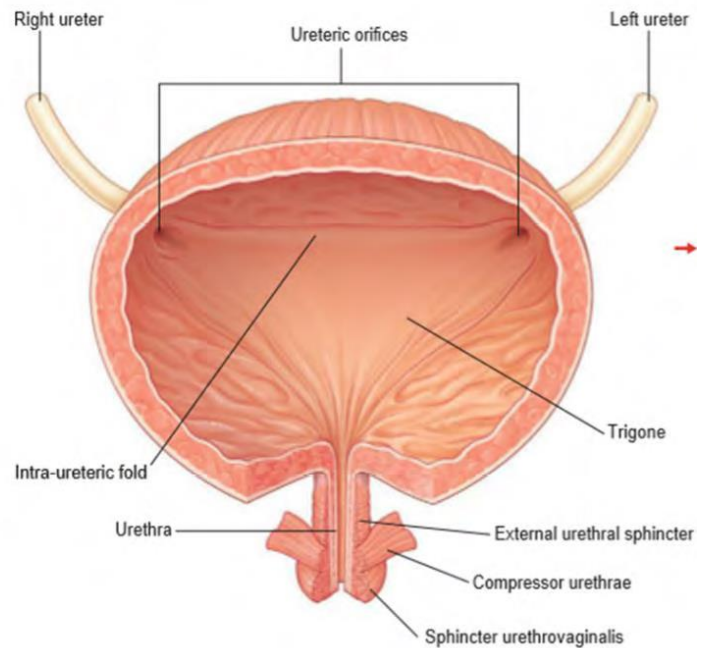


Figure 14 : Anatomie de la vessie chez la femme *Gray's atlas of anatomy—Drake et al.* ⁶⁵

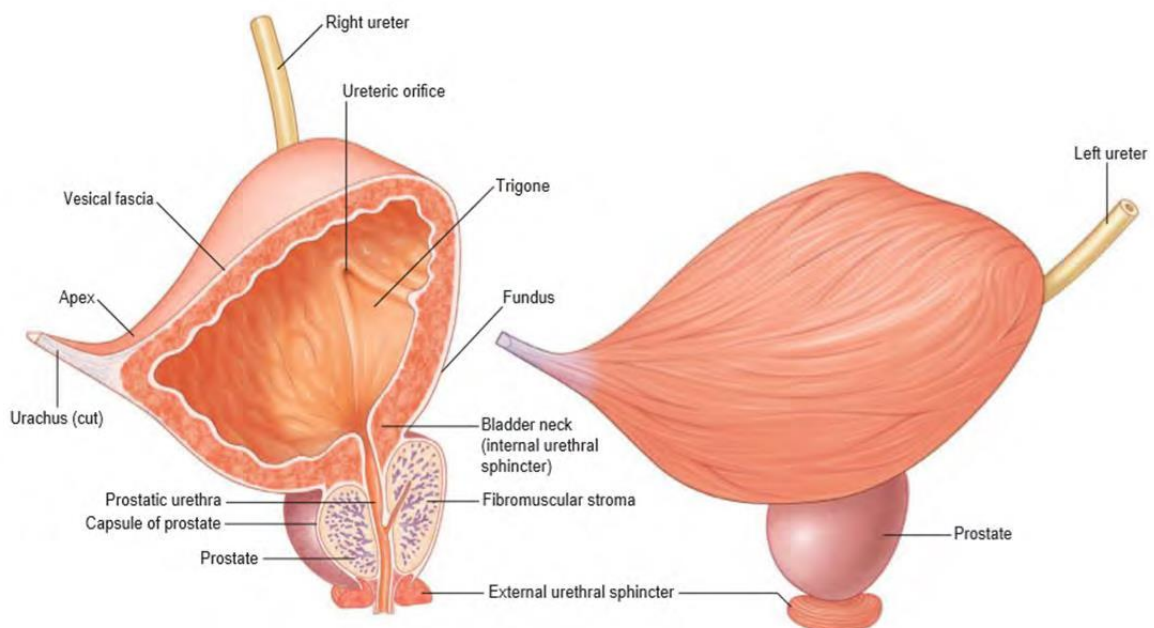


Figure 15 : Anatomie de la vessie chez l'homme. *Gray's atlas of anatomy—Drake et al.* ⁶⁵

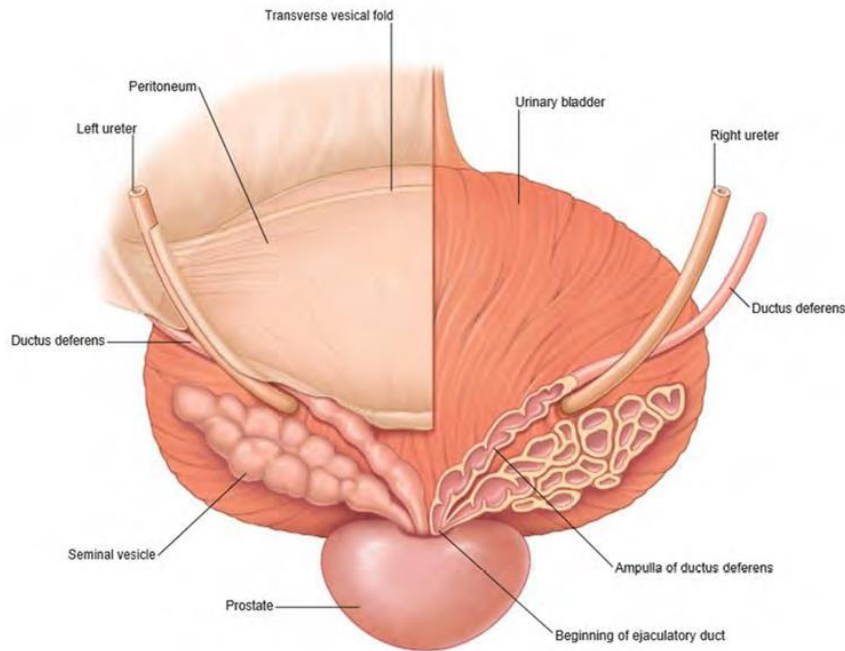


Figure 16 : Vue postérieure de la vessie et de la prostate. *Gray's atlas of anatomie— Drake et al.* ⁶⁵

d'un environnement acceptable ou l'état émotionnel⁶². La capacité de la vessie est en moyenne de 500 mL chez l'être humain⁶³. À vide, elle se présente sous la forme d'un tétraèdre constitué d'un apex, un corps, un fond et un col, vue de l'extérieur. L'apex est la partie antérosupérieure de la vessie qui pointe vers la paroi abdominale. Le fond est la partie postéro-inférieure de la vessie. Le corps est la grande zone située entre l'apex et le fond. Le col de la vessie est la partie rétrécie de la vessie qui mène à l'urètre⁶⁴ (**Figure 14-16**)⁶⁵. La paroi de la vessie s'organise en différentes couches : l'épithélium de revêtement, la *lamina propria*, la *muscularis propria*, une membrane séreuse et l'adventice.

2.1.1 Composition de la vessie

La vessie est composée de différentes couches de tissus (**Figure 17**)⁶⁶.

2.1.1.1 L'urothélium

L'urothélium est un épithélium stratifié spécialisé. Il est exclusivement présent dans les structures urinaires (uretère, vessie et urètre) et est composé de trois couches distinctes de cellules^{67,68}, dont le nombre d'assises varie de 3 à 7 selon que la vessie soit vide ou en distension :

2.1.1.1.1 La couche apicale

La couche apicale correspond à la couche endogène de la vessie qui sert de barrière entre la lumière et le tissu sous-jacent. Elle est composée d'une monocouche de cellules urothéliales superficielles (**Figure 17**) pouvant être mono- ou plurinucléaires. Elles sont appelées communément cellules recouvrantes, cellules ombrelles ou bien cellules en parapluie (CP). Les CPs sont de grandes cellules dont la taille varie en fonction de l'état de remplissage de la vessie (entre 25 et 250 μm de diamètre)⁶⁹. Pour

Introduction

une vessie vide, les cellules sont retrouvées sous une forme plutôt cubique. Dans le cas d'une vessie pleine, elles seront grandement étirées et d'une morphologie squameuse^{70,71}. Elles sont hautement différenciées, polarisées et possèdent des domaines membranaires apical et basolatéral bien distincts, délimités par des jonctions serrées⁷²⁻⁷⁴. La présence de ces jonctions serrées entre les cellules permet de diminuer le flux paracellulaire tandis qu'une couche glycoprotéique d'uroplakines au pôle apical de ces cellules permet d'avoir une barrière imperméable extrêmement efficace⁷⁵.

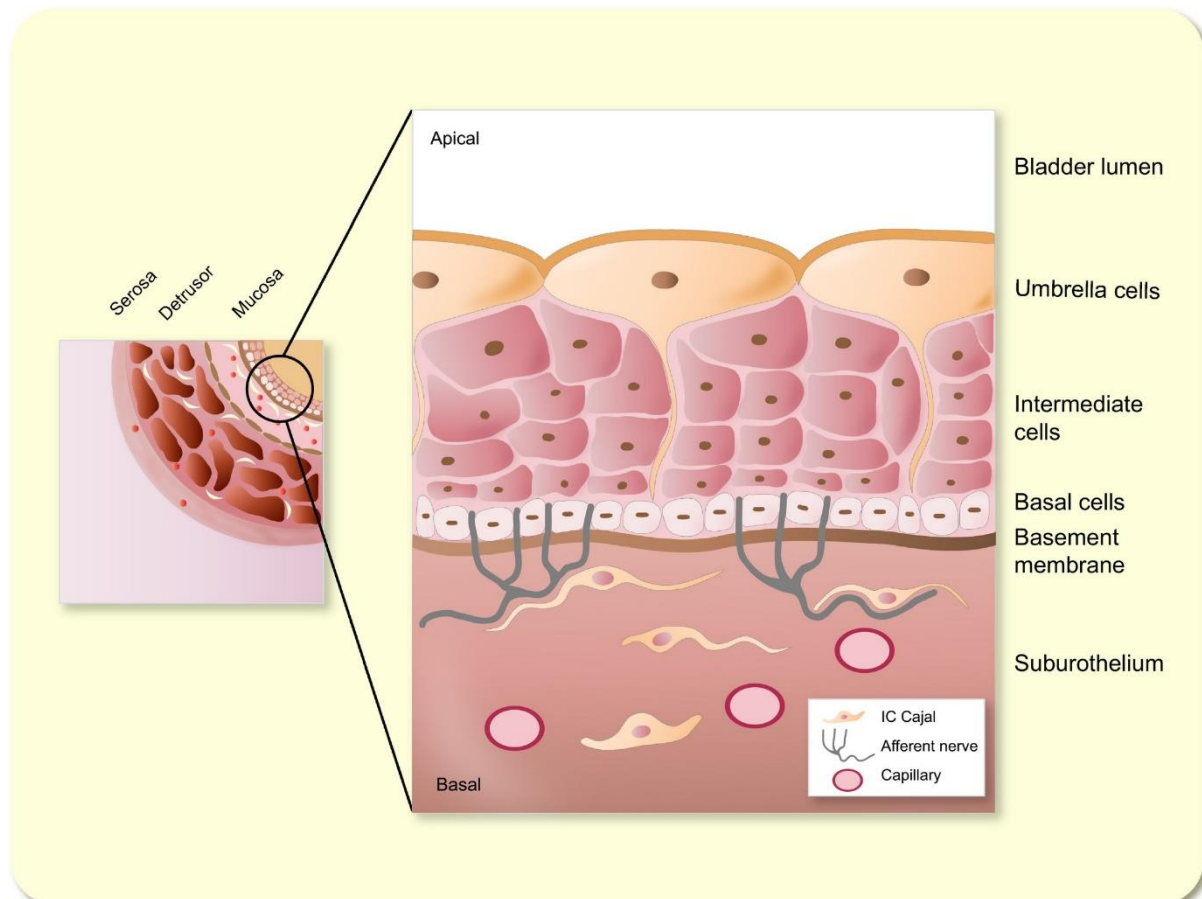


Figure 17 : Anatomie de la paroi et de la muqueuse de la vessie. Adapté de D. A. W. Janssen et al. ⁶⁶

2.1.1.1.2 La couche intermédiaire

La couche intermédiaire est située sous la couche apicale et peut être composée de plusieurs strates de cellules urothéliales intermédiaires (jusqu'à 5) (**Figure 17**). Il s'agit de cellules piriformes mononucléées partiellement différenciées exprimant les marqueurs des CP et des cellules basales. Elles sont reliées entre elles et aux CP par des desmosomes et des jonctions communicantes^{76,77}. La faible présence des desmosomes entre ces cellules contribue à la plasticité du revêtement et permet, en fonction de l'état de remplissage de la vessie, de moduler son épaisseur cellulaire⁷¹.

2.1.1.1.3 La couche basale

La couche basale, située sous la couche intermédiaire, est proche du réseau capillaire de la membrane basale. Cette couche est composée uniquement d'une monocouche de cellules très peu différenciées,

Introduction

fixées à la membrane basale par des hémidesmosomes et aux cellules intermédiaires par des desmosomes. Il s'agit de cellules précurseurs des Cellules URothéliales (CUR), dites cellules urothéliales profondes ou basales (**Figure 17**), exprimant des marqueurs des cellules progénitrices épithéliales (Cytokératine 14) et des cytokératines propres aux cellules basales^{76,78}.

2.1.1.2 La lamina propria

La *lamina propria* est un tissu conjonctif lâche qui a pour rôle de séparer l'urothélium de la *lamina muscularis mucosae*. Il s'agit plus précisément d'une MEC constituée de fibres élastiques, de capillaires sanguins et lymphatiques, de cellules immunitaires, de terminaisons nerveuses afférentes et efférentes, de fibroblastes, de myofibroblastes, d'adipocytes, de cellules interstitielles de Cajal ou de télocytes⁷⁹. Elle joue un rôle dans les échanges de nutriments, l'immunité, mais aussi dans le soutien et les mouvements de l'épithélium.

2.1.1.3 La lamina muscularis mucosae

La *lamina muscularis mucosae* est une couche de muscles lisses située sous la *lamina propria*. Elle permet à la vessie de se contracter pour excréter l'urine ou de se détendre pour la retenir. Elle est composée de fibres musculaires lisses, longitudinales et circulaires. Cette couche de muscles est en continuité avec le sphincter urétral interne, qui est également composé de muscles lisses. L'uretère passe obliquement à travers le muscle détrusor, pour empêcher le reflux de l'urine dans le rein lorsque la vessie se remplit⁸⁰.

2.1.1.4 La membrane séreuse

Fine membrane recouvrant le dôme de la vessie, la membrane séreuse permet la mobilité de la vessie. Elle est constituée d'un mésothélium et d'un tissu conjonctif aréolaire sous-jacent qui repose sur une couche sous-mésothéliale conjonctive, riche en fibres élastiques.

2.1.1.5 L'adventice

L'adventice recouvre la vessie dans les zones où il n'y a pas de membrane séreuse. Elle est composée de fibroblastes orientés longitudinalement et de fibres de collagène associées. On y retrouve des vaisseaux sanguins et des nerfs de petite taille.

2.2 Épidémiologie

Le CV représente 90 % des cancers urothéliaux. Il est le dixième cancer le plus fréquent dans le monde, avec environ 572 000 nouveaux cas et 212 000 décès en 2020⁸¹ (**Figure 18**). Il est placé second parmi les cancers urologiques, après celui de la prostate.

Introduction

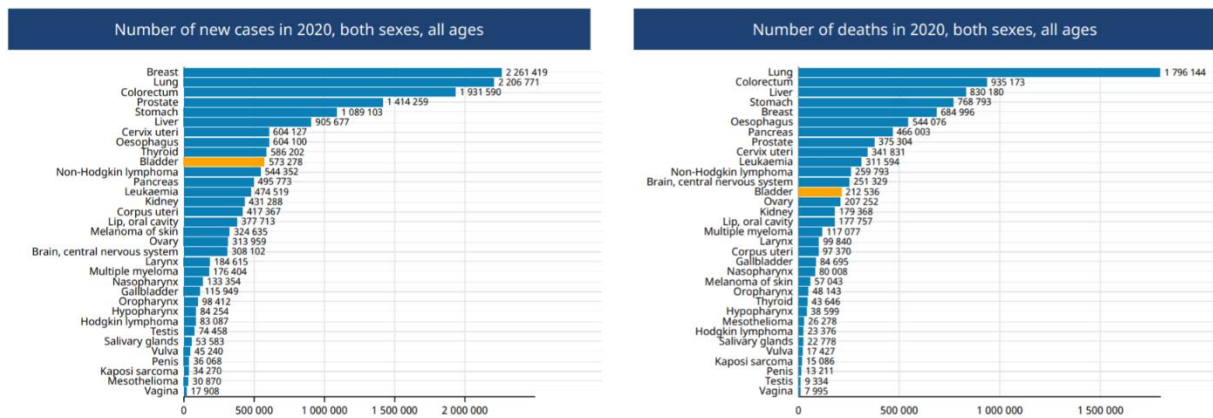


Figure 18 : : Nombre de nouveau de cas de cancer et de décès causés par le cancer sexe et âge confondu en 2020 dans le monde. Adapté de Globocan 2020, OMS⁸¹

Il existe une nette prédominance chez les hommes, avec une incidence mondiale (pour 100 000) de 9,6 chez les hommes et de 2,4 chez les femmes. Les pays présentant les taux les plus élevés de CV se trouvent en grande partie en Europe du Sud et de l’Ouest ainsi qu’en Amérique du Nord (Figure 19). Il est le 4^e cancer le plus fréquent en France, avec un peu plus de 13 000 nouveaux cas diagnostiqués en 2018, dont 88 % sont des hommes^{82,83}. Cette tendance se retrouve aussi dans les décès où il est classé 7^e parmi les cancers les plus mortels avec plus de 5 300 décès, dont 77 % sont des hommes.

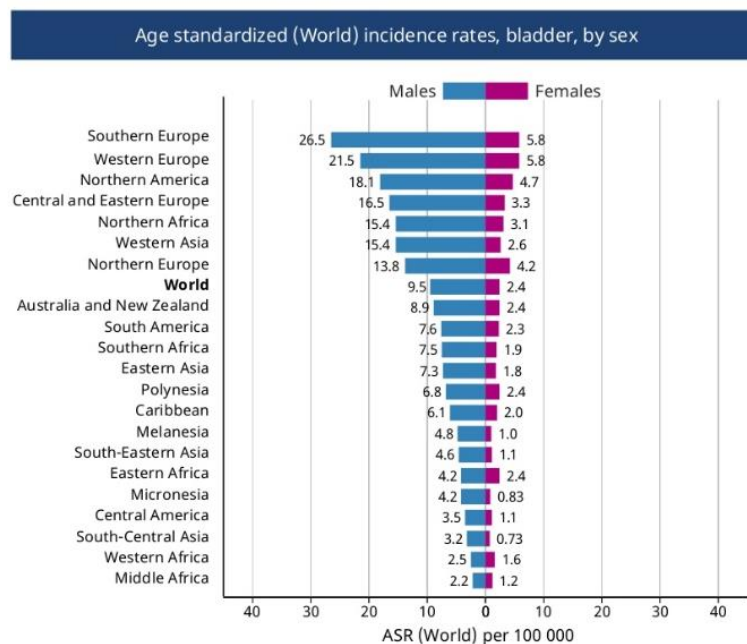


Figure 19 : Taux d’incidence standardisés sur l’âge du cancer de la vessie dans le monde et selon le sexe. Nombre de cas pour 100 000. Adapté de Globocan 2020, OMS. ⁸¹

L’âge médian lors du diagnostic est de 73 ans chez l’homme et 78 ans chez la femme ; quant au décès il est de 79 et 84 ans, respectivement chez l’homme et la femme. En un peu moins de trente ans, le nombre annuel de nouveaux cas de CV est passé de 7 016 à 10 626 (+51 %) chez l’homme et de 1 683 à 2 448 (+45 %) chez la femme en 2018. Cette augmentation est uniquement liée à l’évolution démographique et au vieillissement général de la population (+19 % d’augmentation de la population

Introduction

générale, +45 % à cause de son vieillissement chez l'homme et +34 % chez la femme). La baisse de l'évolution du taux d'incidence confirme que cette augmentation n'est pas liée à l'augmentation du risque de ce cancer (17,2 pour 100 000 personnes-années en 1990 contre 14,3 en 2018 chez l'homme) (**Tableau 1**). La mortalité, tout comme l'incidence, a diminué ces trente dernières années, passant de 7 à 4,7 pour 100 000 chez l'homme et de 1,3 à 0,9 chez la femme. Ces dernières années, une baisse de 1,4 % par an chez l'homme et 1,2 % par an chez la femme a été constatée³.

		Année							Variation Annuelle Moyenne (%)	
		1990	1995	2000	2005	2010	2015	2018	De 1990 à 2018	De 2010 à 2018
INCIDENCE										
	Homme	17,2	16,5	15,5	14,9	14,6	14,4	14,3	-0,7 [-0,8 ; -0,5]	-0,3 [-0,7 ; 0,1]
	Femme	2,5	2,3	2,2	2,2	2,3	2,3	2,4	-0,2 [-0,5 ; 0,1]	0,4 [-0,5 ; 1,3]
MORTALITÉ										
	Homme	7,0	6,8	6,2	5,8	5,3	4,9	4,7	-1,4 [-1,5 ; -1,3]	-1,5 [-1,8 ; -1,2]
	Femme	1,3	1,2	1,1	1,1	1,0	0,9	0,9	-1,2 [-1,4 ; -1,0]	-1,0 [-1,5 ; -0,5]
MORTALITÉ OBSERVÉE										
	Homme	7,1	6,6	6,0	5,8	5,5	4,8	-	-	-
	Femme	1,3	1,2	1,0	1,1	1,0	0,9	-	-	-

Tableau 1 : Taux standardisés d'incidence et de mortalité en France du cancer de la vessie. Nombre de cas pour 100 000. Adapté de Daubisse-Marliac et al. ³

2.3 Étiologie

L'appareil urinaire a pour rôle de filtrer et d'éliminer les déchets présents dans le sang. La filtration est réalisée par les reins qui, après avoir débarrassé le sang de ses déchets, les excrètent dans les urines. Les urines sont ensuite stockées dans la vessie jusqu'à la miction. Tout au long de notre vie, de nombreuses substances toxiques transitent par la vessie avant d'y être éliminées. En fonction du rythme de vie, certaines substances toxiques vont y être retrouvées de façon plus fréquente et/ou prolongée, entraînant un contact répété avec la paroi interne de la vessie pouvant être responsable de l'apparition de tumeurs. De nombreux facteurs jouent un rôle avéré dans la carcinogenèse de la vessie. On parle alors de facteur de risque.

Le plus important est la fumée de tabac, qui est à l'origine, en France, de plus de la moitié des CV chez l'homme et 40 % chez la femme⁸⁴. Le risque de développer un CV est corrélé avec le nombre de cigarettes fumées, l'âge de début et la durée du tabagisme. Les principaux constituants de la fumée de tabac, impliqués dans la carcinogenèse, seraient certaines amines aromatiques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques et certaines nitrosamines.

Par ailleurs, 4 à 7 % des CV seraient dus à l'exposition à des produits en milieu professionnel. Il s'agit en particulier des mêmes substances retrouvées dans les fumées de tabac⁸⁵. C'est le cas de certaines amines aromatiques employées dans la fabrication de produits cosmétiques, pharmaceutiques, de pesticides, de matières plastiques, dans l'industrie du caoutchouc et dans la synthèse des matières

Introduction

colorantes. Par exemple, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, constituants naturels du charbon et du pétrole, peuvent aussi provenir d'une combustion incomplète de nombreuses matières organiques telles que les carburants, le bois ou le tabac. L'exposition professionnelle à ce composé touche 1,6 million de salariés en France^{86,87}, le classant premier responsable de cancers professionnels. Principalement issus de la cokerie, des industries de l'aluminium, du goudron, de l'acier, des pneumatiques et du textile, et de l'électrometallurgie, ces hydrocarbures apparaissent également lors de procédés plus récents de traitement thermique par pyrolyse de gaz hydrocarbonés.

D'autre part, certains traitements augmentent le risque de développer un CV, comme la radiothérapie pelvienne pour le cancer du col de l'utérus qui les augmente de deux à quatre fois. La cyclophosphamide, utilisée pour les tumeurs malignes primaires et les maladies auto-immunes, multiplie, quant à elle, les risques par quatre à neuf fois. Plus le patient y est exposé (dose et durée du traitement), plus les risques de développer un CV sont augmentés. Les patients traités de façon chronique par des analgésiques phénacétines (interdit depuis 1983) ont de 2,3 à 11,2 plus de risque de développer un CV que des patients qui n'ont pas reçu ce traitement. La chlornaphazine, traitement utilisé pour les maladies hématologiques malignes, n'est plus utilisée, car il était responsable de plusieurs cas de CV, en raison de sa métabolisation en amine aromatique^{88,89}.

Il existe également des facteurs de risques environnementaux parmi lesquels on compte certaines substances présentes dans l'eau que nous ingérons, en particulier l'arsenic qui résulte de certaines activités industrielles, ou qui se trouve naturellement dans le sol rocheux de certaines régions. L'eau passant par ces roches plus ou moins riches se charge en arsenic. Le risque de tumeur de vessie augmente si la quantité d'arsenic ingérée est supérieure à 80 µg/jour. Les sous-produits de désinfection, comme les trihalométhanes, représentent la deuxième source de risque de CV dans l'eau potable. En 2013, l'évaluation du CIRC a également corrélé une augmentation du risque de développer un CV avec la pollution de l'air extérieur⁹⁰.

Il semblerait que les infections répétées du *tractus* urinaire, les calculs rénaux et vésicaux, les sondes vésicales laissées en place pendant un certain temps, la bilharziose (un parasite des zones tropicales et subtropicales) et les inflammations chroniques de la vessie soient également responsables de l'apparition de CV.

Enfin, il existe d'autres facteurs de risque mineurs tels que le facteur génétique. Il a été démontré qu'avoir un parent proche (parents, frère/sœur ou enfant) atteint d'un CV augmentait de deux fois le risque d'en développer un⁹¹. Une mauvaise régulation de l'élimination de substances chimiques toxiques par l'organisme après exposition, en serait responsable⁹². Le syndrome de Lynch, maladie héréditaire, augmente les risques de développer certains cancers de l'appareil digestif, de l'endomètre

Introduction

et d'autres organes dont la vessie⁹³. L'âge constitue un autre facteur de risque. Il est très rare de voir se développer et diagnostiquer un CV avant 40 ans en France (1/100 000) alors que les risques augmentent fortement après 73 ans chez l'homme et 78 ans chez la femme (173/100 000 chez l'homme) jusqu'à atteindre un pic chez l'homme entre 85 et 89 ans (255/100 00)⁸³.

2.4 Classification des Cancers de la Vessie

Dans au moins 90 % des cas, les tumeurs de la vessie sont des carcinomes urothéliaux (CU) ou carcinomes à cellules transitionnelles (TCC). Ils sont retrouvés dans l'urothélium et sont classés selon la détermination du système TNM (**Tableau 2**)^{94,95}. Ces carcinomes sont divisés en deux classes :

- Les tumeurs de la vessie n'infiltrant pas le muscle vésical ou *muscularis propria* (TVNIM)
- Les tumeurs infiltrant le muscle vésical (TVIM).

L'agressivité des TCC était anciennement déterminée par le grade de la maladie. Les cellules tumorales peu différenciées sont considérées de haut grade contrairement aux cellules tumorales différenciées considérées de bas grade. Les cellules de haut grade risquent de se propager davantage dans la vessie et de diffuser dans les tissus adjacents.

La majorité des 10 % des autres cas de CV correspond à des carcinomes épidermoïdes (2 à 8 %). Ces cancers touchent les cellules malpighiennes (cellules squameuses) présentes uniquement dans le dernier tiers de l'urètre. Ils se différencient des TCC par une kératinisation plus importante des cellules malpighiennes qui vont se multiplier dans le revêtement de la vessie. Dans 1 à 2 % des CV, on peut aussi trouver des adénocarcinomes des cellules glandulaires de la vessie. Dans moins de 1 %, des carcinomes vésicaux à petites cellules, il s'agit d'une tumeur épithéliale neuroendocrine peu différenciée.

Stade T	Description	Dénomination
pTa	Tumeur papillaire de grade variable sans infiltration de la lamina propria	TVNIM
pTis	Tumeur plane de haut grade sans infiltration - CIS	
pT1	Tumeur papillaire de grade variable avec infiltration de la lamina propria mais sans infiltration du muscle	
pT2	Tumeur envahissant la musculature <i>pT2a</i> Tumeur envahissant la musculature superficielle (moitié interne) <i>pT2b</i> Tumeur envahissant la musculature profonde (moitié externe)	TVIM
pT3	Tumeur envahissant le tissu péri-vésical <i>pT3a</i> Atteinte microscopique <i>pT3b</i> Atteinte macroscopique (masse extravésicale)	
pT4	Tumeur envahissant l'une ou l'autre des structures suivantes : prostate, vésicules séminales, utérus, vagin, paroi pelvienne ou paroi abdominale <i>T4a</i> Prostate, vésicules séminales, vagin ou utérus <i>T4b</i> Paroi pelvienne ou paroi abdominale	

Tableau 2 : classification TNM 2017 des tumeurs de la vessie. Adapté de Rouprêt et al. ⁹⁵

Introduction

2.4.1 Les TVNIM

Entre 70 et 85 % des TCC diagnostiquées sont des TVNIM. Elles représentent uniquement les TCC qui se développent dans l'urothélium ou dans la *lamina propria* et n'envahissent pas la *muscularis propria*⁹⁵. Ils sont classés en 3 catégories (**Figure 20**)⁹⁶ :

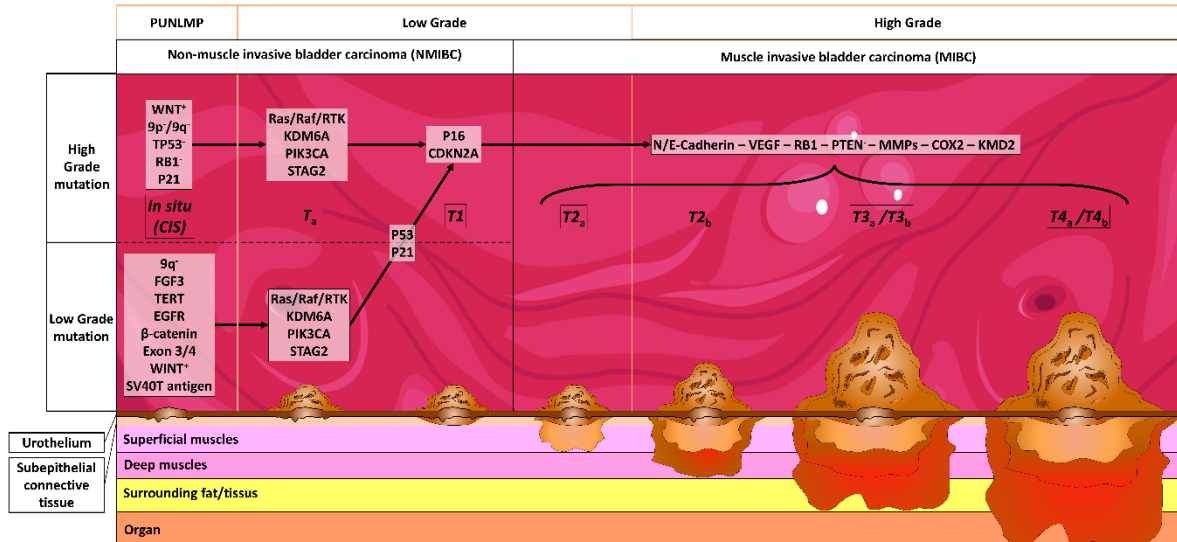


Figure 20 : Évolution et classification du cancer de la vessie. Adapté de Gutierrez et al. ⁹⁶

2.4.1.1 Les tumeurs papillaires non invasives (Ta)

Les Ta, d'aspect bourgeonnant, n'envahissent pas la *lamina propria* et se développent dans la cavité vésicale en restant localisées au niveau de l'urothélium sans traverser la *lamina propria*. Elles peuvent être multiples et groupées.

2.4.1.2 Les carcinomes in situ (Tis)

Les Tis, ou « tumeurs planes » sont des tumeurs d'aspect plan qui ne touchent que les cellules superficielles de la paroi vésicale. Ils se développent uniquement dans l'urothélium, qui est alors remplacé par des cellules tumorales. Ils sont difficilement visibles à l'œil nu et leur identification nécessite une analyse microscopique du tissu.

2.4.1.3 Les tumeurs envahissant la lamina propria (T1)

Elles sont également des tumeurs papillaires qui ont pris naissance dans l'urothélium, mais qui ont franchi la *lamina propria* et se sont développées dans le tissu conjonctif sous-jacent.

Les pronostics et le traitement (**Figure 21**) varient selon les catégories de tumeurs⁹⁵. On distingue les tumeurs dites de faible risque, les tumeurs de risque intermédiaire, les tumeurs de haut risque et les tumeurs de très haut risque.

Les tumeurs de faible risque comprennent les Ta de bas grade unifocales et de moins de 3 cm, provenant d'un patient sans antécédent de CV et les tumeurs à faible potentiel de malignité. Leur niveau de

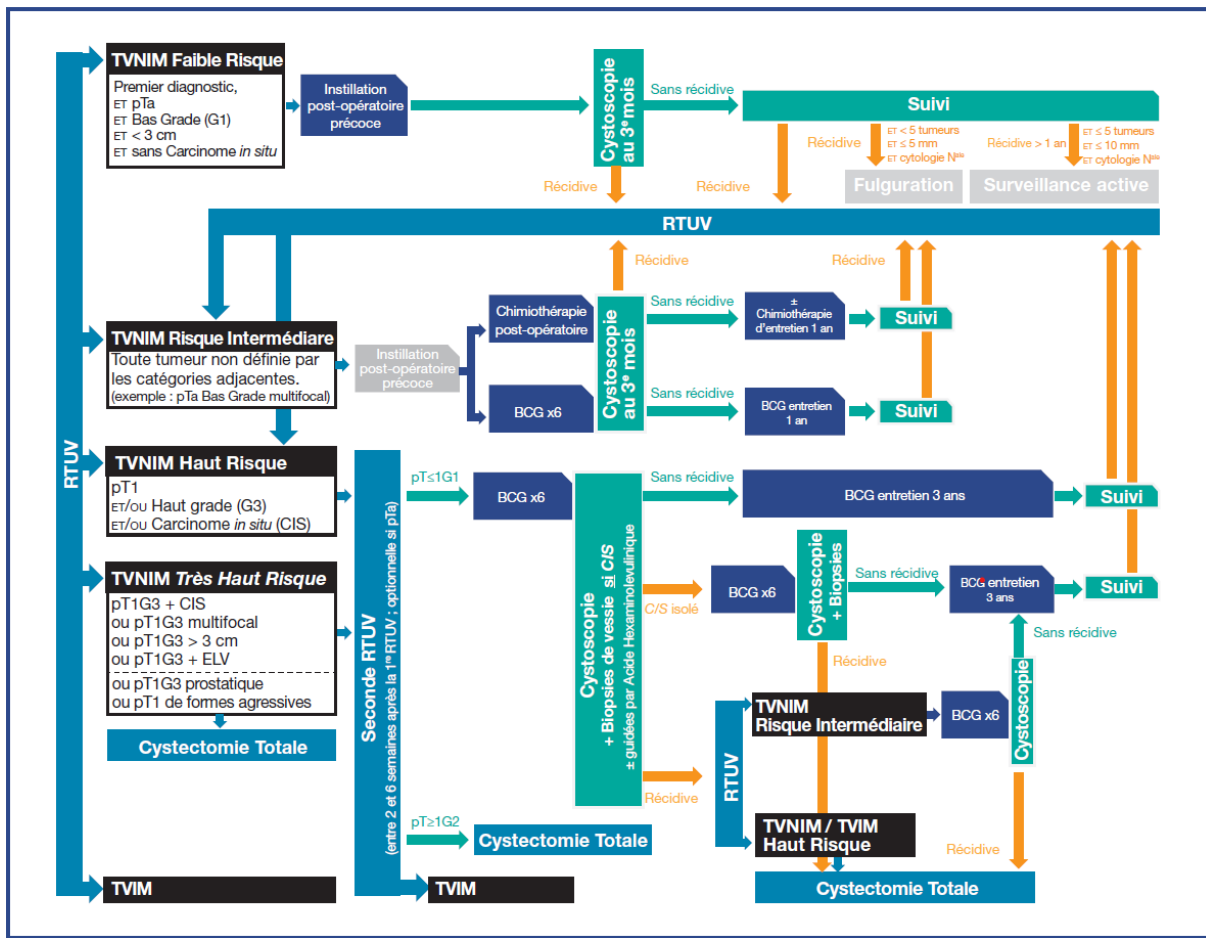


Figure 21 : prise en charge des TVNIM. Rouprêt et al. ⁹⁵

risque de récurrence et de progression est faible et ces tumeurs sont très simples à traiter (instillation postopératoire précoce).

Les tumeurs de risque intermédiaire regroupent toutes les Ta de bas grade ne présentant aucun des critères de risque faible, élevé ou très élevé. Leur risque de progression est faible, mais celle de récurrence élevée. Un traitement par instillations endovésicales de chimiothérapie ou à la BCG-thérapie (traitement à base de vaccin BCG capable de stimuler l'immunité anticancéreuse) est recommandé.

Les tumeurs de haut risque présentent au minimum un stade T1 ou un grade élevé ou la présence de Tis. Leur risque de récurrence et de propagation est élevé. Le traitement est identique au précédent, mais il est prescrit sur une plus longue période.

Les tumeurs de très haut risque concernent les tumeurs de stade T1 et Tis de haut grade. Leur risque de progression est élevé et précoce à cause de leur agressivité, de leur résistance au traitement, ou d'un risque d'envahissement ganglionnaire dès le stade T1.

Au sein des TVNIM diagnostiquées, approximativement 70 % sont classées comme Ta. La survie estimée après guérison des TVNIM est supérieure à 78 % à 5 ans, mais présente un taux de récurrence très

Introduction

élevé du fait de la conservation de la vessie après le traitement de première intention (75 % des cas). Cette récurrence varie en fonction du nombre de TVNIM trouvées dans la vessie et se corrèle avec la quantité⁹⁷. Le suivi à vie de ces tumeurs est primordial, car 10 à 30 % des récurrences sont des TVIM.

Il a été démontré qu'il était possible de distinguer, par des mutations génétiques, le grade du TCC (**Figure 20**). En effet les TVNIM de bas grade présentent des mutations génétiques hautement conservées de FGFR3, PIK3CA, STAG2, et/ou de la voie RTK/RAS/RAF. À l'inverse, les TVNIM de haut grade ressemblent davantage à des TVIM, présentant une altération des gènes de réparation des dommages de l'ADN (ERBB2), des régulateurs du cycle cellulaire (p53, RB1, MDM2 et CDKN2A) et des gènes modificateurs de la chromatine (KDM6A et ARID1A)⁹⁸.

2.4.2 Les TVIM

Lors de diagnostics tardifs ou de récurrences, la tumeur peut envahir la *muscularis propria* et se propager. On parle alors de TVIM. On distingue 3 catégories (**Tableau 2 — Figure 20**)^{95,96}.

Les tumeurs envahissant la *Muscularis propria* (T2) n'infiltrent que le muscle vésical sans atteinte du tissu adipeux périvasculaire. Elles se scindent en deux catégories : les tumeurs envahissant la musculature superficielle (T2a) et les tumeurs envahissant la musculature profonde (T2b).

Les tumeurs envahissant le tissu périvasculaire (T3), en plus d'envahir la *muscularis propria*, se développent dans le tissu adipeux périvasculaire. Elles sont caractérisées soit par une atteinte visible de façon microscopique (tumeur de type T3a), soit par une atteinte visible de façon macroscopique (tumeurs de type T3b).

Les tumeurs de type T4 envahissent un tissu adjacent. Celles de type T4a touchent la prostate, l'utérus ou le vagin alors que celles de type T4b se répandent dans la paroi pelvienne ou abdominale.

Les TVIM sont bien plus agressifs que TVNIM, tout comme le traitement utilisé pour lutter contre. Ils ont une forte propension à croître rapidement et à former des métastases à distance en l'absence de traitement agressif. Il a été démontré que les personnes diagnostiquées d'une TVIM développaient des métastases dans les 2 années qui suivent et généralement succombaient de leur maladie⁹⁹. C'est pourquoi il est important de détecter les TCC de façon précoce. L'utilisation des urines est un moyen simple pour diagnostiquer un CV.

3 Les urines

Il s'agit du liquide biologique le plus important dans l'élimination des déchets liquides du métabolisme. Elles sont sécrétées par le rein après filtration du sang. On distingue 2 types d'urine, une urine dite primitive et une autre dite définitive. L'urine primitive est une urine qui a été filtrée une première fois dans le glomérule rénal (situé à l'intérieur du néphron). Les glomérules étant très perméables, la filtration se fait simplement par pression osmotique. Cette urine circule ensuite dans un système de tubules où elle subit deux modifications. La réabsorption tubulaire permet de récupérer certaines molécules de l'urine primitive, pour les réinjecter dans le sang. La sécrétion tubulaire assure l'élimination des déchets restant encore dans le plasma, en les faisant passer du sang vers les urines. Ce deuxième processus est médié par des récepteurs. Une fois débarrassée et enrichie de certaines molécules, l'urine devient l'urine définitive, qui sera éliminée du corps par miction.

L'urine est composée de nombreuses molécules, principalement d'eau et d'urée. Elle renferme également des cellules en faible quantité. Son étude a joué un rôle crucial dans le diagnostic de nombreuses pathologies tout au long de l'histoire de la médecine. On peut remonter à plus de 6 000 ans en arrière, à l'Antiquité, où l'examen visuel des urines permettait de diagnostiquer certaines maladies¹⁰⁰. On parlera alors d'uroscopie. Hippocrate, considéré comme le père de la médecine, a consacré des volumes entiers de *Corpus hippocratique* à l'analyse de l'urine. Il est parmi les premiers à décrire la présence de bulles à la surface des urines fraîches comme un signe de maladie rénale à long terme et associe les sédiments urinaires à la fièvre¹⁰¹. On retrouve aussi des textes de Galien, médecin grec de l'Antiquité, qui décrivent des anomalies de la miction.

Le premier manuscrit consacré exclusivement à l'urine est apparu au VII^e siècle. On y décrit, pour la première fois, la présence anormale d'une forte concentration en protéine dans les urines. L'uroscopie atteint son apogée au XIII^e, grâce à l'observation de la couleur, du goût, de l'odeur, du touché ou encore de la présence de dépôt dans les urines. Au Moyen Âge, l'uroscopie et la prise du pouls étaient, sauf rares cas, les deux principaux moyens utilisés par les médecins pour poser un diagnostic et faire un pronostic¹⁰². Ces deux analyses étaient par ailleurs en conflit, les médecins se disputant pour définir la meilleure des deux. Il faut attendre le XIV^e siècle pour que l'uroscopie l'emporte ; d'après Actuarius, « *l'urine place tout sous nos yeux tandis que le pouls subordonne tout au toucher. Il semble plus facile de juger sur ce que l'on voit que d'après ce que l'on touche.* »¹⁰³ L'uroscopie devint alors le test principal pour établir des diagnostics. L'uroscopie est désormais utilisée pour les siècles qui ont suivi. C'est d'ailleurs à partir du goût sucré des urines que Thomas Willis, au XVII^e, décrit pour la première fois le diabète comme une infection du sang caractérisée par le passage de sucre du sang vers les urines. Il établit également un lien entre le diabète et les différentes classes socio-économiques¹⁰⁴. L'uroscopie évolue

Introduction

avec les siècles jusqu'à la médecine moderne, tout en permettant le développement de nouveaux domaines comme la néphrologie.

Ainsi, l'analyse des urines a été l'une des premières techniques d'analyse pour établir un diagnostic. À ce jour, elle reste encore un outil important pour obtenir des informations sur l'état de santé de la personne.

3.1 Prélèvement des urines

L'urine étant un liquide très instable hors du corps¹⁰⁵, il est primordial de la manipuler et de la stocker dans des conditions optimales afin d'en extraire le maximum d'information. La première miction du matin est considérée comme idéale pour les analyses. L'urine accumulée tout au long de la nuit est plus concentrée en substances, ce qui augmente les chances d'observer une potentielle anomalie et permet de déterminer la capacité de concentration des reins. Cependant, la collecte des urines peut être faite à d'autres moments, parfois plus adaptée à une recherche spécifique. Il est impératif d'analyser les urines le plus rapidement possible après leur prélèvement, en raison de l'instabilité de certains composants, comme des cellules, des cylindres urinaires ou des cristaux¹⁰⁵. L'échantillon peut être conservé au maximum 24h à 4 °C, la réfrigération permettant de ralentir le processus de décomposition. Une fois ces 24h passées l'échantillon n'est plus analysable.

Il existe deux méthodes pour obtenir un échantillon d'urine.

3.1.1 La collecte non invasive

Il s'agit de la technique la plus couramment utilisée. Elle consiste simplement à récupérer une miction spontanée. Il est très important de réaliser le prélèvement dans des conditions stériles afin de ne pas rajouter une contamination extérieure. La miction est normalement recueillie directement dans un récipient stérile refermable par le patient qui a pris soin de respecter autant que possible les règles d'hygiène de la zone urétrale. Entre 15 et 30 mL d'urines sont nécessaires pour une analyse précise. Une fois l'échantillon récupéré, il est directement envoyé au laboratoire d'analyse. Il s'agit donc d'une méthode facile à mettre en place, normalement indolore (sauf si douleurs lors de la miction) et qui peut être prise en charge très rapidement.

3.1.2 La collecte invasive

Lorsque le patient est dans l'incapacité de coopérer (incontinence urinaire, ulcération urétrale externe, trop jeune ou tout simplement inconscient), un cathétérisme urétral ou une ponction vésicale sus-pubienne peuvent être nécessaires. Récupérer les urines directement dans la vessie permet d'obtenir

Introduction

un échantillon dépourvu de toute contamination extérieure. Malheureusement, ces méthodes de prélèvements peuvent elles-mêmes introduire des agents pathogènes responsables d'infections urinaires.

3.1.2.1 Le cathétérisme urétral

Un cathéter flexible est introduit dans la vessie en passant par l'urètre (**Figure 22**). Bien que réalisée sous anesthésie, cette technique reste très inconfortable pour le patient.

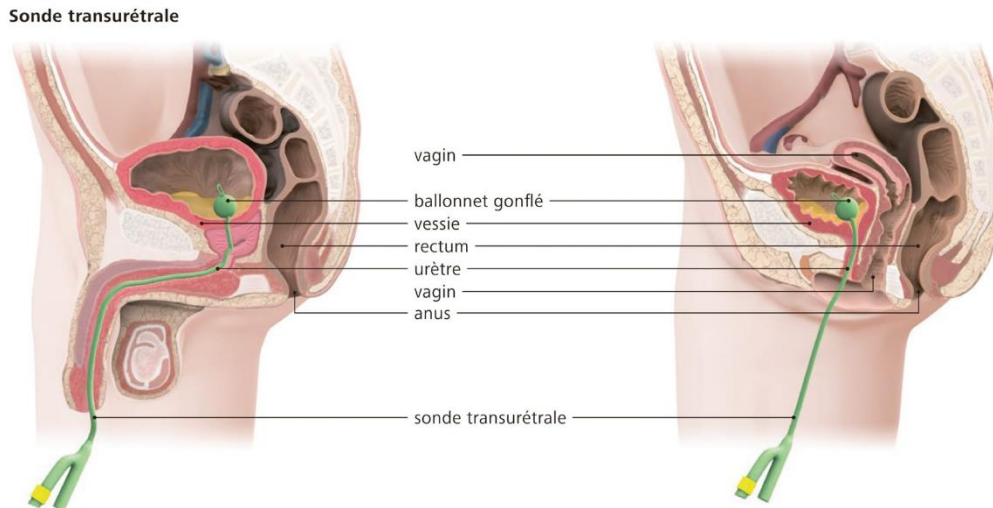


Figure 22 : Cathétérisme urétral chez l'homme et la femme. Adapté de <https://community.paraplegie.ch>

3.1.2.2 La ponction vésicale sus-pubienne

Les urines sont prélevées à l'aide d'une aiguille qui traverse directement la région sus-pubienne (**Figure 23**). Il s'agit, pour le patient, de la technique la plus invasive et la plus inconfortable, même si elle est également réalisée sous anesthésie. Elle peut, en outre, générer de faux positifs dans les cas de contamination sanguine (protéines, globules rouges et blancs) lors du passage de l'aiguille dans les tissus. Elle n'est utilisée que si toutes les techniques précédentes ont été infructueuses¹⁰⁶.

Une fois l'échantillon obtenu, quelle que soit la méthode, il peut être analysé.

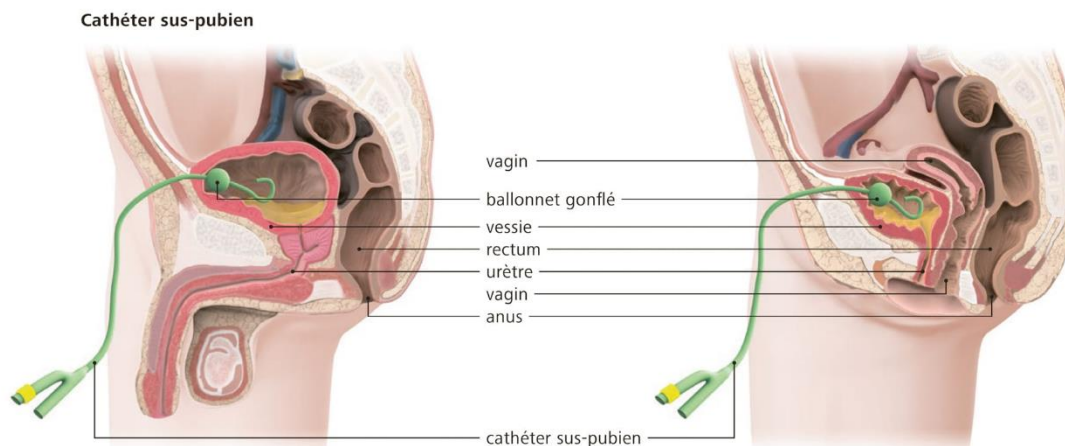


Figure 23 : Ponction vésicale sus-pubienne chez l'homme et la femme. Adapté de <https://community.paraplegie.ch>

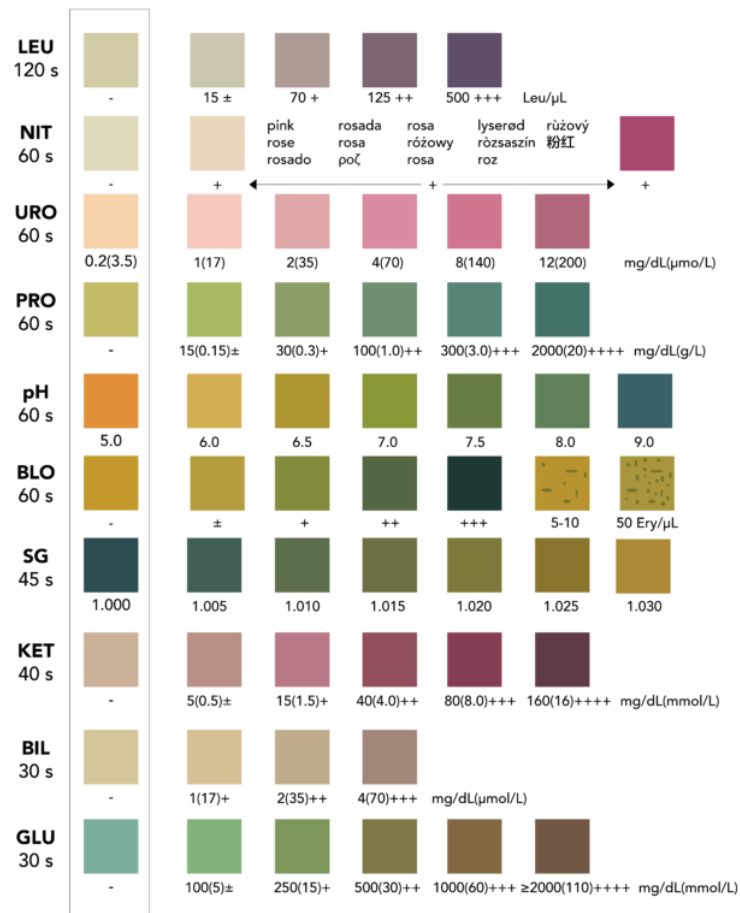


Figure 24 : Exemple des tests et des résultats colorés retrouvés sur les bandelettes multi-usages urinaires. En comparant la couleur de chaque carré à cette échelle, il est possible d’avoir une idée de la concentration, de la présence ou de l’absence de certains éléments. *Adapté de <https://www.exacto.fr/produits/tests-pro/test-urinaire-uritop/>*

3.2 Analyse physique des urines

L’analyse des paramètres physiques des urines est la première réalisée. Elles concernent la couleur, la transparence, l’odeur, le volume, la densité et le pH des urines. La modification de ces paramètres est intéressante à noter, mais reste très peu significative dans la conclusion du diagnostic. Contrairement à l’analyse chimique et microscopique des urines, capable de donner beaucoup plus d’informations.

3.3 Analyse chimique et microscopique des urines

Plusieurs tests chimiques et/ou enzymatiques, souvent présentés sous forme de bandelettes, permettent de déterminer indirectement la présence éventuelle de certaines cellules (san-

guines, immunitaires ou micro-organismes), mais également la présence anormale de diverses molécules. Les bandelettes urinaires sont des moyens de dépistage simples, rapides et efficaces des anomalies urinaires et permettent d’effectuer des tests quantitatifs sur les principaux paramètres (**Figure 24**), entre autres : pH, glucose (GLU), corps cétoniques (KET), leucocytes (LEU), nitrites (NIT), protéines (PRO), hématies (BLO), urobilinogène (URO) et pigments biliaires (BIL). Elles indiquent également la densité des urines (SG). Un test positif sur bandelette se manifeste généralement par la formation d’un composé coloré, plus ou moins foncé selon la concentration de la molécule recherchée.

L’analyse microscopique des urines permet d’observer tous les composants non solubles de l’urine (cellules, cristaux ou tubes). Elle peut confirmer une analyse par bandelette en donnant davantage d’informations, mais elle peut aussi participer au premier diagnostic.

Introduction

Connaitre et déterminer précisément les constituants de l'urine est très important dans le diagnostic de nombreuses maladies. Une multitude de composés peuvent être retrouvés dans les urines, qu'ils soient cellulaires ou non.

3.3.1 Les composés non cellulaires retrouvés dans les urines

Dans les urines, des composants non cellulaires sont facilement identifiables par dosage (protéines ou glucose), par des tests en bandelettes (corps cétonique, bilirubine et ses produits de dégradations et protéines) ou par microscopie (cristaux et tubes).

3.3.2 Les composés cellulaires retrouvés dans les urines

La présence de tous les composés cellulaires est importante pour établir un premier diagnostic. Cependant, l'analyse de la présence de cellules dans les urines permet de confirmer ou d'affiner le diagnostic.

De nombreuses cellules peuvent être retrouvées dans les urines comme les cellules sanguines (hématies et leucocytes), des micro-organismes (bactéries, champignons ou parasites) ou des cellules épithéliales. Généralement, en dessous d'une certaine quantité, leur simple présence n'est pas signe de maladie à l'exception de la présence de microorganismes strictement pathogènes ou de parasites.

3.3.2.1 Les cellules sanguines

Les urines renferment des cellules sanguines et plus particulièrement des hématies et des leucocytes. La présence de quantités anormales de globules rouges ou de globules blancs dans les urines est nommée respectivement hématurie et leucocyturie.

3.3.2.1.1 L'hématurie

L'hématurie, accompagnée ou non de douleurs, est un des symptômes les plus inquiétants pour le patient. Elle peut résulter d'une atteinte des reins, des uretères, de la vessie, de la prostate ou de l'urètre. Bien qu'impressionnante, elle n'est pourtant pas toujours signe de maladie, même si elle fait partie des premiers symptômes de nombreuses maladies comme le CV. La présence d'hématies dans les urines peut être déterminée visuellement et validée par deux méthodes : un test chimique en bandelette (**Figure 24**) et une analyse microscopique.

L'hématurie d'origine urologique est provoquée par une lésion anatomique des vaisseaux sanguins reliant un conduit urinaire, lors d'infections urinaires ou cystites hématuriques, par des cancers de la vessie, du rein ou de la prostate, par une lithiase rénale (rarement vésicale) ou une prostatite aiguë¹⁰⁷.

L'hématurie d'origine rénale est le plus souvent due à une maladie du glomérule. Il peut s'agir d'une anomalie congénitale (syndrome d'Alport), de lésions acquises ou de mécanismes encore mal connus

Introduction

provoquant le passage des globules rouges dans les urines (maladie de Berger). On y distingue facilement des cylindres hématiques et des hématies dysmorphiques¹⁰⁸. Les mictions des maladies glomérulaires sont généralement indolores contrairement aux hématuries d'origine urologique¹⁰⁷.

Il existe aussi des maladies non glomérulaires qui sont provoquées par des néphrites tubulo-interstitielles (lésions primitives des tubules rénaux) ou des HTA rénovasculaires (occlusions partielles ou complètes d'une ou plusieurs artères rénales)¹⁰⁸. À la différence des maladies glomérulaires, il n'y a pas de cylindres hématiques ou d'hématies dysmorphiques. Une étude plus approfondie des fonctions rénales permet de différencier une maladie non glomérulaire d'une hématurie d'origine urologique.

3.3.2.1.2 La leucocyturie

Comme les hématies, les leucocytes sont présents naturellement en petite quantité dans les urines. L'augmentation de leur présence est le signe d'une inflammation, généralement liée à une infection. Les deux mêmes méthodes que celles utilisées pour analyser l'hématurie permettent de valider la présence de leucocytes dans les urines (**Figure 24**).

3.3.2.2 Les micro-organismes

Il est possible de retrouver de nombreux agents pathogènes dans les urines et plus habituellement des bactéries, mais aussi des champignons ou des parasites.

3.3.2.2.1 Les bactéries

La vessie, comme cela a été prouvé, contient une flore bactérienne endogène. Il est donc normal d'y trouver des bactéries et les cellules sanguines¹⁰⁹. Cependant, quoique les urines ne puissent être considérées comme stériles dans ce cas, la recherche de bactéries reste essentielle lors de troubles du tractus urinaire, en particulier lorsqu'un nombre important de cellules immunitaires a été détecté. L'analyse bactériologique des urines permet alors le diagnostic des infections urinaires (IU).

Les IU sont classées en fonction de la localisation de l'infection. Les IU situées dans la vessie sont des cystites, celles des reins, des pyélonéphrites et celles de la prostate, des prostatites. Les bactéries responsables d'IU ont été largement étudiées et seulement quelques espèces sont considérées comme uropathogènes. La bactérie la plus fréquemment retrouvée est *Escherichia coli* représentant environ 70 % de toutes les IU¹¹⁰. Les autres bactéries responsables d'IU sont *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp* et *Enterococcus faecalis*. Dans des conditions normales, les urines contiennent uniquement des nitrates et pas de nitrites. Or, en présence de bactéries pathogènes, les nitrates sont réduits en nitrites. La présence de nitrite dans les urines est donc un indicateur clair d'une IU. Ce test peut être fait facilement avec une bandelette¹¹¹ (**Figure 24**). Cependant, certaines bactéries ne réduisent pas les nitrates, un résultat négatif n'exclut donc pas la possibilité d'une infection urinaire.

Introduction

Un test de nitrites positif (et négatif si inflammation) est généralement suivi par une analyse microscopique des urines puis par un examen cyto bactériologique des urines (ECBU) avec antibiogramme.

3.3.2.2.2 Les champignons

Les IU causées par des champignons sont en grande partie attribuables à la levure *Candida* spp. et plus particulièrement à *Candida albicans* que l'on retrouve dans nos flores endogènes. D'autres mycètes peuvent être impliqués dans des IU telles que *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp, *Mucoraceae* spp, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces* spp, *Coccidioides immitis*¹¹². Ces champignons infectent généralement le tractus urinaire au cours d'une mycose systémique ou disséminée.

Les symptômes de l'infection par un champignon étant semblables à ceux des infections bactériennes, les mêmes tests diagnostiques seront réalisés¹¹³.

3.3.2.3 Les parasites

Même s'ils sont peu nombreux, certains parasites ont un tropisme pour le système urinaire. Parmi ces parasites on retrouve la bilharziose urinaire, également appelée schistosomiase (parasitose causée par des vers trouvés en zones tropicales), l'hydatidose (parasitose provoquée par une forme larvaire du tænia du chien, transmise à l'homme), le *diroctophyme rénal* (parasite capable d'infecter les reins des mammifères). Ces parasites peuvent être détectés grâce à une analyse microscopique des urines^{114,115}.

3.3.2.4 Les cellules épithéliales

Trois types de cellules épithéliales sont le plus souvent retrouvées dans les urines : les cellules tubulaires rénales, les cellules pavimenteuses et les cellules de l'urothélium. Elles sont toutes détectables uniquement par analyse microscopique.

3.3.2.4.1 Les cellules tubulaires rénales

Les cellules tubulaires rénales se trouvent normalement en faible quantité dans les urines. Leur présence est principalement due à une exfoliation et/ou une desquamation du tissu provoquée(s) par la sénescence et/ou l'apoptose des cellules en fin de cycle qui sont éliminées dans les urines. Cette exfoliation peut aussi être la conséquence d'une atteinte du système urinaire. On distingue deux types de cellules rénales : les cellules du tubule contourné proximal (CTCP) et les cellules du tube collecteur (CTCoI).

Les CTCP sont plutôt rares dans les urines et peuvent ressembler à des cylindres granuleux. Par ailleurs, elles sont rarement intactes dans les urines en raison de la pression osmotique des urines.

Les CTCoI sont plus fréquentes dans les urines. Si le nombre de cellules exfoliées augmente, on peut aussi les retrouver sous forme de cylindres de cellules.

Introduction

L'augmentation anormale du nombre de cellules rénales est le signe clinique d'une atteinte des tubules, surtout si les cellules retrouvées sont nécrosées et accompagnées de fragments d'épithélium rénal. C'est notamment le cas de la nécrose tubulaire aiguë, du rejet d'un greffon rénal, de la papillite nécrosante, d'une intoxication aux métaux lourds, d'une thrombose des veines rénales ou d'un infarctus rénal^{105,116}.

3.3.2.4.2 Les cellules pavimenteuses

Les cellules pavimenteuses présentes dans les urines ne proviennent généralement pas des voies urinaires, quoique l'on retrouve des cellules pavimenteuses dans le dernier tiers de l'urètre. Ces cellules sont essentiellement retrouvées dans les urines de la femme à cause des sécrétions vaginales ; leur présence est en très grande partie le signe d'une contamination. Dans de très rares cas, en particulier si la personne est âgée, leur présence peut être le signe d'un carcinome épidermoïde. Une deuxième analyse d'urines est alors demandée afin de confirmer ou non la contamination^{105,117}.

3.3.2.4.3 Les cellules de l'urothélium

L'urothélium tapissant une grande partie des voies urinaires et présentant un taux important de renouvellement, il est normal d'observer un grand nombre de CUR dans les urines. On y retrouve facilement les cellules des différentes couches qui composent l'urothélium, en particulier les cellules urothéliales superficielles et intermédiaires qui sont le plus en contact avec les urines. Les cellules urothéliales profondes sont normalement peu présentes, sauf après une activité modérée/sportive. Une augmentation anormale de ces cellules est souvent le signe d'une pathologie inflammatoire, en particulier dans le cas des TCC. La cytologie urinaire est le premier test réalisé dans le dépistage de TCC.

Aujourd'hui, la biopsie liquide est le type d'analyse des urines le plus utilisé pour la détection des CV. Il fait partie des tests de routine pour un premier diagnostic. Cette biopsie est capable de fournir de nombreuses informations grâce à l'analyse des cellules de l'urothélium au microscope, appelée cytologie urinaire.

4 Le diagnostic

La première étape de la détection du CV est l'observation d'une hématurie indolore⁸⁸, symptôme le plus courant avec les mictions douloureuses. Ces symptômes peuvent également être dus à d'autres pathologies comme le cancer du rein ou de la prostate, une cystite interstitielle, des calculs rénaux, l'hyperplasie bénigne de la prostate ou un traumatisme de la vessie¹¹⁸.

Différents tests peuvent être utilisés à ce stade afin d'affiner le diagnostic.

4.1 La cytologie urinaire

En cas de suspicion de CV, plusieurs tests existent dont la cytologie urinaire et la cystoscopie qui sont, à l'heure actuelle, les seules méthodes capables de distinguer les carcinomes agressifs des lésions non invasives et indolentes. La cytologie urinaire consiste en une observation microscopique des cellules présentes dans l'urine du patient après coloration de l'échantillon au Papanicolaou. Les échantillons sont analysés par l'anatomopathologiste, selon les directives du Système de Paris¹¹⁹.

4.1.1 Coloration au Papanicolaou

La coloration au Papanicolaou est une technique histologique multichromatique développée par George Papanicolaou¹²⁰, composée de trois colorants capables de marquer de façon distincte les différents composants de la cellule.

- L'hématoxyline de Harris est un colorant naturel qui a une grande affinité pour les chromatines nucléaires et qui se fixe aux groupes sulfates de l'ADN, donnant une couleur bleue au noyau de la cellule.
- L'orange green 6 (OG 6) est un contre-colorant (colorant de contraste) acide qui possède une grande affinité avec la kératine et colore le cytoplasme des cellules kératinisées. Il peut aussi colorer les granules des cellules éosinophiles superficielles. La kératine n'est pas présente dans les cellules épithéliales squameuses saines contrairement aux cellules épithéliales squameuses cancéreuses¹²¹. Ce colorant est donc très important pour l'orientation d'un diagnostic.
- L'Éosine-Azure 50 (EA 50) est un contre-colorant polychromique qui combine l'éosine Y et vert lumière SF yellowish¹²¹.
 - L'éosine Y est un colorant acide qui colore principalement le cytoplasme des cellules squameuses superficielles, les nucléoles, les érythrocytes et les cils cellulaires. La coloration peut aller du rouge profond à jaunâtre¹²¹.
 - Le vert lumière SF yellowish est un colorant acide qui colore en vert le cytoplasme des cellules métaboliquement actives, squameuses intermédiaires, parabasales et

Introduction

cylindriques, les histiocytes, les leucocytes, les cellules de carcinome indifférencié à grandes et petites cellules et les cellules dérivées d'adénocarcinome¹²¹.

Ces différents colorants permettent de détecter un grand nombre de cellules et leurs composants en fonction de leur couleur. Les cellules acidophiles seront rouges, les basophiles, bleu-vert, les hématies, rouges orangés à violets foncés, les kératines, oranges/rouges, les cellules superficielles, violettes, les intermédiaires et basales, bleues/vertes, les cellules éosinophiles, rouge orangé et les cellules métaplasiques, bleues/vertes et violettes.

Cette coloration est utilisée pour différencier les cellules dans les préparations de frottis de diverses sécrétions corporelles, comme dans l'analyse de frottis gynécologiques, des expectorations, de l'urine, du liquide céphalorachidien, du liquide abdominal, du liquide pleural, du liquide synovial, du liquide séminal, de petites biopsies à l'aiguille d'organes et de tissus et bien d'autres matériaux contenant des cellules¹²². La coloration Papanicolaou est considérée comme une technique très fiable et peut être utilisée dans l'étude morphologique des spermatozoïdes, dans le diagnostic du cancer du vagin, de l'utérus, du col utérin ou des cancers urothéliaux. Dans le cas des cancers urothéliaux, l'analyse cytologique est basée sur le système de Paris.

4.1.2 La classification : le Système de Paris

Depuis les premières colorations de Papanicolaou dans le cadre d'analyse des cytologies urinaire, au milieu du XX^e, la classification des cellules a évolué. Pour uniformiser la lecture, le système de Paris a été mis en place par un consortium de spécialistes dans le domaine de l'urologie (cytopathologistes, cytotechniciens, anatomopathologistes, chirurgiens urologues...) pour définir, décrire et codifier un échantillon d'urine¹¹⁹. Leur objectif principal a été de normaliser la terminologie pour la déclaration de la cytologie urinaire en fonction de l'histopathologie et des résultats cliniques, tout en s'appuyant sur la littérature médicale et les données des études scientifiques existantes. L'ensemble de ce système a été construit avec pour « but ultime », la détection par la cytologie urinaire du CU de haut grade (CUHG)¹¹⁹ en déterminant clairement les cellules dites négatives pour le CUHG, les cellules urothéliales atypiques (CUA), les suspicions de CUHG, les CUHG, les CU de bas grade (CUBG) et les autres tumeurs (malignes, métastatiques et/ou lésions diverses).

4.1.2.1 *Les cellules négatives au cancer urothélial de haut grade*

Cette catégorie exclut les cellules normales et comprend uniquement les cellules altérées qui ne présentent aucun risque significatif pour le patient de développer un CUHG. Il s'agit de toutes les CUR ayant une altération morphologique particulière reconnue et non associée à une malignité (**Figure 25**).

L'échantillon est qualifié, dans le système Paris, de négatif ou de bénin si l'un des composants suivants est présent dans l'échantillon¹²³ :

Introduction

- Des cellules bénignes ou inflammées urothéliales, squameuses et glandulaires
- Des fragments et/ou des amas bénins de tissu urothélial
- Des cellules séminales
- Des altérations provoquées par la présence d'un calcul, un effet cytopathique viral, notamment par le virus du polyome (sauf en présence de cellules atypiques), par une infection, un effet post-traitement des instillations vésicales ou d'une maladie non associée à la vessie (irradiation pelvienne pour d'autres cancers, chimiothérapie systémique pouvant affecter l'urothélium ou une immunothérapie) ou des altérations liées à l'urine.

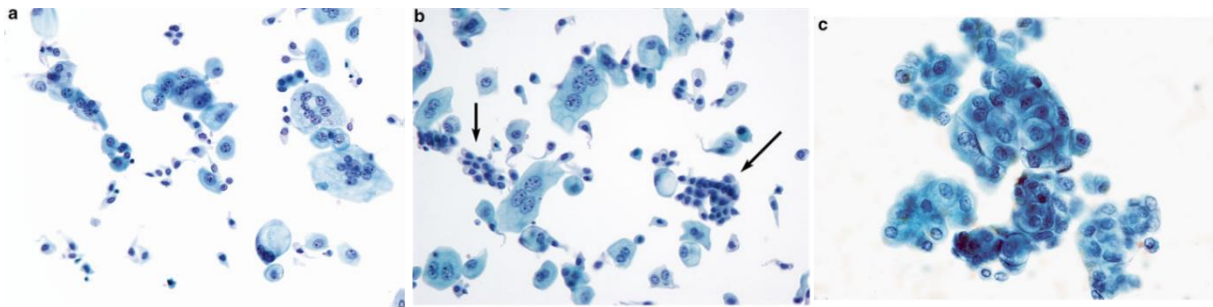


Figure 25 : Exemple de cellules urothéliales superficielles négatives. a) Le cytoplasme des grandes cellules superficielles est très et abondant. Les noyaux ont une chromatine finement granuleuse et pâle. Les nucléoles peuvent être proéminents, mais ne reflètent aucune anomalie. La multinucléation est fréquente, surtout dans les échantillons instrumentés. b) En plus des cellules superficielles, des amas de cellules plus petites sont visibles (flèches). Les noyaux sont plus sombres et légèrement plus petits que dans les cellules superficielles, mais les formes nucléaires sont rondes, les membranes nucléaires sont lisses et l'architecture est uniforme. Les ratios noyau/cytoplasme sont élevés en raison de la faible quantité de cytoplasmes de chaque cellule. c) Il s'agit de fragments de tissu. Leur caractère nucléaire et cytoplasmique est le même que celui des autres cellules superficielles, mais en plus, les cellules possèdent ici un bord cytoplasmique épaissi qui ne fait pas tout le tour de la cellule. Ceci constitue la membrane unitaire asymétrique recouvrant la vessie et assurant une barrière entre l'urine toxique et le sang. *Adapté de Rosenthal et al.* ¹²³

Chaque caractéristique de ces composants est détaillée avec le plus de précisions possible dans le Système de Paris afin d'éviter de classer comme « atypiques » trop de cellules présentant une morphologie anormale non identifiable. En effet, il est important de pouvoir identifier et classer le maximum de cellules présentant des altérations et négatives au CUHG. Seules les cellules difficiles à diagnostiquer sont répertoriées dans la catégorie des CUA. Il est espéré, grâce au Système de Paris, en avoir le moins possible.

Par ailleurs, une cytologie négative ou bénigne au CUHG peut révéler, après biopsie, un CUBG ou un CUHG. Plusieurs études ont montré que, selon les études, sur les 3,4 à 6,2 % des cytologies négatives ou bénignes qui ont donné lieu à une biopsie, 32,2 à 68,9 % étaient finalement positives pour un CUBG ou un CUHG¹²⁴⁻¹²⁶.

4.1.2.2 Les cellules urothéliales atypiques

Les CUA regroupent toutes les cellules non conformes à un type ou à un modèle de référence (la cellule négative). Ce terme a été introduit pour la première fois par le père du cytodagnostic moderne, le Dr George N. Papanicolaou pour caractériser une très faible suspicion de malignité¹²⁷. Cette catégorie est

Introduction

généralement utilisée lorsque l'échantillon ne peut être identifié comme bénin ou malin. Face à l'absence de critères diagnostics fiables et bien définis, le diagnosticien n'est pas en mesure de donner une réponse définitive. Dans le Système Paris, la classe des CUA comprend les échantillons renfermant des CUR avec des atypies cytologiques (non architecturales) légères à modérées ou des cellules présentant une morphologie plus anormale que celle des cellules négatives¹²⁸. Il faut que ces atypies ne soient dues qu'à des altérations morphologiques particulières reconnues et non associées à une malignité. Cette catégorie comprend également les échantillons mal conservés ayant subi une dégénérescence cellulaire, rendant l'interprétation extrêmement difficile.

Les cellules sont considérées comme CUA lorsqu'elles présentent un critère majeur et un unique critère mineur (**Figure 26**).

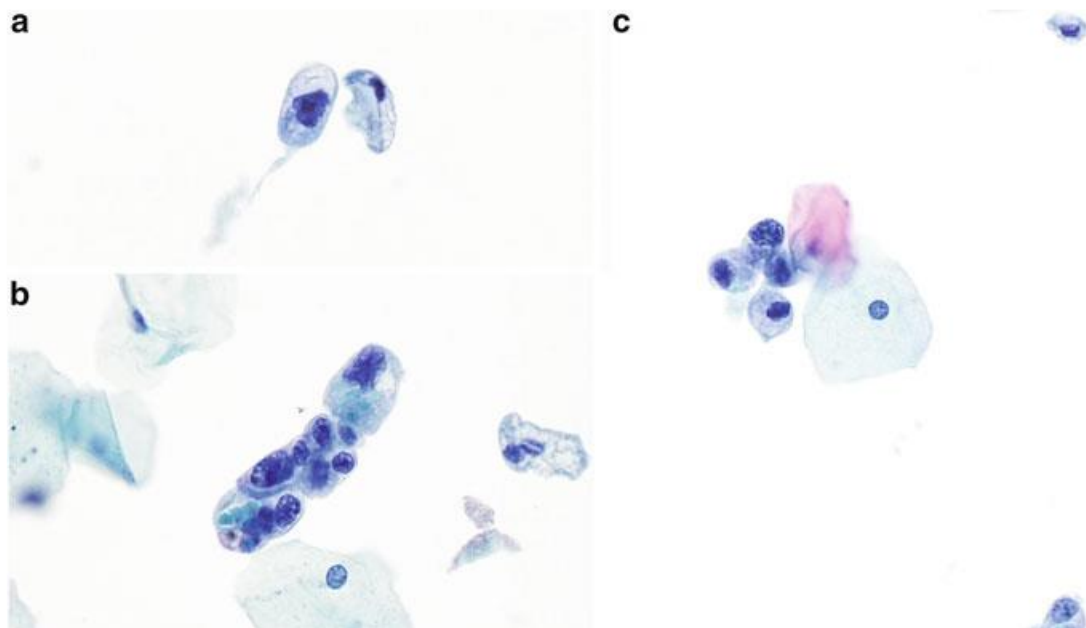


Figure 26 : Exemple de cellules urothéliales atypiques avec des rapports N/C élevés, et des noyaux hyperchromies nucléaires chez une patiente de 36 ans. a) AUC, la CUR présente des contours nucléaires irréguliers. **b)** Groupe de cellules urothéliales présentant des contours nucléaires très irréguliers et des variations de taille nucléaire. Par rapport aux cellules malpighiennes voisines, on observe une légère hyperchromie nucléaire. Il y a des changements cellulaires dégénératifs, tels que la perte partielle du cytoplasme et la perte de détails nucléaires nets. **c)** Petit agrégat de cellules urothéliales atypiques adjacentes aux cellules malpighiennes. Les noyaux des cellules urothéliales présentent également une dégénérescence, mais la cellule présentant un rapport N/C élevé est inquiétante pour un carcinome. La patiente est une femme de 36 ans avec une urolithiase (calculs) récurrente, et sans antécédents de carcinome urothélial. Son âge et ses antécédents sont des facteurs à faible risque de cancer de la vessie. Par conséquent, ces caractéristiques cytologiques justifient le diagnostic AUC. *Adapté de Barkan et al.*¹²⁸

Le critère majeur est défini par des cellules urothéliales non superficielles et non dégénératives avec un ratio noyau/cytoplasme (N/C) supérieur à 0,5 ; c'est-à-dire caractérisé par une augmentation de la taille du noyau.

Les critères mineurs comprennent une hyperchromie nucléaire, une membrane nucléaire irrégulière (bord chromatique ou contour nucléaire) ou une chromatine irrégulière, grossière et agglutinée.

Introduction

Ces critères ne sont pas valables pour les cellules intermédiaires et basales. Même si elles présentent un ratio N/C supérieur à 0,5 et une légère hyperchromatie, elles seront identifiées comme « normales » ou négatives.

Il a été prouvé que la présence importante de CUA pouvait être corrélée avec la confirmation d'un CUHG¹²⁹, mais ce diagnostic reste assez aléatoire dans de nombreuses études qui montraient que le risque de détecter un CUHG après un diagnostic de CUA variait entre 8,3 et 37,5 %¹²⁸. Cette catégorie n'a pas vocation à perdurer. Plus il y aura de connaissances sur la présence de cette atypie et plus il sera possible de classer la cellule dans la catégorie bénigne, malin ou suspect.

4.1.2.3 Les suspicions de CUHG

Les cellules présentes dans cette catégorie sont des cellules avec des atypies sévères qui ne permettent pas de poser un diagnostic CUHG, mais qui vont au-delà des atypies associées à la catégorie CUA. Il s'agit donc d'une catégorie intermédiaire entre les CUA et les CUHG. Cette catégorie permet d'éviter que des cellules soient qualifiées de cellules atypiques simples par le clinicien, tout en gardant un certain niveau d'incertitude et de préoccupation. Cette catégorie se définit comme étant « un diagnostic utilisé de manière restrictive dans les cas de CUR anormales qui, quantitativement, ne permettent pas de poser un diagnostic définitif de CUHG »¹³⁰.

Le diagnostic se base sur la présence de cellules urothéliales non superficielles et non dégénératives qui présentent les deux critères majeurs et au minimum un des critères additionnels. D'autres caractéristiques observables, non obligatoires, peuvent compléter le diagnostic. Les critères de diagnostic requis sont une augmentation du ratio N/C d'au moins 0,5 à 0,7 et une augmentation modérée à sévère d'une hyperchromie. Les critères de diagnostic additionnels comprennent la présence d'une chromatine irrégulière et agglomérée et celle de membranes nucléaires marquées et irrégulières (**Figure 27**).

Les critères observables non obligatoires peuvent être un emplacement excentrique du noyau, un fond nécrotique, un pléomorphisme, des mitoses et la présence de corps apoptotiques.

Lorsque l'échantillon renferme entre 1 et 10 cellules anormales, il est classé dans la catégorie de suspicion de CUHG ; au-delà l'échantillon est positif pour le CUHG. Il est important de prendre en compte les changements nucléaires anormaux observés par l'anatomopathologiste et les antécédents du patient. De manière générale, il est extrêmement rare (voir impossible) qu'un patient soit positif au CUHG avec moins de 5 cellules anormales. En revanche, si le patient a eu des antécédents de CUHG et/ou que son échantillon d'urine est d'excellente qualité (cellules bien conservées sans dégénérescence) et qu'il présente 5 cellules sévèrement anormales, le diagnostic pourra alors être considéré comme positif au CUHG (même s'il est recommandé d'avoir au moins 10 cellules)¹³⁰.

Introduction

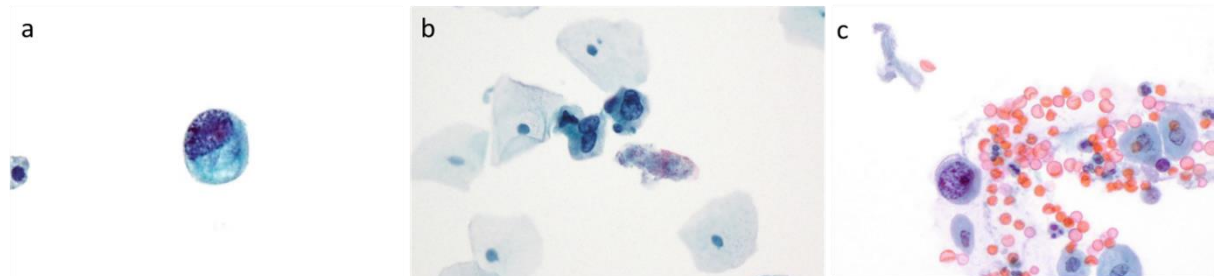


Figure 27 : Exemples de cellules classées suspicion de carcinome urothélial de haut grade. a) Une seule cellule urothéliale intermédiaire anormale et bien conservée présente un noyau excentrique avec un rapport N/C élevé, une hyperchromie, une chromatine irrégulière en amas et une membrane nucléaire légèrement irrégulière. **b)** Cellules urothéliales intermédiaires rares, mais anormales et bien conservées, présentant des rapports N/C accrus, une hyperchromie et des membranes nucléaires irrégulières. **c)** Une seule cellule urothéliale intermédiaire anormale et bien conservée présentant un rapport N/C élevé, une hyperchromie, une chromatine irrégulière et agglomérée, et des membranes nucléaires lisses et régulières. À noter l'hyperchromie sévère par rapport aux cellules urothéliales intermédiaires normales. *Adapté de Brimo et al.* ¹³⁰

Selon les études, après un diagnostic de suspicion de CUHG, le risque de détecter par biopsie une lésion urothéliale de haut grade après 6 mois ou moins peut varier de 37,8 à 79 % entre le diagnostic cytologique et le diagnostic histologique^{131,132}. Au-delà de 6 mois, ces valeurs peuvent atteindre 95 %¹²⁶.

En comparaison, 86 % des patients diagnostiqués positifs ont développé un CUHG en moins de 6 mois et 90 % en plus de 6 mois alors que 79 % des patients ayant une suspicion de CUHG ont développé un CUHG en moins de 6 mois et 80 % en plus de 6 mois¹³².

Cette classe de « suspicion au CUHG », s'agissant de la possibilité de développer un CUHG, est peu fiable. Cependant, elle reste nécessaire afin de ne pas surévaluer ou sous-évaluer les cas de CUHG.

4.1.2.4 Les cellules positives au CUHG

Malgré les premières descriptions cytomorphologiques du CUHG décrites par George Papanicolaou, au milieu du XX^e siècle^{133,134} et leurs évolutions au cours des années, la caractérisation du CUHG a très peu changé.

Historiquement, les cellules du CUHG sont décrites comme ayant un rapport N/C supérieur à 0,7, un pléomorphisme nucléaire, une délimitation irrégulière du noyau et une hyperchromasie¹³⁵.

En plus de ces caractères majeurs, d'autres cellules peuvent se rajouter comme une agglutination grossière, un motif chromatidien homogène, des noyaux excentrés, la présence de cellules comètes, la présence de cellules « encre de Chine » (cellules uniques avec des noyaux noirs profonds sans structure), des mitoses, un pléomorphisme cellulaire, un cytoplasme dense, la présence de corps apoptotiques ou de nucléoles proéminents, ou une inflammation^{135,136} (**Figure 28**).

Toute cellule présentant les caractères historiques avec ou sans la présence de caractères supplémentaires est alors qualifiée de cellule maligne. Pour confirmer le diagnostic de CUHG, il est important que l'échantillon urinaire présente au moins entre cinq et dix cellules anormales, non dégénératives. Il a

été démontré que la présence dans les urines de cellules malignes isolées avec des nucléoles proéminents, un ratio N/C important et une nécrose étendue seraient le signe d'une maladie invasive¹³⁷.

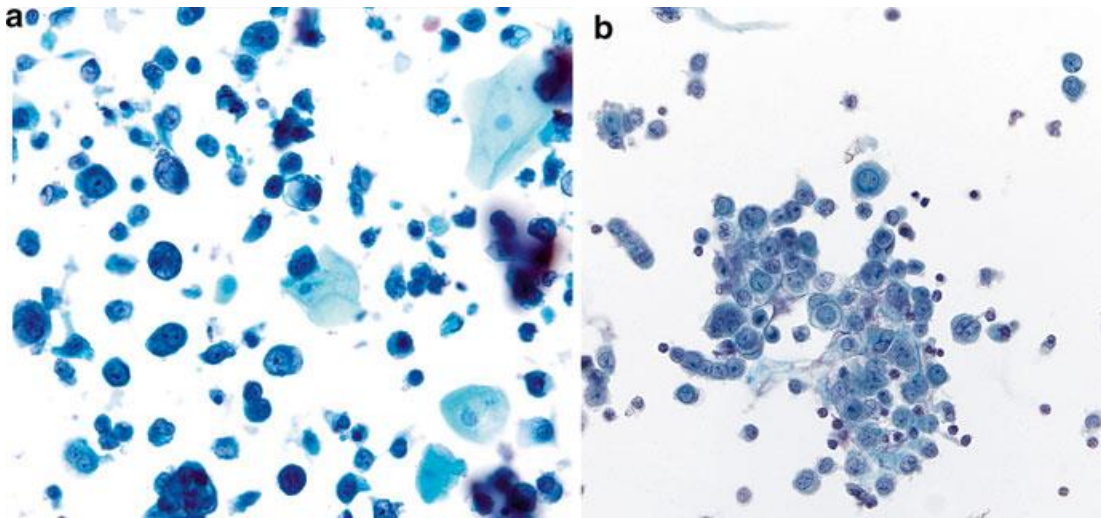


Figure 28 : Exemples de cellules positives au carcinome urothélial de haut grade. a) L'échantillon est hypercellulaire et montre de nombreuses cellules tumorales qui présentent un pléomorphisme et une nécrose en arrière-plan. **b)** L'échantillon était plein de ces cellules anormales avec des rapports N/C élevés et des profils nucléaires proéminents (les lymphocytes présents peuvent être utilisés comme témoins pour la taille des noyaux). Adapté de Siddiqui *et al.*¹³⁵

Cette classification est efficace pour détecter les cellules malignes du CV, du carcinome épidermoïde (cellules squameuses) et de l'adénocarcinome des cellules glandulaires. Quel que soit le type de cancer, les cellules malignes présentent toutes les caractéristiques précédemment citées. La distinction entre les cellules malignes squameuses et les autres cellules est effectuée grâce à la présence d'une kératinisation cytoplasmique et/ou de ponts intracellulaires. Pour les cellules malignes glandulaires, la distinction se fait par la présence de formations glandulaires (amas de cellules glandulaires).

4.1.2.5 Les cellules positives au cancer urothéliale de bas grade (CUBG)

Un des problèmes de la cytologie urinaire est l'extrême complexité à différencier une lésion de bas grade (LBG) de l'urothélium sain ; ce qui conduit à une mauvaise connaissance de leurs caractères morphologiques. Néanmoins, il a été possible de répertorier plusieurs LBGs en fonction de leurs caractéristiques (**Figure 29**). On distingue ainsi les papillomes urothéliaux, les tumeurs papillaires urothéliales à faible potentiel de malignité, les carcinomes papillaires de bas grade et les tumeurs plates de bas grade^{138,139}.

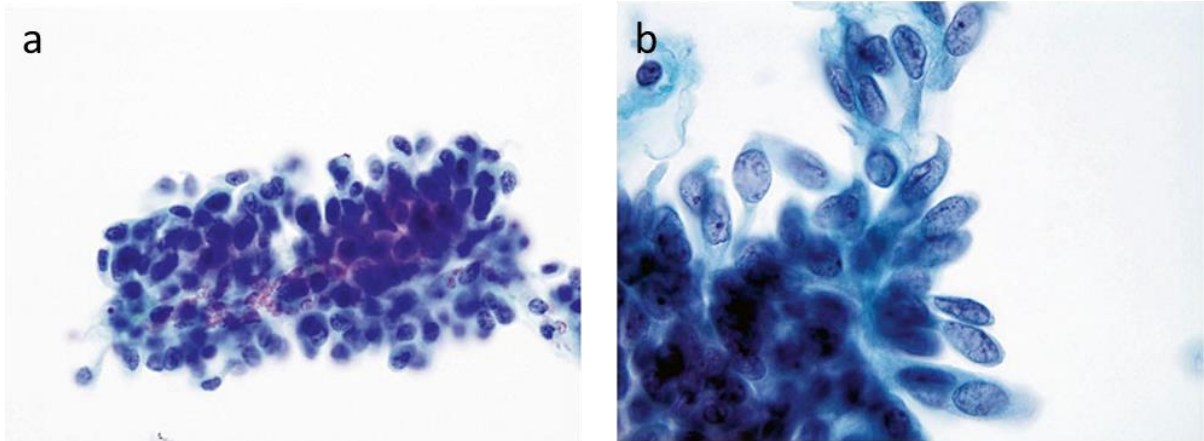


Figure 29 : Exemple de cellules négatives pour le CUHG avec un commentaire suggérant un CUBG. a) Une structure papillaire tridimensionnelle mal définie peut suggérer un CUBG. Pas de vaisseaux capillaires apparents. Présence d'un vaisseau sanguin induisant possiblement l'accumulation de globules rouges au milieu de l'amas. **b)** Un groupe de cellules composé de cellules urothéliales avec de légères atypies cytologiques présente un rapport nucléaire/cytoplasmique accru, des noyaux ovales avec des rainures occasionnelles et des bords nucléaires légèrement irréguliers. *Adapté de Wojcik et al. ¹³⁹*

4.1.2.5.1 Les papillomes urothéliaux

Les papillomes urothéliaux sont définis par un léger développement papillaire avec un noyau central fibrovasculaire composé de plusieurs couches indiscernables de celui de l'urothélium normal.

4.1.2.5.2 Les tumeurs papillaires urothéliales à faible potentiel de malignité

Ces tumeurs ressemblent aux papillomes urothéliaux, mais présentent une augmentation de l'épaisseur cellulaire de l'urothélium d'apparence normale, généralement supérieure à sept cellules. On ne distingue pas ou très peu d'atypies nucléaires, même si le noyau peut être légèrement plus large et allongé.

4.1.2.5.3 Les carcinomes papillaires de bas grade

Les carcinomes papillaires de bas grade (CPBG) sont généralement petits et confinés à l'urothélium sans invasion stromale. Ils sont caractérisés par de fines frondes papillaires avec des ramifications fréquentes, un aspect ordonné et de légères variations architecturales. Contrairement aux tumeurs papillaires urothéliales à faible potentiel de malignité, les CPBG présentent des atypies nucléaires légères, mais reconnaissables telles que des variations de polarité, de taille, de forme, de bordure nucléaire et de la structure chromatidienne. S'ils sont détectés, une simple résection locale est suffisante.

4.1.2.5.4 Les tumeurs plates de bas grade

Ces tumeurs plates ne présentent pas assez d'atypies et de modifications architecturales suffisantes pour être qualifiées de Tis, même s'il s'agit de lésions planes. Elles sont caractérisées par des lésions présentant une perte variable et souvent visible de polarité. Les noyaux des cellules peuvent présenter des bords irréguliers, une chromatine légèrement altérée, des nucléoles peu visibles et de rares mitoses.

Introduction

4.1.2.5.5 Harmonisation

La présence de ces quatre groupes complexifie la pose d'un diagnostic des LBGs. L'objectif du système de Paris a donc été d'harmoniser ces différentes catégories en ne différenciant plus ces entités dans les échantillons cytologiques des voies urinaires, mais en les regroupant — cela malgré l'extrême difficulté à distinguer une lésion de bas grade de l'urothélium normal.

Pour regrouper ces quatre catégories, le Système de Paris a mis en place, pour le CUBG, les critères diagnostics suivants¹³⁹ :

- Présence d'amas papillaires cellulaires tridimensionnels (définis comme des amas de cellules dont les noyaux se chevauchent et forment des « papilles ») avec des noyaux vasculaires, y compris des capillaires et sans noyaux fibrovasculaires
- Présence d'un nombre important de cellules monomorphiques

Bien que ces caractéristiques soient spécifiques aux CUBG, elles peuvent être retrouvées dans les CUHG. En l'absence d'autres caractéristiques, un CUBG sera diagnostiqué.

Des tumeurs non urothéliales, pourtant très rares, peuvent être présentes chez un patient malade. Le diagnostic cytologique d'un carcinome non urothélial (CNU) et leurs métastases pose souvent un défi diagnostique en raison de la forte ressemblance avec le CU.

4.1.2.6 Les autres tumeurs malignes/métastatiques/lésions diverses

De nombreuses autres cellules, n'étant pas liées à un CU, peuvent être retrouvées dans les urines. Si les CNU sont très rares, il est important de les diagnostiquer en recourant au système de Paris, les CNU étant très agressifs. Parmi les différentes lésions possibles qui ont été caractérisées par le système Paris dans une cytologie urinaire, on retrouve¹⁴⁰ :

- Les carcinomes des épithéliums pavimenteux
- Les adénocarcinomes
 - o Vésicaux et de l'ouraque (tractus urinaire)
 - o De la prostate, du colon, du rectum, et du col de l'utérus (hors tractus urinaire)
- Les tumeurs neuroendocrines (tumeurs carcinoïdes et carcinome neuroendocrines) du rein, de la prostate ou de la vessie.
- Plusieurs sarcomes :
 - o Des léiomyosarcomes (tumeurs musculaires lisses malignes)
 - o Des angiosarcomes (tumeur maligne de la paroi des vaisseaux sanguins ou lymphatiques)
 - o Des sarcomatoïdes de vessie (tumeurs épithéliale et sarcomateuse)

Introduction

- Des affections hématologiques malignes :
 - o Des lymphomes
 - o Des myélomes
 - o Des plasmocytomes
- Des mélanomes de la vessie
- Métastases du CV, du rein, du poumon, du sein, des ovaires, de l'estomac, de la peau et hématologiques
- Des tumeurs non épithéliales bénignes (paragangliome)
- Des lésions ressemblant à des tumeurs
 - o Les Adénomes néphrogénique (métaplasie néphrogénique)
 - o L'amyloïdose (groupe de maladies de la classe des protéinopathies)
 - o Les inflammations pseudotumorales

4.1.2.7 En conclusion

La cytologie urinaire, en plus d'être un test diagnostique facile à réaliser et peu coûteux, est plus simple à interpréter et présente une meilleure spécificité grâce à la normalisation par le Système de Paris. Ce test donne de bons résultats pour la détection des CUHG, à l'inverse des lésions de bas grade¹⁴¹ qui, comme précédemment décrites, sont extrêmement compliquées à identifier, même par l'anatomopathologiste. La sensibilité pour les CUBG est en moyenne de 37 %.

Étant donné le nombre non négligeable de faux négatifs, ce test est toujours utilisé en combinaison avec la cystoscopie pour confirmer le diagnostic.

4.2 La cystoscopie

La cystoscopie est le test diagnostique de référence pour la détection du CV. Elle fournit des informations sur la localisation, l'aspect, la taille et le nombre de tumeurs.

Elle est systématiquement réalisée parallèlement à la cytologie urinaire dans les cas de suspicion de CV⁹⁵. Cette méthode présente une bonne sensibilité, allant de 68,3 à 100 % selon les études. Les faux négatifs sont souvent dus à une erreur de l'opérateur ou à la difficulté de trouver la tumeur en raison de sa petite taille lorsqu'elle se trouve au stade de carcinome Tis. Cette méthode présente également une bonne spécificité (57 à 97 % selon les études)¹⁴².

La cystoscopie est une procédure endoscopique utilisée pour observer l'intérieur de la vessie. Il s'agit d'un test invasif qui entraîne une gêne pour le patient, une possible infection des voies urinaires et de l'anxiété^{95,142-144}.

Introduction

L'inconvénient de la cytologie urinaire combinée à la cystoscopie est leur faible efficacité pour détecter le CV à un stade précoce. En effet, la détection du CV à un tel stade pose un réel problème. Une détection précoce augmenterait la probabilité de guérison et le traitement serait moins coûteux. En effet, le traitement et la surveillance du CV le placent parmi les cancers les plus coûteux. Son coût oscille entre 47 500 US \$ pour un cancer métastasé et 14 300 US \$ au cours de la première année suivant le diagnostic, et peut atteindre plus de 172 000 US \$ pour un survivant à long terme¹⁴⁵.

Au cours des dernières années, de nombreux nouveaux tests ont été développés et commercialisés afin de détecter le CV le plus précocement possible et améliorer la spécificité du diagnostic et le suivi du patient. Ces tests sont tous des tests non invasifs qui visent à trouver des marqueurs tumoraux dans les urines. La cytologie urinaire et la cystoscopie n'en restent pas moins indispensables.

Il est important de noter que les études réalisées sur les différents tests diagnostiques sont indépendantes et leurs résultats sont comparés avec ceux de la cytologie urinaire et de la cystoscopie. Les valeurs de la cytologie et de la cystoscopie peuvent varier en fonction des études. Dans un souci de clarté, un tableau des valeurs de sensibilité et de spécificité de chaque test est consultable en annexe de la revue.

4.3 Les biomarqueurs urinaires

4.3.1 La détection de l'antigène BTA par les tests BTA-TRAK™ et BTA-STAT™

BTA-TRAK™ et BTA-STAT™ sont des dosages urinaires de l'antigène BTA, pour *Bladder tumor antigen* en anglais, spécifiques de la tumeur de la vessie. Plus précisément, la protéine BTA correspond au facteur hCFHrp (*human complement factor H-related protein*) et joue un rôle important dans la voie alternative de signalisation du facteur H. Cette voie favorise la carcinogenèse en donnant un avantage sélectif de croissance et en permettant d'échapper au système immunitaire de l'hôte^{146,147}. Le test BTA-TRAK™ est un dosage quantitatif ELISA réalisable uniquement en laboratoire alors que le test BTA-STAT™ est un test immunochromatographique qualitatif, « *point of care* » (POC) qui peut ainsi être effectué en dehors d'un laboratoire par un personnel qui n'est pas nécessairement formé en médecine de laboratoire.

Les tests diagnostic BTA-TRAK et BTA-STAT™ sont plus sensibles que la cytologie (57 et 83 % respectivement contre 37 %) ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Cependant, leur spécificité est inférieure à celle de la cytologie urinaire en raison des faux positifs (51 et 75 % respectivement contre 99 % trouvés dans cette étude), à cause de positifs en particulier provoqués par des maladies non tumorales des voies urinaires ^{167,168}. C'est la raison pour laquelle ces tests ne sont utilisés que pour le suivi des patients et en association avec la cytologie¹⁵⁰.

Introduction

4.3.2 La détection de la protéine NMP22 par les tests Alere NMP22® et NMP22 BladderChek®

La protéine 22 de la matrice nucléaire (NMP22) joue un rôle important dans la régulation de la mitose en agissant sur la distribution des chromatides aux cellules filles, et se trouve dans la matrice nucléaire de tous les types de cellules¹⁵³. Cette protéine, fortement exprimée dans les cellules tumorales de la vessie, est libérée du noyau après leur mort et peut être détectée dans l'urine^{170,171}.

Deux tests sont disponibles pour le dosage de NMP22 : un test quantitatif ELISA (Alere NMP22®) et un test immunochromatographique POC (NMP22 BladderChek®). La sensibilité du test Alere NMP22® et du test NMP22 Bladder-Chek® est supérieure à celle de la cytologie seule (68 % et 65 %, respectivement, contre 37 % pour la cytologie)¹⁷². Le grade de la tumeur joue un rôle important dans la spécificité des tests^{173,174}, qui reste cependant inférieure à celle de la cytologie (79 % pour Alere NMP22® contre 95 % pour la cytologie)¹⁷². En effet, la présence constitutive de NMP22 dans les CUR peut induire un faux positif et altérer la spécificité du diagnostic^{166,168,174}. La détermination du taux de NMP22 n'est pas utilisée lors d'un premier diagnostic, mais il est utile pour le suivi, car il présente une sensibilité plus élevée que la cytologie pour le groupe à faible risque¹⁵⁹. Enfin, le test NMP22 BladderChek® est facile à réaliser, donne des résultats en 30 minutes et peut être pratiqué en dehors d'un laboratoire, contrairement au test Alere NMP22®.

4.3.3 L'immunocytofluorescence : Immunocyt™/uCyt+™

Il s'agit de tests diagnostiques immunocytochimiques ciblant deux antigènes. Le premier antigène est un épitope sialylaté associé aux cancers superficiels de la vessie et exprimé sur un groupe hétérogène de glycoprotéines membranaires. Il s'agit, plus précisément, d'une glycoforme de l'antigène carcinoembryonnaire (CEA). Cette glycoforme du CEA est une glycoprotéine membranaire de 200 kDa ancrée à la membrane par un lien glycosylphosphatidylinositol et est hautement glycosylée. Cette glycoprotéine est observée uniquement dans les cellules tumorales, et préférentiellement dans les TVNIM¹⁶⁰⁻¹⁶². Cet antigène est ciblé par l'anticorps 19A211¹⁶¹. Le deuxième antigène est une mucine-like de masse moléculaire élevée, appelé antigène mucine de la vessie (MAUB)¹⁷⁹ et qui est sécrété par les muqueuses et certaines glandes exocrines¹⁶²⁻¹⁶⁵. Ce MAUB est ciblé par les anticorps M344 et LDQ1053.

Seul le test ImmunoCyt™/uCyt+™ a une sensibilité allant de 39 % à 92 % selon les études, pour tous les TCC, nombre supérieur à celle de la cytologie de 23 % à 84,6 %. En revanche, comme pour les tests précédents, la spécificité de la cytologie reste meilleure, avec une fourchette de 62 % à 84 % pour l'ImmunoCyt™/uCyt+™ contre 80 % à 99 % pour la cytologie. Néanmoins, lorsque les tests cytologiques et l'ImmunoCyt™/uCyt+™ sont utilisés ensemble, la sensibilité augmente d'au moins 15 %, pour atteindre la valeur de 94 %¹⁸². De plus, la sensibilité pour les tumeurs de bas grade est passée de

Introduction

55 %, pour la cytologie seule, à 79 % avec une combinaison des deux diagnostics¹³¹. Il a également été démontré que la sensibilité pour les tumeurs de haut grade était améliorée, avec une sensibilité de 75 % pour la cytologie seule, et de 99 % pour la combinaison. Malheureusement, la spécificité des tests, même combinés, reste toujours inférieure à celle de la cytologie seule : elle est comprise entre 61 % et 81 % selon les études^{183,184}. Elle reste, cependant, meilleure que celle du test Immuno-Cyt™/uCyt+™ seul. En conclusion, ce test est utile pour améliorer la sensibilité globale lorsqu'il est combiné à la cytologie pour les CV.

4.3.4 Le test d'hybridation *in situ* en fluorescence : Urovysion™

Il s'agit d'un test d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) multisonde à 4 cibles¹⁶⁹. Le jeu de sondes est composé de sondes ADN directement marquées ciblant des régions chromosomiques fréquemment altérées et remaniées dans les cas de CV. Il s'agit des régions péri-centromériques des chromosomes 3 (CEP3), 7 (CEP7) et 17 (CEP17), ainsi que du locus 9p21 (LSI 9p21) permettant de quantifier la délétion homozygote du gène suppresseur de tumeur p16. Une coloration au 4'-6-diamidino-2-phénylindole permet également d'évaluer certaines caractéristiques nucléaires atypiques comme la présence de noyaux larges et irréguliers dans les cellules polysomiques. De nombreuses publications concernant des essais visant à valider son utilisation comme test de surveillance du CV ont vu le jour. Le test diagnostique Urovysion™ est plus sensible que la cytologie urinaire pour détecter une récurrence du CV (74 % contre 61 %) ¹⁸⁶. En utilisant deux fois ce test diagnostique à trois mois d'intervalle, la détection de la récurrence du CV est passée de 50 % avec un simple test à 72 % quand on alterne de trois mois. Avec cette double analyse, 42 % des cancers de bas grade et 67 % des cancers de haut grade ont été détectés contre 0 % et 11 % respectivement en utilisant uniquement la cytologie.

Ce test diagnostique non invasif est beaucoup plus efficace que la cytologie pour détecter une récurrence du CV. Cependant, un problème persiste avec ce test : il n'est pas spécifique au CV et peut détecter d'autres cancers (le cancer du rein par exemple) en raison de la présence de cellules tumorales de l'appareil urinaire dans les urines. Ainsi toutes les cellules qui présentent le site de fixation des sondes peuvent donner un diagnostic positif au CV alors qu'il s'agit d'un autre cancer. Il a également un taux élevé de faux positifs (28 %) ¹⁸⁷. Ainsi, l'Urovysion™ ne peut remplacer ni la cytologie ni la cystoscopie pour la détection initiale du CV. Ce test est donc utilisé pour le suivi des patients qui ont été atteints de CV.

4.3.5 Le test Xpert Bladder Cancer Monitor

Le test Xpert (*Bladder Cancer Monitor analyse*) permet la détection par RT-PCR en temps réel ^{188,189} de cinq cibles d'ARNm :

Introduction

- ABL1¹⁷⁴ – code pour une kinase et est impliquée dans la division, la croissance, la différenciation et la migration cellulaire.
- CRH – code pour un neurotransmetteur (*corticotropin-releasing hormone*) pro-inflammatoire et induit la production de VEGF¹⁷⁵.
- IGF2 – code pour l'*insulin-like growth factor II* qui est un facteur de croissance autocrine important¹⁷⁶
- UPK1B¹⁷⁷ – code pour une protéine de surface impliquée dans la prolifération des cellules
- ANXA10 – code pour une annexine et dont l'expression est diminuée dans le CV

ABL1, CRH, IGF2 et UPK1 subissent une mutation activatrice contrairement à ANXA10, qui est inactivée.

En ce qui concerne la sensibilité, le test Xpert atteint 84 % contre 33 % pour la cytologie. Pour la spécificité, le test Xpert atteint 91 % contre 94 % pour la cytologie. Cependant, si la cytologie urinaire et la cystoscopie sont moins fiables en détection, ils offrent une plus large palette de détection que le test Xpert, qui se concentre seulement sur cinq ARNm présents à des stades non définis. S'il n'y a pas, au minimum, un de ces 5 ARNm dans les urines, alors il n'y a pas de détection possible, rendant le test inutile. On ne peut donc pas l'utiliser seul, au risque de manquer le diagnostic. En revanche, pour le suivi des patients, les tests Xpert sont utilisés en remplacement de la cytologie afin d'améliorer la confiance dans la détection des récurrences du CV et de diminuer la fréquence des cystoscopies associées à la cytologie.

4.3.6 Le test CxBladder Monitor

Le test CxBladder Monitor est basé sur la quantification de 5 biomarqueurs ARNm présents dans les urines. Quatre de ces biomarqueurs (IGFBP5, HOXA13, MDK et CDK1) sont associés à la croissance et à la propagation du tissu tumoral, tandis que le cinquième biomarqueur, CXCR2, est un marqueur d'inflammation fortement exprimé dans les neutrophiles. Dans ce contexte, le CXCR2 permet de distinguer les patients atteints de CV des patients souffrant uniquement d'inflammation^{194,195}. Le test CxBladder Monitor présente une sensibilité de 82 %, nettement meilleure que celle de la cytologie (37 %). En revanche, sa spécificité reste légèrement plus faible (85 % pour le CxBladder Monitor contre 95 % pour la cytologie)¹⁹⁶ impliquant un taux de faux positifs plus important. Il ne peut donc pas remplacer les tests diagnostiques de référence, mais il est utilisé comme outil supplémentaire avant d'intervenir sur une possible procédure invasive¹⁸¹.

Tous les tests présentés ici ont été validés par la *Food and Drug Administration* (administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments, FDA), mais il existe d'autres tests, non validés par la FDA, qui sont plus largement détaillés dans la revue publiée en 2021 dans le journal *Cancers* : Charly Gutierrez, Marine Charpentier, Thierry Guillaudeux, Grégory Verhoest, Rémy Pedoux ; [Noninvasive Urine-Based Tests to Diagnose or Detect Recurrence of Bladder Cancer](#)

Introduction

Dans cette revue, nous récapitulons les nombreux tests récemment développés afin de diagnostiquer le CV à un stade précoce et qui facilite le suivi des patients. Nous discutons de leur efficacité, de leur facilité d'utilisation et de leurs applications. Enfin, nous discutons des tests qui, à l'avenir, pourraient améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients atteints de CV.

Introduction

4.3.7 Tests urinaires non invasifs pour le diagnostic ou la détection des récurrences du cancer de la vessie

Revue

Tests urinaires non invasifs pour le diagnostic ou la détection des récurrences du cancer de la vessie

Noninvasive Urine-Based Tests to Diagnose or Detect Recurrence of Bladder Cancer

Charly Gutierrez*, Marine Charpentier*, Thierry Guillaudeau, Grégory Verhoest, Rémy Pedoux

Publiée dans le journal Cancers

Review

Noninvasive Urine-Based Tests to Diagnose or Detect Recurrence of Bladder Cancer

Marine Charpentier ^{1,†}, Charly Gutierrez ^{1,†}, Thierry Guillaudeau ¹, Grégory Verhoest ² and Rémy Pedoux ^{1,*} 

¹ COSS (Chemistry Oncogenesis Stress Signaling)—UMR_S 1242, University of Rennes, INSERM, CLCC Eugène Marquis, F-35000 Rennes, France; marine.charpentier@univ-rennes1.fr (M.C.); charly.gutierrez@univ-rennes1.fr (C.G.); thierry.guillaudeau@univ-rennes1.fr (T.G.)

² Department of Urology, CHU RENNES, Rue Henri le Guilloux, 35033 Rennes, France; Gregory.Verhoest@chu-rennes.fr

* Correspondence: remy.pedoux@univ-rennes1.fr; Tel.: +33-223-234-702

† These authors contributed equally to this paper as first authors.

Simple Summary: Bladder cancer (BC) is the tenth most common cancer worldwide, with approximately 550,000 new cases and 200,000 deaths in 2018. BC is divided into two subgroups: non-muscle invasive bladder cancer, an early stage of the cancer, and muscle invasive bladder cancer, which is more aggressive. The crucial issue today is to be able to detect BC easily and early, with high sensitivity and specificity, in order to treat it sooner, using less invasive methods. Over the past decade, progress has been made to improve detection methods using novel urinary biomarkers. In this review, we discuss the present and future of noninvasive urine tests to diagnose or detect the recurrence of bladder cancer.



Citation: Charpentier, M.; Gutierrez, C.; Guillaudeau, T.; Verhoest, G.; Pedoux, R. Noninvasive Urine-Based Tests to Diagnose or Detect Recurrence of Bladder Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 1650. <https://doi.org/10.3390/cancers13071650>

Academic Editor: Roman Blaheta

Received: 5 February 2021

Accepted: 25 March 2021

Published: 1 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Liquid biopsies are increasingly used for the diagnosis and follow-up of cancer patients. Urine is a body fluid that can be used to detect cancers and others diseases. It is noninvasive and easy to collect. To detect Bladder Cancer (BC), cytology is the first assay used. It is an effective way to detect high grade BC but has a high rate of equivocal results, especially for low grade BC. Furthermore, cystoscopy is used to confirm cytology results and to determine cancer status. Cystoscopy is also effective but highly invasive, and not well accepted by patients, especially for BC follow-up. In this review we survey the numerous assays recently developed in order to diagnose BC at an early stage, and to facilitate the follow-up of patients. We discuss their effectiveness, ease of use, and applications. Finally, we discuss assays that, in the future, could improve the diagnosis and management of BC patients.

Keywords: bladder cancer; diagnostic; non-invasive; liquid biopsy; cytology; urine

1. Introduction

Bladder cancer (BC) is the tenth most common cancer worldwide, with approximately 550,000 new cases and 200,000 deaths in 2018. The incidence is 9.6 and 2.4 per 100,000 in males and females, respectively. In France, 12,000 new cases were diagnosed in 2012, and it is the seventh most common cancer [1]. It is the most expensive cancer to treat in Europe [2]. Seventy to eighty five percent of BCs are urothelial carcinoma (UC), commonly termed non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) [3]. Squamous, adenocarcinoma, and small cell carcinoma are less common, and are associated with an advanced stage and higher mortality than NMIBC. NMIBC is an early stage of cancer and is classified as stage Ta to T1; it is only found in the first layer (urothelium) and the second layer (*lamina propria*) of the bladder (Figure 1). Muscle Invasive Bladder Cancers (MIBC) are classified as T2 to T4, and are only found in the third layer of the bladder (*muscularis propria*) (Figure 1). The staging of BC is determined by the TNM system [4].

Table 1. Genes altered in BC and used to develop urine-based diagnostic tests.

Pathway	Altered Genes	Denomination	Activity	Fonction	Status in Bladder Cancer	Alterations Consequences in BC/Remarks	Publications
DNA damage signaling and repair	ERCC2 (XPD)	ERCC Excision Repair 2	Part of transcriptional initiation factor (TFIIH)	Involved in transcription-coupled nucleotide excision repair	Mutations leading to inactivation	Point mutation accumulation. Vulnerability to cisplatin chemotherapy.	Kim et al., 2016 Liu et al., 2016
	ATM	Ataxia telangiectasia mutated	Serine/threonine protein kinase	Initiates DNA damage checkpoint activations leading to cell cycle arrest, DNA repair or apoptosis	High expression level or mutations	Mutations accumulation. Promotes proliferation. Radiotherapy resistance.	He et al., 2017
	RBI	Retinoblastoma-associated protein	tumor suppressor	Key cell division regulator	Mutations		Yin et al., 2018
	APOBEC	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like	Cytidine deaminase	Regulatory protein	High expression level	Mutations accumulation in DNA damage response and chromatin regulatory genes	Glaser et al., 2018 Jarvis et al., 2018 Shi et al., 2019
Chromatin modifying	KMT2D (MLL4)	Histone-lysine N-methyltransferase 2D	Histone H3 lysine 4 mono-methyltransferase	Essential for cell differentiation, cell fate regulation, metabolism and tumor suppression	Loss of function or misregulation	Increase proliferative and migratory abilities	Sun et al., 2019 Ding et al., 2019 Hou et al., 2019
	KDM6A (UTX)	Lysine-specific demethylase 6A	Specific demethylase	Transcriptional regulation at promoters and enhancers	Mutations Loss of function	Promotes M2 macrophages polarization increasing cancer stem cells via cytokines	Hurst et al., 2017 Nickerson et al., 2014 Kaneko et al., 2018 Kobatake et al., 2020
	ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A	Part of SWI/SNF family, Helicase and ATPase activities	Essential for transcriptional activation of genes normally repressed by chromatin	Mutations Loss of function	Involved in granting BC non-stem cells the capability of self-renewal.	Balbas-Martinez et al., 2013 Li et al., 2016 Yang et al., 2016
	BAP1	BRCA1 associated protein-1	Deubiquitinase	Involved in transcription-coupled nucleotide excision repair	Mutations Loss of function	BRCA pathway alteration	Nickerson et al., 2014 Lin et al., 2017 Tech et al., 2020

Table 1. Cont.

Pathway	Altered Genes	Denomination	Activity	Fonction	Status in Bladder Cancer	Alterations Consequences in BC/Remarks	Publications
Signaling pathways	KRAS/HRAS/NRAS		GTP-binding proteins part of RTK/Ras pathway	Involved in transducing signal to regulate cell proliferation, survival and differentiation	Mutations Gain of function Loss of function	Hyperproliferative development disorders	Wu et al., 2015
	FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3	Part of the fibroblast growth factor receptor family	Involved in bone growth	Mutations Gain of expression	Common feature of low-grade BC	The cancer genome atlas research network, 2014 Akanksha and Sandhya, 2019 Wu et al., 2015
	PIK3CA/Akt/mTOR	Phosphatidylinositol 3 kinase/Akt/mechanistic target of rapamycin	Intracellular signaling pathway	Involved in cell cycle regulation	Mutations Gain of function Loss of function	Involved in tumor growth and angiogenesis	Ching and Hansel, 2010
	TSC1/Hsp90	Tuberous sclerosis 1/Heat shock protein 90	Co-chaperone and chaperone proteins	TSC1 inhibits Hsp90 activity and regulates mTORC1 Hsp90 help for protein folding	Chr9 deletion Loss of function		Hornigold et al., 1999 Woodford et al., 2019 Knowles et al., 2003 Guo et al., 2013
	UPK1B	Uroplakin 1B	Cell surface protein mediating signal transduction	Involved in cell development, activation and growth	Upregulation	Promotes proliferation, invasion and migration of cancerous cells	Wang et al., 2018
	IGFBP5	Insulin-like growth factor-binding protein 5	Transport protein	Transports IGF1 (Insulin like growth factor 1)	Overexpression		Liang et al., 2013 Neuzillet et al., 2017
	ERBB2	Erythroblastic oncogene-B2 receptor tyrosine kinase 2	Member of the human epidermal growth factor receptor family	promotes cell proliferation	Mutations Overexpression	Linked to development and progression of cancers, metastasis	Groenendijk et al., 2015 Yoshida et al., 2019
	NID2	Nidogen-2	Basal lamina protein	Plays a role during late embryonic development	Methylation status change	Important for BC development but mechanism not clear yet	Fantony et al., 2015 Fantony et al., 2017

Table 1. Cont.

Pathway	Altered Genes	Denomination	Activity	Fonction	Status in Bladder Cancer	Alterations Consequences in BC/Remarks	Publications
Post-translational modification	MDM2	Murine double minute 2	E3 ubiquitin ligase	Responsible for p53 regulation	Mutations SNP at position 309		Gangwar and Devi Mittal, 2010 Xie et al., 2015 Horikawa et al., 2008
	CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	Serine/ threonine kinase	Key player in cell cycle regulation by allowing cell cycle progression	Overexpression	Promotes proliferation, invasion and self-renewal	Tian et al., 2018 Heo et al., 2020
	AURKA	Aurora kinase A	Serine/ threonine kinase	Important for cell proliferation	Overexpression	Induces centrosome amplification, chromosome missegregation, aneuploidy and stimulates cell proliferation and invasion	Park et al., 2008 Mobley et al., 2017 Guo et al., 2018
Transcription factor	EOMES	Eomesodermin	Transcription factor	Important for development and immunity	Hypermethylation	Important for BC development but mechanism not clear yet	Reinert et al., 2012
	HOXA9	Homeobox protein Hox-9	Transcription factor	Involved in hematopoiesis and development	Hyper or Hypomethylation	Important for BC development but mechanism not clear yet	Kim et al., 2013 Kitchen et al., 2015
	POU4F2	POU domain, class 4, transcription factor 2	Transcription factor	Involved in maintaining visual system neurons	Hyper or Hypomethylation	Important for BC development but mechanism not clear yet	Reinert et al., 2012 Wang et al., 2015
	RUNX3	Runt-related transcription factor 3	Transcription factor	modulate the transcription of their target genes	Deleted or silenced due to hypermethylation or mutations		Kim et al., 2005 Willff et al., 2008 Zhang et al., 2008 Yan et al., 2012
	TP53	Tumor protein 53	Transcription factor	Involved in cell cycle regulation, autophagy and apoptosis	Mutations		Pandith et al., 2010 Hoffman-Censits et al., 2019 Horikawa et al., 2008
	TERTp	Telomeras reverse transcriptase promoter	Promoter for a RNA-dependent telomerase	Lengthens telomeres	Mutations Loss of function		Batista et al., 2020 Nickerson et al., 2014

Table 1. Cont.

Pathway	Altered Genes	Denomination	Activity	Fonction	Status in Bladder Cancer	Alterations Consequences in BC/Remarks	Publications
Growth factor	IGF2	Insulin-like growth factor 2	Hormone	Growth promoting hormone indispensable during gestation Involved in carbohydrates metabolism	Overexpression Hyper or Hypomethylation	Important for BC development but mechanism not clear yet	Byun et al., 2007 Chen et al., 2013
	ANXA10	Annexin 10	calcium-dependent phospholipid binding	Involved in cellular growth and in signal transduction	Lower expression	Important for BC development but mechanism not clear yet	Munksgaard et al., 2011
	NEGF2	neurite growth-promoting factor 2	Basic heparin-binding growth factor	Involved in cell proliferation, cell migration and survival	Overexpression	Involved in cell proliferation, cell migration and angiogenesis	Hunter et al., 2000 Sakamoto et al., 2012 Jones et al., 2014
Bladder cancer antigen	BLCA1/BLCA4	Bladder cancer-specific nuclear matrix protein	nuclear matrix protein	increases the levels of IL-1 α , IL-8 and thrombomodulin	expressed only un BC	Promote tumor cell proliferation, survival and angiogenesis	Schawlb et al., 1993
	19A211 tumor-associated antigen: CEA	carcinoembryonic antigen	specific product of endodermally-derived neoplasms	cell adhesion	Absent form urothelial cells	Lower risk of tumor recurrence	Fradet et al., 1990 Bergeron et al., 1996 Tétu et al., 2005
Extracellular compartement	M344 and LDQ1053 tumor-associated antigens: MAUB	mucin antigen of the urinary bladder	high molecular weight glycoproteins	cell signaling, cell adhesions, differentiation of epithelial cells and immune response	aberrant regulation of mucin gene expression or aberrant glycosylation of the gene product	Aggressive biological behavior	Bergeron et al., 1996 Moniaux et al., 2001 Rachagani et al., 2009
	HA	Hyaluronic acid	Nonsulfated glycosaminoglycan	Component of tissue matrix and tissue fluids	Absent form urothelial cells		Lokeshwar et al., 2000
	hCFHrp	Human complement factor H-related protein	Member of the complement factor H family	Regulates factor H	Absent form urothelial cells	Promote growth and host immune system escaping	Kinders et al., 1998 Raitanen et al., 2001

Table 1. Cont.

Pathway	Altered Genes	Denomination	Activity	Fonction	Status in Bladder Cancer	Alterations Consequences in BC/Remarks	Publications
	CD15s	Lewis X antigen/Sialyl LewisX (sLeX)/stage-specific embryonic antigen 1 (SSEA-1)	surface glycan/Blood group antigen	cell-to-cell recognition processes and fertilization	Absent form urothelial cells	Leukocyte adhesion deficiency	Mourant et al., 1946 Itzkowitz et al., 1986 Pode et al., 1998
	Fibrin/Fibrinogen	Fibrin/Fibrinogen	fibrous, non-globular protein	clotting of blood	overexpression		Schmetter et al., 1997
	EVs	Extracellular vesicles	lipid bilayer-delimited particles	proteins, nucleic acids, lipids, metabolites, and even organelles transport from the parent cell		Communication between tumor cells and stromal cells and local tumor progression, metastatic spread and the emergence of drug resistance	Lin et al., 2016 Silvers et al., 2017
Cell structure	CK	Cytokeratins	Intermediate filament proteins	Helps to resist to mechanical stress	Overexpression	Aberrant differentiation in the process of urothelial carcinogenesis and poor prognosis	Björklund et al., 1957 Lüning et al., 1980
Nuclear mitotic apparatus	NMP22	Nuclear matrix protein 22	nuclear protein	Important role in mitosis regulation	Overexpression	NMP22 is released from cells during apoptosis	Miyanağa et al., 1999 Bibbo et al., 2008 Balci et al., 2015
Apoptosis inhibitor	BIRC5	Baculovirus IAP repeat-containing protein 5 or Survivin	Member of the inhibitor of apoptosis protein (IAP)	Important only during fetal development	Overexpression	cell survive	Ambrosini et al., 1997 Li et al., 1998 Li et al., 1999 Altieri et al., 1999
Nuclear import/export	KPNA2	Karyopherin alpha 2	Member of the karyopherin family	Involved in cargo localization regulation	Overexpression	Increases proliferation, migration and invasion ability	Shi et al., 2020

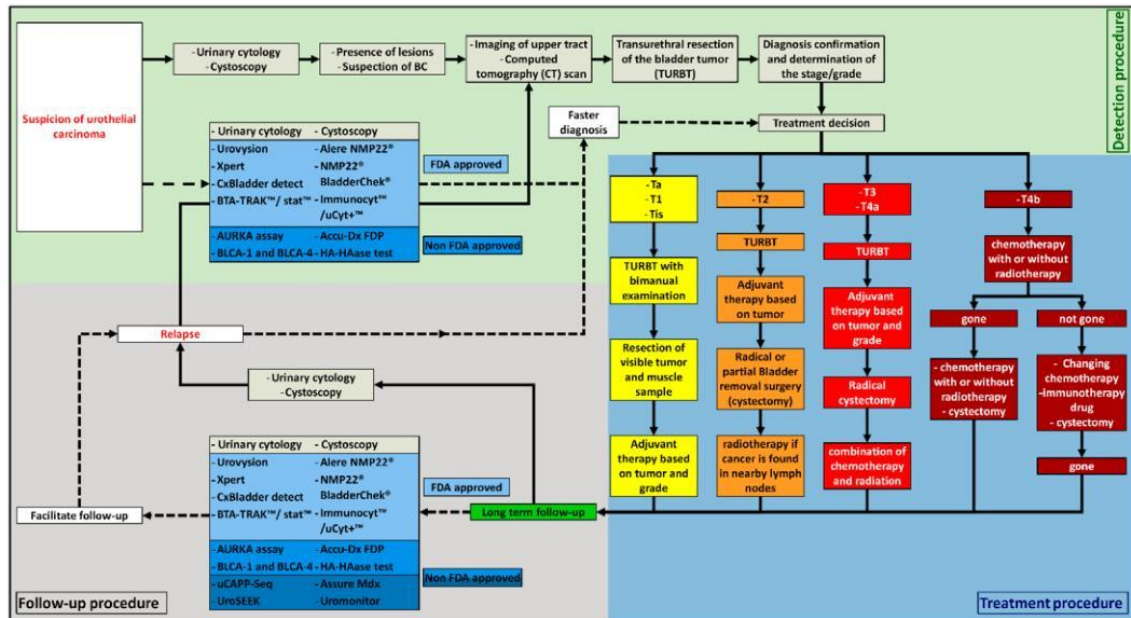


Figure 2. The different ways of detection, diagnosis, treatment, and follow-up of BC, depending on the clinical situation. —: Classical routine used by the clinicians nowadays; - - - -: new methods that can be used by the clinicians nowadays.

Cystoscopy is the gold standard for the detection of BC. It gives information about the number, localization, aspect and size of the tumor(s). It is systematically performed when there is a suspicion of BC with urine cytology [9]. This method has a sound sensitivity (68.3 to 100%) but can give false negative result (due to operator error or the difficulty of finding the tumor because of its small size at the carcinoma in situ stage). It also has a good specificity (57 to 97%) [10]. Cystoscopy is an endoscopic procedure used to look inside the bladder. It is an invasive assay and causes patient discomfort, possible urinary tract infection, and anxiety [10–13].

A disadvantage of these two tests is their low efficiency for detecting BC at an early stage. Indeed, the detection of early stage BC is a real issue nowadays. Early detection gives the patients a greater probability of being cured from BC and is cheaper to treat. Indeed, BC is an expensive cancer to treat and to survey in comparison with other cancers. Its cost fluctuates between USD 47,500 for distant BC to USD 14,300 during the 1st year after diagnosis, and can reach more than USD 172,000 for a long-term survivor [14]. Over the past years, many new tests have been developed in order to detect BC earlier than with current cytology and cystoscopy, and to improve the specificity of BC diagnosis. The aim of this review is to present BC diagnostic tests that are available and are being developed at the moment. The specificity and sensitivity of each test will be compared to cytology and cystoscopy results, and every positive or negative aspect will be highlighted to have a clear vision of what their use could bring to the field (the summarized information has been compiled in Supplementary Table S1).

2. Urine Protein-Based Assays

Lots of studies are being conducted to improve the diagnostic accuracy of urinary tests, both to create an alternative to urinary cytology and cystoscopy and to improve patients' follow-up. Numerous biomarkers have been found and some of these underwent clinical validation and approval. Urine has lots of advantages for biomarker detection. It

is noninvasive, easy to handle, and more than one biomarker can be investigated at the same time. Indeed, lots of proteins or RNAs present in the urine already serve as markers of cellular dysfunctionality [15,16].

2.1. FDA-Approved

2.1.1. BTA-TRAK™ and BTA-STAT™

BTA-TRAK™ and BTA-STAT™ are dosages of the Bladder tumor antigen (BTA), which is the human complement factor H-related protein (hCFHrp). hCFHrp plays a major role in alternative pathway regulator factor H. This protein has played a role in the carcinogenesis by giving a selective growth advantage and an escape to the host immune system [17,18]. BTA-TRAK is a urine ELISA test and BTA-STAT™ is a quantitative point-of-care test. It has been shown that BTA-TRAK and BTA-STAT™ sensitivity are better than cytology (57–83% vs. 37% respectively) [19–21]. However, their specificity is lower than urinary cytology due to false-positives (51–75% vs. 99%) [20], in particular, nontumor urinary tract diseases [22,23]. That is the reason why these tests are only used for patient follow-up in association with cytology [21]. They can also be detected in urine.

2.1.2. NMP22 (Nuclear Matrix Protein 22) Protein Test

Nuclear matrix protein 22 (NMP22) has an important role in the regulation of mitosis by regulating the distribution of chromatin to daughter cells, and is found in the nuclear matrix of all cell types [24]. NMP22 is highly expressed in bladder tumor cells and released from the nucleus after they die; it can be detected in the urine [25–27]. Two tests are available for the dosage of NMP22, an ELISA test (Alere NMP22®) or a point-of-care test (NMP22 BladderChek®). The sensitivity of the Alere NMP22® test and NMP22 BladderChek® test are higher than cytology alone (68% and 65%, respectively, vs. 37% for the cytology [28]). The grade of the tumor plays an important role in the specificity of the test [29,30]. However, the specificity is still lower than cytology—79% for Alere NMP22® vs 95% for cytology [28]. Unfortunately, the constitutive presence of NMP22 in urothelial cells can induce a false-positive and impair diagnostic specificity [21,22,30]. NMP22 level is not used for the first diagnostic but it helps for the follow up, since it has shown a higher sensitivity than cytology for the low-risk group [31]. Finally, NMP22 BladderChek® is a test which is easy to perform; it gives results in 30 min, in contrast to Alere NMP22®, which needs to be performed in the laboratory.

2.1.3. ImmunoCyt™/uCyt+™

ImmunoCyt/uCyt+ is an immunocytochemical test targeting two antigens and was developed by Fradet and Lockhard in 1997. The first antigen is a superficial bladder cancer-associated sialylated epitope expressed on a heterogeneous group of glycoproteins in the membrane; more precisely, a glycoform of the carcinoembryonic antigen (CEA). This CEA glycoform is a 200 kDa membrane glycoprotein anchored to the membrane via a glycosylphosphatidylinositol link and is highly glycosylated. This glycoprotein is observed in tumor cells only, and preferentially in superficial bladder tumors [32–34]. This antigen is targeted by the 19A211 antibody [33]. The second antigen is a secreted high-molecular-mass mucin-like, called mucin antigen of the urinary bladder (MAUB) [35]. It is secreted by mucosae and some exocrine glands [34–37]. This MAUB is targeted by M344 and LDQ1053 antibodies.

Studies have shown that ImmunoCyt/uCyt+ alone has a sensitivity ranging from 38.5% to 92.1% across all grades and risk categories, which is higher than cytology (from 23% to 84.6%). However, the specificity is better for cytology than for ImmunoCyt/uCyt+, with a range from 62% to 84.2% vs. 79.7% to 99.4% for cytology. Nevertheless, it has been shown that when cytology tests and ImmunoCyt/uCyt+ are used together, sensitivity improves by at least 15%, ranging between 53.8% and 94.1% [38]. Moreover, the sensitivity for low-grade tumor increased from 8.3%, for cytology alone, to 79.3% with a combination of both diagnostics [39]. They also showed that the sensitivity for high-grade was improved, with a sensitivity by 75.3%, for cytology alone, and 98.9% for the combination. Unfortunately, the specificity of the combination is still lower than cytology alone (ranging

from 61% to 80.7%) [40,41] but better than ImmunoCyt/uCyt+ alone. In conclusion, this test is useful for improving overall sensitivity when combined with cytology for all grades of BC.

2.2. Non-FDA-Approved

2.2.1. Cytokeratins

The first potential role of cytokeratins as tumor markers for epithelial cancer cells has been shown by Björklund B. and Björklund V, in 1957, with the tissue polypeptide antigen (TPA) [42]. TPA is present in the proteolytic fragments of CKs 8, 18 and 19; these fragments are released into body fluids, such as urine and serum, as a sign of cell death [43]. It has been shown that the concentration of the antigen is higher in patients with tumors [44]. Since the discovery of the high level of CKs in BC, several commercially available tumor marker tests have been developed, such as the TPA, tissue polypeptide-specific antigen (TPS) for CKs 8 and 18, tissue polypeptide cytokeratin antigen (TPACYK), and the cytokeratin fragment of CKs 8 and 19 (CYFRA 21-1) [45]. However, since 2016, a new test to detect cytokeratins has been specifically developed for the diagnosis of BC, the UBC[®] Rapid Test (Concile GmbH, Freiburg, Germany). This test is now the most commonly used for the detection of cytokeratins. It is a point-of-care test. Two tests are available and both measure fragments of cytokeratins 8 and 18; one is a quantitative measurement and the other is a qualitative measurement [46,47]. These cytokeratins are soluble in urine and can be detected quantitatively with monoclonal antibodies using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [48]. The qualitative and quantitative UBC[®] Rapid Test had a better sensitivity than cytology alone (61.3% and 64.5%), but still a lower specificity (77.3% and 81.8%).

However, it has been shown that the combination of the UBC[®] Rapid Test with cytology results in a higher overall sensitivity (77.4%). In contrast with cytology alone, sensitivity increased from 21.4% to 50% for detecting low-grade tumors, and from 43.8% to 100% for high-grade cancers, albeit with a reduced specificity from 100% to 77.3% [49].

2.2.2. Lewis X Antigen

Carbohydrate antigen 3-fucosyl-N-acetyllactosamine, also known as Lewis X, is a blood group antigen belonging to the Lewis system. It was first described by Mourant [50]. It is localized on the surface of cells, such as granulocytes, kidney tubules, and gastrointestinal epithelia [51]. This antigen is normally absent from the urothelial cells in adults, but is expressed by more than 90% of papilloma and transitional cell carcinomas, irrespective of the tumor grade or stage of the BC [52]. This test works with a monoclonal anti-Lewis X antibody (P12) directed against the Lewis X determinant [53]. Only old studies have been performed with the use of this marker, and showed a median sensitivity of 75% and a median specificity of 85% [52,54]. Due to the small number of studies, it is still unknown if this biomarker is efficient.

2.2.3. Survivin

Survivin, also known as baculovirus IAP repeat-containing protein 5 (BIRC5) and apoptosis inhibitor 4 (API4), is a member of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family [55]. Survivin participates in the suppression of apoptosis and is a regulator of the cell division [56–58]. Survivin is normally expressed during embryonic and fetal development. It is completely undetectable in normal adult tissue, but a vast majority of tumors express Survivin mRNA and protein at high levels. It can be found inside (cytoplasm, nucleus, and mitochondria) or outside (extracellular space through vesicles) the cell [55,59–62].

In BC, Survivin expression has been observed by immunohistochemistry and may negatively impact the recurrence of the disease [63]. Actually, studies have shown that Survivin has a real interest, with a sensitivity of 100% and a specificity of 80% to 90% [64,65], which means that this marker could be a good test to help in the detection of BC.

2.2.4. Hyaluronic Acid–Hyaluronidase Test (HA–HAase Test)

Hyaluronic Acid (HA) is a nonsulfated glycosaminoglycan and a component of the extracellular matrix in solid and fluid tissues [66]. The concentration of HA is elevated in several cancers and it has been shown that levels of HA are three to five-fold higher in bladder tumor tissue extracts when compared with normal bladder extracts [67]. Moreover, the expression of the hyaluronidases (HAase) (the enzymes capable of degrading the HA) is also highly expressed in BC tissue when compared with normal bladder extracts [68]. Furthermore, it is also shown that levels of HAase are correlated with the tumor grade. This increase of HAase plays a role in the invasive potential of BC [69]. The HA–HAase test is comprised of two ELISA-like assays: the HA test (dosing the HA) and the HAase test (dosing the HAase). The HA and HAase assays use a biotinylated HA-binding protein (HABP) and an avidin-biotin system for detection [22,66,70,71]. A recent meta-analysis showed that the sensitivity of the test is 90.8% for all tumors, with a specificity of 82.5% [66,72,73]. These results suggested that HA–HAase are good biomarkers for the diagnosis of BC.

2.2.5. BLCA-1 and BLCA-4

Bladder Cancer–Specific Nuclear Matrix Proteins (BLCA) are proteins only found in BC. It has been shown that these proteins are associated with tumor cell proliferation, survival, and angiogenesis [74,75]. BLCA-4 is one of the most abundant of this family of six proteins (BLCA-1 to -6). They have been detected in the entire bladder, including the tumor and normal adjacent areas, of individuals who have bladder cancer [74,75]. BLCA-1 is also one of the most abundant and has been shown to be significantly highly expressed in patients with BC than in normal individuals; however, with no correlation with tumor grade. For BLCA-1, a preliminary study showed a sensitivity of 80% and specificity of 87%, demonstrating the potential interest of a BLCA-1-based assays in diagnosis and surveillance of patients with BC [76]. BLCA-4 expression does not appear to be affected by tumor grade or various benign urologic disorders [77]. The protein level in urine was tested using ELISA. A pooled analysis estimated a sensitivity of 93% and a specificity of 97% for BC [78,79].

Current studies suggest that BLCA-1 and BLCA-4 are promising markers in BC diagnostics. Nevertheless, more studies are needed to confirm that BLCA-1 and BLCA-4 are good markers for BC detection.

2.2.6. Fibrin–Fibrinogen Degradation Product (FDP), the Accu-Dx FDP

It has been shown that BC produces a high level of vascular endothelium growth factor (VEGF) [80]. VEGF increases the permeability of the tumor vessels, which leads to leakage of plasma and blood proteins, such as plasminogen and fibrinogen, and coagulation factors into the extracellular space. Coagulation factors rapidly transform fibrinogen into fibrin, which is secondarily degraded by plasmin into FDP [81]. Increased urine fibrin/FDP levels have been shown with the presence of BC [82]. Since the middle of the 1970s, the identification of FDP in urine has been evaluated as a diagnostic test for BC. The Accu-Dx FDP, a qualitative test, is a rapid immunoassay measuring FDP in the urine in a few minutes [82,83]. Studies have shown a sensitivity ranging from 52% to 83% and a specificity from 68% to 86%. Due to a problem with technical stability during manufacturing, the marketing of the Accu-Dx FDP has been stopped [84].

2.3. Developing Diagnostics

2.3.1. Tumor-Secreted Extracellular Vesicles (EVs)

Recently, a small study identified 4 proteins as potential biomarker candidate proteins in EVs secreted by BC cell lines using mass spectrometry, which could be useful for diagnostics (HEXB, S100SA4, SND1 and EHD4) [85]. Moreover, using mass spectrometry, another study found 2 proteins to be possible diagnostic urinary EV biomarkers, α -1-antitrypsin and H2B1K [86]. The authors showed that, when these proteins are combined for the detection of BC, they have a sensitivity of 62.7% and a specificity of 87.59%. Another

protein, the periostin present in urinary EVs, has been shown to be significantly higher in urinary EVs from patients with BC than healthy participants [87]. Periostin plays an important role in the invasion in BC. However, more data still need to be collected to evaluate the real efficiency of EV proteins as biomarkers, as not many studies have been performed, covering a small number of patient samples.

2.3.2. Urinary Midkine Protein

Midkine protein (MK), also known as neurite growth-promoting factor 2 (NEGF2), is a heparin-binding growth factor involved in several pathways, such as growth factor activities in cellular proliferation, survival, and migration. In addition to the growth factor activities, MK also plays a role in fibrinolysis, blood pressure, host defense, and other processes [88,89]. In adult physiological condition, MK is only detected in kidneys at a very low level [90]. In contrast, MK was demonstrated to be significantly upregulated in various human cancers, such as BC [91]. This observation has been correlated with previous studies, which described that the upregulation of MK is also observed in urine specimens of BC patients [92,93]. It has been shown that the expression of MK is correlated with a poor outcome in patients with invasive BC, with a higher concentration in urine in advanced stages of BC [94]. Unfortunately, a recent study showed that the dosage of the urinary MK is less efficient than a urinary cytology, with a sensitivity of 69.7% vs. 87.6% and a specificity of 77.9% vs. 87.7%. The combination of dosages of the urinary MK with the urinary cytology improved the sensitivity to 93.3% with, as a counterpart, a reduction of the specificity to 66.2% [94]. Thus, urinary MK could potentially be suitable for the identification of patients with a high risk of BC.

2.3.3. Liquid-Based Cytology (LBC) in BC and Quantitative Proteomic Analysis

LBC is an innovative slide-making technique. It has been widely used for several cancers, such as cervical cancer, breast cancer, sputum cytology of lung cancer, and now, in BC. The LBC allows a better quality of the samples by reducing the time to make a sample slide, removing the nonurothelial cells and mucus in the urine, humidifying slides, and decreasing cell degeneration using a preservation solution. It also improves the microscopic analysis of the slides with a better background, a better cell dispersion, and with less atypical cells than in urinary cytology [95]. A recent meta-analysis shows that LBC has no significant sensitivity improvement when compared to a traditional urinary cytology, with a sensitivity of 58% and specificity of 96% [95]. But it was shown that LBC is more efficient in detecting malignant cells in comparison with urinary cytology (37.3% vs. 25.3%) [96]. More studies are needed to evaluate if LBC is a good method to replace classical cytology. Finally, a recent study shows that LBC could be a useful tool to detect new clinical biomarkers [97]. The authors generated the first and largest in-depth quantitative proteomic analysis of BC using LBC. They were able to detect a unique intracellular protein, the neuroblast differentiation-associated protein, AHNAK, with a different expression and localization between tumor and nontumor cells. However, further investigation is required to understand the importance of this protein.

3. Urine DNA/RNA Based Assays

Another way to diagnose cancer is to use DNA or RNA released or contained by malignant cells. One of the advantages of using DNA or RNA is that it can be amplified and can be used at early stages. Here, we are presenting tests that have been developed for BC.

3.1. Commercialized Urine DNA/RNA Tests

3.1.1. Urovysion

Urovysion is a 4 target multicolor FISH-based test, developed in 2000, to detect BC in urine [98]. The probe set is composed of directly labeled DNA probes targeting pericentromeric regions of chromosomes 3 (CEP3), 7 (CEP7), and 17 (CEP17), as well as the

9p21 locus (LSI 9p21) to quantify the homozygous deletion of the p16 tumor suppressor gene. A 4'-6-diamidino-2-phenylindole stain also allows the evaluation of atypical nuclear features; in fact, polysomic cells tend to have large and irregular nuclei. In their initial paper, Sokova et al., tested Urovysion in 21 BC patients and 9 healthy donors to determine the optimal set of FISH probes, and then in 179 patients, including 93 with BC history and 86 who were healthy, for validation [98]. They found a sensitivity of 84% and a specificity of 92%. In another study, they compared the Xpert assay (see below) to the Urovysion assay on 239 patients with a history of BC, and found a sensitivity of 74% (83% for high grade BC) and a specificity of 80% [99]. Numerous publications have been released since then, mostly about trials to validate Urovysion use as a BC surveillance test. One study, published in 2007, followed 250 patients with BC for 23 months [100]. They compared Urovysion tests to cytology and found that Urovysion is more sensitive at detecting BC recurrence (74% compared to 61%). Another study, published in 2018, assessed the potential benefit of using two Urovysion tests 3 months apart onto specificity and sensitivity of this test for BC recurrence [101]. The authors tested this hypothesis in a cohort of more than 400 patients who had been treated by transurethral resection of bladder tumor for BC and diagnosed within 2 years. If, with the first tests (Urovysion and Cytology), a new tumor was found, the trial ended for them; if nothing was suspicious, then they underwent the same tests 3 months later. By using 2 Urovysion tests, BC recurrence detection was increased from 50% to 72%, and 42% of low-grade BC and 67% of high-grade BC were detected against 0% and 11% using cytology.

Urovysion is a noninvasive test that allows the detection of BC, independent of specific mutations. This test is far more efficient for detecting BC recurrence than cytology. However, one of the problems that can come out using Urovysion is that it can detect other types of cancer, such as kidney cancer, due to leakage of cells in the urine. Urovysion has also a high false-positive rate of 27.6% [101]. Thus, Urovysion may not replace cytology and cystoscopy for the initial detection of BC; the two golden techniques are more efficient. That said, this assay could be used for the follow-up of BC patients. Despite the false-positive rate, the use of Urovysion, instead of cytology, could improve confidence with regard to detecting BC recurrence and diminish cystoscopy frequency, especially if two consecutive Urovysion tests are used. The Urovysion assay has been approved by the FDA in 2001.

3.1.2. Xpert Bladder Cancer Monitor

The Xpert bladder cancer monitor assay analyzes five mRNA targets (ABL1, CRH, IGF2, UPK1B, and ANXA10), frequently overexpressed in BC, using real-time-PCR (Polymerase Chain Reaction) [49,99]. ABL1 serves as a sample adequacy control to ensure the presence of human cells in the urine sample. The Xpert BC monitor is used as a kit. Briefly, cells are captured on a filter, lysed by sonication, and RNA is used for real time PCR. The Xpert bladder cancer monitor has first been compared to cystoscopy and cytology for the follow-up of 140 NMIBC patients [49]. In term of sensitivity, the Xpert assay reached 84% and cytology reached 33%. For specificity, the Xpert assay reached 91% and cytology reached 94%. The combination of both Xpert BC monitor and cytology did not enhance diagnostic performances. This test is more efficient in detecting BC recurrence than cytology. However, it does not seem that the Xpert assay will replace cytology and cystoscopy for the initial detection of BC; the two golden techniques are still more trusted and could cover more cancer types than the Xpert bladder cancer monitor, which focuses on only 5 mRNAs and is not representative of every BC type. However, for the follow-up of patients, Xpert assays could be used as replacements for cytology to improve confidence at detecting BC recurrence and diminish cystoscopy frequency.

3.1.3. CxBladder Detect

The CxBladder detect assay is based on the quantification of 5 mRNA biomarkers found in urine. Four of these biomarkers (IGFBP5, HOXA13, MDK, and CDK1) are associated with growth and propagation of tumor tissue, whereas the fifth biomarker, CXCR2, is

a marker of inflammation highly expressed in neutrophils. In this context, CXCR2 enables one to separate patients with BC from patients with inflammation alone [102,103]. In the initial study, 36 patients with no prior history of BC, 39 patients under surveillance for BC recurrence, and 77 patients with nonmalignant diseases were followed [102]. For low grade BC, a sensitivity of 47% was achieved and 100% was achieved for high grade BC. Another study compared the CxBladder assay and cytology [103]. They worked on 485 patients with gross hematuria, but without history of BC, and obtained their voided urine before cystoscopy. They obtained a sensitivity of 82% for the CxBladder assay (97% for high grade BC) against 56% for cytology. CxBladder specificity was 85% and 94% for cytology, showing a higher false-positive rate. Using the different markers, they can distinguish between low- and high-grade BC, with a sensitivity of 91% and a specificity of 90%. CxBladder will not replace cystoscopy for the initial detection of BC, but it could replace cytology because it is more efficient and makes it easier to separate low- and high-grade BC. Despite the false-positive rate, the use of CxBladder in replacement of cytology could improve confidence at detecting BC and diminish cystoscopy frequency [104]. Darling et al. performed a study on 33 patients with 12 urologists, resulting in 396 patient–urologist interactions [105]. All urologists changed their final diagnostics in at least one patient case with the addition of Cxbladder results. The total number of requested invasive procedures was reduced from 425 to 379 (–11%) following disclosure of Cxbladder information. Another study obtained the same results—a reduction in the number of total and invasive procedures [106]. The CxBladder detect assay is FDA approved.

3.2. Non-Commercialized Urine DNA/RNA Tests

3.2.1. uCAPP-Seq

uCAPP-Seq is a novel high-throughput sequencing (HTS) method for the detection of urine tumor DNA (utDNA) called utDNA CAPP-Seq (uCAPP-Seq) [107]. DNA contained in urine is purified and sequenced. Around 311 kb of genome are covered, including 460 genes. At first, an analysis of 67 healthy adults and 118 BC patients with different disease stages was performed [107]. The authors found a median of 6 mutations per tested patient; around 70% of mutations found in urine were the same found in the tumor. The two most common mutated regions were TERT (74%) and PLEKHS1 promoters (46%). BC common gene mutations, such as TP53, FGFR3, ERBB2, and RB1, were found, but there was no correlation between the total counted mutations and the stage of the disease. However, there was a correlation between urine DNA concentration and BC risk. As a new diagnostic test, uCAPP-Seq identified 77% of low-grade cancer and 100% of higher stage cancer. For surveillance of BC, cytology was positive for 37.8% of the patients who developed recurrence, while utDNA was positive in 84% of the cases. uCAPP-Seq is more efficient in detecting BC recurrence than cytology; it has a higher rate of detection for low-grade BC than cytology. There is only one publication on uCAPP-Seq, and more work needs to be done to compare and validate this new test to other techniques. It will probably be expensive, but not as expensive as cystoscopy, and costs can be reduced, especially if this technique is used widely. The uCAPP-Seq assay is not yet commercialized.

3.2.2. UroSEEK

The UroSEEK assay enables the detection of specific DNA mutations contained in exfoliated urine cells to diagnose BC and upper tract urothelial carcinomas [108]. This assay targets intragenic mutations in specific regions of the ten following genes (FGFR3, TP53, CDKN2A, ERBB2, HRAS, KRAS, PIK3CA, MET, VHL and MLL), which are frequently mutated in urothelial tumors. It also targets mutations in the TERT promoter and detects aneuploidy. It is based on a singleplex PCR assay to analyze the TERT promoter region and a multiplex PCR assay to analyze the 10 genes regions, followed by sequencing [109]. By adding barcodes to the primers, it could detect mutations in as few as 0.03% of urinary cells. UroSEEK has been tested in three independent cohorts of patients [108]. For the BC early detection, results were compared, when possible, to mutations found in the biopsy of the

initial tumor. By testing mutations of only 10 genes, there were false-negative results due to a low number of cancer cells in the urine (62% of the cases) or to the absence of mutations in the tested genes (38% of the cases). By combining the three tests (10 genes mutations, TERT mutations, and aneuploidy), false-positive results were drastically reduced, with only 1 positive result among the 188 healthy patients, reaching a sensitivity of 83%. Among the 395 patients in the BC early detection cohort who did not develop BC during the course of the study, 6.5% scored positive with the UroSEEK test. Despite the false positives, BC was detected 2.3 months before the diagnosis with gold standard techniques (cytology and cystoscopy), and, for 8 cases, more than one year before. By combining a complete UroSEEK test with the golden standard diagnosis test (cytology), a sensitivity of 95% was achieved, a 12% increase over UroSEEK and a 52% increase over cytology and a 93% specificity. For the BC surveillance cohort, a specificity of 80% and sensitivity of 71% were achieved; in combination with cytology, a specificity of 82% was reached. The UroSEEK test was positive 7 months before BC recurrence was diagnosed.

Another study was conducted in 2019 on 527 BC cases, including 373 low-grade and 154 high-grade bladder carcinomas (high grade) treated with transurethral resections or cystectomies [109]. Tumor and not urine-contained cells were analyzed, and white blood cells from healthy patient were used as control. A total of 92% of BC tumors were positive for at least one genetic alteration covered by UroSEEK test, including 70% positive for TERT mutations.

UroSEEK allows false-positive and false-negative diagnostics. False-negative results are mostly BC induced by mutations not detected by the UroSEEK test and, also, because of the low number of cells contained in urine. In fact, for some cancer, no cells were released into urine, at least at the early stage, and they can be diluted with normal cells [110]. UroSEEK should never be used as the only diagnostic test because there are too many false-negative results. However it could be useful for detecting BC recurrence, as it can detect cancerous cells seven months before currently used techniques (cytology and cystoscopy), and mutations covered 90% of BC [109]. Even with a false-positive, it will help to drastically diminish the use of cystoscopy. In order to avoid false-negative results during follow-up, primary tumors could be sequenced to validate if this cancer can be detected by the UroSEEK assay. the UroSEEK assay is not yet commercialized.

3.2.3. Assure Mdx

In the Assure Mdx assay, DNA is extracted from voided urine and analyzed for mutations in FGFR3, TERT, and HRAS, and methylation of OTX1, ONECUT2, and TWIST1 [111]. Assure Mdx was tested on 200 patients, including 97 with BC and 103 with nonmalignant profiles. The authors observed a sensitivity of 93% and a specificity of 86% for BC detection. These first results are promising but more work is needed to conclude on this technique, including comparison to golden standards, at least with cytology. Preliminary results suggest that Assure Mdx could be used for BC follow-up to help reduce cystoscopy and, perhaps, to help for the first diagnostic if sensitivity and specificity are better than with cytology. Assure Mdx is not yet commercialized.

3.2.4. AURKA

The Aurora kinase A (AURKA) gene encodes a key regulator of mitosis and is frequently amplified and/or overexpressed in cancer [112]. The level of AURKA amplification is associated with the level of aneuploidy. AURKA overexpression is associated with poor clinical outcomes due to increased cell cycle progression and development of genomic instability with aneuploidy [113,114]. In this assay, the AURKA gene copy number and DNA ploidy (centromeres for chromosomes 3, 7 and 17) are analyzed by FISH [112]. If three or more AURKA copies are detected, the sample is considered positive for BC. Firstly, 23 BC patients and 7 healthy control (training set) were analyzed, and then 100 BC patients and 148 control subjects (92 healthy individuals and 56 patients with benign disorders) were analyzed [112]. A specificity of 96.6% and a sensitivity of 87% were found. Another

study based on 232 patients with BC and 255 control samples, as well as 126 from healthy individuals and 129 from patients with benign urologic disorders, was led. A FISH test for the AURKA gene copy number in urine yielded to a specificity of 80% and a sensitivity of 80% [113]. One of the problems resulting from using AURKA is that, when it is positive, the type of cancer concerned is not clear; it could be kidney cancer or other types of cancer with a leak of cells into urine. AURKA is also a target for the treatment of BC; AURKA tests can only be used prior to any treatment, for initial BC detection. The AURKA based assay is not yet commercialized.

3.2.5. DNA Methylation

There are a multitude of urine DNA methylation-based assays that are developed to detect BC. In fact, gene methylation is different in cancerous cells and can help to distinguish them from healthy cells and, also, from other cancer types or grades. DNA methylation is correlated with poor survival in BC patients [115].

One of the tests allows the quantification of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM, and ZNF154 methylation levels by real-time PCR (MethyLight) [116]. A total of 390 urine samples from 184 patients with low grade BC and 35 healthy patients were studied. For all six markers, independently, a sensitivity between 82% and 89% and a specificity between 94% and 100%, for BC first detection, were obtained. For BC recurrence surveillance, a sensitivity between 88% and 94% and a specificity between 43% and 67% were obtained. It appears that hypermethylation was consistently present in urine samples for a group of healthy patients ($n=15-31\%$).

Another test quantifies promoter methylation of 8 genes (ARF, TIMP3, RAR- β 2, NID2, CCNA1, AIM1, CALCA and CCND2) by quantitative methylation-specific PCR (QMSP) [117]. A total of 17 nonrecurrent and 19 recurrent BCs were tested to identify optimum combinations, and new markers were found to study and explore. Other prospective confirmatory studies are needed to validate and optimize this assay. A larger cohort is, in fact, needed to obtain specificity and sensitivity rates.

Epicheck is an assay assessing the methylation status of 15 methylation markers [118]. D'Andrea et al. investigated the clinical utility and influence on decision making of the Bladder Epicheck assay for the surveillance of NMIBC using 440 patients [119]. A specificity of 88% was found to detect BC relapse.

Another study investigated voided urine methylation status to identify BC presence and grade [120]. Methylation status of 5 genes (TWIST1, RUNX3, GATA4, NID2 and FOXE1) was studied with a qPCR-based MethyLight assay. Using 211 BC patients (including 180 low grade) and 102 controls, they finally focused on 2 different markers and obtained a sensitivity of 76% and a specificity of 83% for BC detection, and 78% and 61% for grade determination.

A test developed for cervical cancer detection with DNA methylation, GynTect, has been used to detect BC [121]. It usually permits the quantification of DNA methylation on 6 genes (ASTN1, DLX1, ITGA4, RXFP3, SOX17 and ZNF671). By modifying the algorithm, reducing the assay to 4 genes (DLX1, ITGA4, SOX17 and ZNF671), and testing on 30 patients with NMIBC and 30 control subjects, a sensitivity of 60% and a specificity of 96.7% were obtained. By adding others markers known to be modified in BC, this test could be optimized.

As DNA methylation may be dependent on patients' ethnicities, assays are developed on a specific cohort, such as one on a Chinese patient [122]. A combination of 7 genes (HOXA9, ONECUT2, PCDH17, PENK, TWIST1, VIM and ZNF154) was used to assess its ability to detect BC using a high-resolution melting-curve assay. Encouraging results were obtained on a small cohort, and a larger cohort is scheduled.

DNA methylation quantification is a noninvasive test that enables the detection of BC, independent of specific mutations. One of the problems that may result from using DNA methylation is that, when it is positive, the cancer origin is not defined; it could be kidney cancer or any other type of cancer with cells leaking in the urine. As a minimum

number of cells is necessary to detect methylation, 35% of patients were excluded because of an insufficient amount of DNA [116]. Next, a collection of 50 mL of urine or a use of alternative techniques, such as nested PCR, for example, are recommended by the authors. Another limitation could be the treatment used, such as BCG, mitomycin C, etc. Indeed, many of them could alter methylation status and there is a real lack of results in this field. It does not seem that DNA methylation quantification can replace cytology and cystoscopy for the initial detection of BC presently; the two golden techniques are more efficient. But this new technique has better sensitivity than cytology, and could, therefore, replace this technique for recurrence surveillance, allowing for the reduction of cystoscopy frequency.

3.2.6. Uromonitor

The Uromonitor assay allows for the detection of TERT promoter mutations and FGFR3 hotspot mutations in tumor cells exfoliated into urine samples [123]. Cells are filtrated from urine and analyzed with multiplex competitive allele-specific discrimination PCR. The Uromonitor assay has been tested in 185 samples to assess its sensitivity and specificity against cytology/cystoscopy. A sensitivity of 73.5% and a specificity of 93.2% for BC recurrence detection were obtained. These results are comparable to cystoscopy and better than cytology, according to the authors [123]. When used with cystoscopy, they obtained 100% sensitivity and 88.6% specificity. This assay could be completed with the detection of KRAS, as it shows encouraging results. However, 20% of BC does not seem to be detected by the Uromonitor assay, probably due to the fact that not all BCs are reported to have TERT promoter and FGFR3 mutations. Uromonitor could be used for monitoring BC recurrence, and not BC primary diagnostic, because more than 20% of first BC tumors are not due to TERT promoter or FGFR3 mutations. The use of Uromonitor in the replacement of cytology could improve confidence at detecting BC recurrence and diminish cystoscopy frequency.

4. Discussion

Liquid biopsies are increasingly used for the diagnosis and follow-up of cancer patients. Indeed, urine and blood are largely used as liquid biopsies to detect markers, such as circulating cell free DNA, microRNA, circular RNA, non-coding RNA, proteins, cells etc. [124–126]. Urine is a body fluid that can be used to detect cancers and other diseases. It is noninvasive and easy to collect. Other types of cancer, completely independent of the genitourinary system, can also be detected using urine, such as breast cancer or Glioblastoma [124]. To detect BC, cytology is the first assay used. It is an effective way to detect high-grade BC and CIS, but with a high rate of equivocal results, especially for low-grade BC. As such, cystoscopy is used to confirm cytology results and to determine cancer status. Cystoscopy is also effective, but invasive, recurrent, and not well accepted by all patients, especially during BC follow-up. As shown in this review, numerous assays were developed during the past few years in order to diagnose BC at an early stage, and to facilitate the follow-up of patients. For BC screening, an assay should be less invasive (noninvasive, if possible) with a high sensitivity, especially for low grade BC, but it is also important to have a high specificity to avoid further unnecessary invasive procedures. Therefore, it should not be solely based on morphology and should be sufficient to detect BC at any stage. Most of the assays described in this review do not fit these criteria, or, at least, are used in combination with cytology and cystoscopy, such as ImmunoCyt/uCyt+™. Some assays are dedicated to one specific stage of BC, such as Assure Mdx and Xpert assays. Some of the tests could not be used for the initial diagnostic, such as NMP22 BladderChek®, Urovysion or Cxbladder. This is one of the critical points—the tests do not allow detection of BC at an early stage with high sensitivity.

For diagnosis, an assay's specificity and sensitivity must be very high. Price should not be an issue, as a low number of persons would undergo it based on an efficient screening assay. None of the assays described above can compete with cystoscopy for definitive diagnosis.

For the follow-up of patients, one of the major issues is the invasiveness of tests and their repetition over time. The recurrence of these invasive tests can lead to urinary tract infections, pain, or discomfort, leading to the patient's own discontinuation of follow-up care. In addition, lifelong follow-up leads to heavy financial burdens. Therefore, noninvasive assays with a high specificity, high sensitivity, and moderate cost would be greatly beneficial. Many of the assays described here could, or are, used as follow-up assays, especially because some of them have high specificity and sensitivity, and are specific to stages of BC and as easy to perform as BTA assays. Therefore, follow-up assays could be selected according to patient profile and effectiveness. Urovysion assays and UroSEEK assays seem to work for BC recurrence detection.

To date, assays are efficient in the advanced BC stage for the diagnosis and follow-up of patients. Unfortunately, for the initial screening of patients, especially for low-grade cancer patients, assays lack effectiveness. These types of assays are crucial, as they could save lives by detecting BC sooner. They could also considerably reduce overall BC cost. New assays are in development and there are not enough data available yet to describe them in this review, but they could fill some of the gap in the future. Thus, miRNA could be used to develop diagnostic tests for bladder cancer, since they are stable in body fluids and could, therefore, be easily used to develop noninvasive tests. In fact, several miRNA misregulations are associated with bladder cancer development and outcome prediction, such as miRNA-155, 21-miRNA, miRNA-1178, etc. [127–129]. An interesting meta-analysis about urine miRNA tests to detect BC was published in 2018 [130]. According to Kutwin et al., a test studying multiple miRNA, and not just one, could compete with cytology tests; however, there is still a need to perform clinical trials to validate this hypothesis. Another possible future test is based on an improved cytology reading thanks to artificial intelligence. A specific urine preparation could allow the visualization of urothelial cells, coupled with an image processing algorithm of urinary cytology slides. This assay, called Visiocytt, is described as sensitive for low-grade BC. Other assays could rely on next generation sequencing (NGS), allowing detection of a low amount of cancer DNA in urine.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13071650/s1>, Table S1: Performances of non-invasive tests.

Author Contributions: R.P. was responsible for the ideation, M.C. and C.G. performed the literature search and analysis; M.C., C.G., T.G., G.V. and R.P. drafted the manuscript; M.C., C.G. and R.P. revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: M.C., C.G., T.G. and R.P. were funded by Region Bretagne, European Regional Development Fund, Rennes Metropole, VitaDX, University Rennes 1 and INSERM.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We are grateful to Laëtitia Lallement and Allan Rodriguez for kindly reviewing this manuscript, and to Praticò for language editing.

Conflicts of Interest: The authors received fundings from VitaDX.

References

1. Binder-Foucard, F.; Bossard, N.; Delafosse, P.; Belot, A.; Woronoff, A.-S.; Remontet, L. Cancer Incidence and Mortality in France over the 1980–2012 Period: Solid Tumors. *Rev. D'Épidémiol. Santé Publique* **2014**, *62*, 95–108. [CrossRef]
2. Leal, J.; Luengo-Fernandez, R.; Sullivan, R.; Witjes, J.A. Economic Burden of Bladder Cancer Across the European Union. *Eur. Urol.* **2016**, *69*, 438–447. [CrossRef] [PubMed]
3. Farling, K.B. Bladder Cancer: Risk Factors, Diagnosis, and Management. *Nurse Pract.* **2017**, *42*, 26–33. [CrossRef] [PubMed]
4. Amin, M.B.; Greene, F.L.; Edge, S.B.; Compton, C.C.; Gershengwald, J.E.; Brookland, R.K.; Meyer, L.; Gress, D.M.; Byrd, D.R.; Winchester, D.P. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to Build a Bridge from a Population-Based to a More “Personalized” Approach to Cancer Staging. *CA Cancer J. Clin.* **2017**, *67*, 93–99. [CrossRef]

5. Griffiths, T.R.L. Current Perspectives in Bladder Cancer Management. *Int. J. Clin. Pract.* **2013**, *67*, 435–448. [CrossRef] [PubMed]
6. Sharp, V.J.; Barnes, K.T.; Erickson, B.A. Assessment of Asymptomatic Microscopic Hematuria in Adults. *Am. Fam. Phys.* **2013**, *88*, 8.
7. Barkan, G.A.; Wojcik, E.M.; Nayar, R.; Savic-Prince, S.; Quek, M.L.; Kurtycz, D.F.I.; Rosenthal, D.L. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology. *Acta Cytol.* **2016**, *60*, 185–197. [CrossRef]
8. Owens, C.L.; Vanden Bussche, C.J.; Burroughs, F.H.; Rosenthal, D.L. A Review of Reporting Systems and Terminology for Urine Cytology. *Cancer Cytopathol.* **2013**, *121*, 9–14. [CrossRef] [PubMed]
9. Roupêt, M.; Pignot, G.; Masson-Lecomte, A.; Compérat, E.; Audenet, F.; Roumiguié, M.; Houédé, N.; Larré, S.; Brunelle, S.; Xylinas, E.; et al. Recommandations françaises du Comité de cancérologie de l'AFU—Actualisation 2020–2022: Tumeurs de la vessie. *Prog. En Urol.* **2020**, *30*, S78–S135. [CrossRef]
10. Zhu, C.-Z.; Ting, H.-N.; Ng, K.-H.; Ong, T.-A. A Review on the Accuracy of Bladder Cancer Detection Methods. *J. Cancer* **2019**, *10*, 4038–4044. [CrossRef]
11. Malmström, P.-U.; Agrawal, S.; Bläckberg, M.; Boström, P.J.; Malavaud, B.; Zaak, D.; Hermann, G.G. Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Vision for the Future. *Scand. J. Urol.* **2017**, *51*, 87–94. [CrossRef] [PubMed]
12. Pfister, C.; Roupêt, M.; Neuzillet, Y.; Larré, S.; Pignot, G.; Quintens, H.; Houédé, N.; Compérat, E.; Colin, P.; Roy, C.; et al. Recommandations en onco-urologie 2013 du CCAFU: Tumeurs de la vessie. *Prog. Urol.* **2013**, *23*, S105–S125. [CrossRef]
13. Oeyen, E.; Hoekx, L.; De Wachter, S.; Baldewijns, M.; Amey, F.; Mertens, I. Bladder Cancer Diagnosis and Follow-Up: The Current Status and Possible Role of Extracellular Vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 821. [CrossRef] [PubMed]
14. Sloan, F.A.; Yashkin, A.P.; Akushevich, I.; Inman, B.A. The Cost to Medicare of Bladder Cancer Care. *Eur. Urol. Oncol.* **2020**, *3*, 515–522. [CrossRef] [PubMed]
15. Barratt, J.; Topham, P. Urine Proteomics: The Present and Future of Measuring Urinary Protein Components in Disease. *Can. Med. Assoc. J.* **2007**, *177*, 361–368. [CrossRef] [PubMed]
16. Thomas, C.E.; Sexton, W.; Benson, K.; Sutphen, R.; Koomen, J. Urine Collection and Processing for Protein Biomarker Discovery and Quantification. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2010**, *19*, 953–959. [CrossRef]
17. The Finn Bladder Group; Raitanen, M.-P.; Kaasinen, E.; Rintala, E.; Hansson, E.; Nieminen, P.; Aine, R.; Tammela, T.L.J. Prognostic Utility of Human Complement Factor H Related Protein Test (the BTA Stat[®] Test). *Br. J. Cancer* **2001**, *85*, 552–556. [CrossRef]
18. Kinders, R.; Jones, T.; Root, R.; Bruce, C.; Murchison, H.; Corey, M.; Williams, L.; Enfield, D.; Hass, G.M. Complement Factor H or a Related Protein Is a Marker for Transitional Cell Cancer of the Bladder. *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4*, 2511–2520.
19. Gutiérrez Baños, J.L.; Rodrigo, M.d.H.R.; Juárez, F.M.A.; García, B.M. Usefulness of the BTA Stat Test for the Diagnosis of Bladder Cancer. *Urology* **2001**, *57*, 685–689. [CrossRef]
20. Thomas, L.; Leyh, H.; Marberger, M.; Bombardieri, E.; Bassi, P.; Pagano, F.; Pansadoro, V.; Sternberg, C.N.; Boccon-Gibod, L.; Ravery, V.; et al. Multicenter Trial of the Quantitative BTA TRAK Assay in the Detection of Bladder Cancer. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 472–477.
21. Shariat, S.F.; Karam, J.A.; Lotan, Y.; Karakiewicz, P.I. Critical Evaluation of Urinary Markers for Bladder Cancer Detection and Monitoring. *Rev. Urol.* **2008**, *10*, 120–135. [PubMed]
22. Campos-Fernandes, J.-L.; Descotes, F.; André, J.; Perrin, P.; Devonec, M.; Ruffion, A. Value of urinary markers in the diagnosis and follow-up of urothelial bladder tumours. *Prog. Urol. J. Assoc. Fr. Urol. Soc. Fr. Urol.* **2007**, *17*, 23–34. [CrossRef]
23. Budman, L.I.; Kassouf, W.; Steinberg, J.R. Biomarkers for Detection and Surveillance of Bladder Cancer. *Can. Urol. Assoc. J.* **2008**, *2*, 212–221. [CrossRef] [PubMed]
24. Bibbo, M.; Kern, W.H. Chapter 15—Urinary Tract. In *Comprehensive Cytopathology*, 3rd ed.; Bibbo, M., Wilbur, D., Eds.; W.B. Saunders: Edinburgh, UK, 2008; pp. 409–437. ISBN 978-1-4160-4208-2.
25. Miyanaga, N.; Akaza, H.; Tsukamoto, T.; Ishikawa, S.; Noguchi, R.; Ohtani, M.; Kawabe, K.; Kubota, Y.; Fujita, K.; Obata, K.; et al. Urinary Nuclear Matrix Protein 22 as a New Marker for the Screening of Urothelial Cancer in Patients with Microscopic Hematuria. *Int. J. Urol.* **1999**, *6*, 173–177. [CrossRef]
26. Balci, M.; Tuncel, A.; Guzel, O.; Aslan, Y.; Sezgin, T.; Bilgin, O.; Senel, C.; Atan, A. Use of the Nuclear Matrix Protein 22 Bladder Chek TestTM in the Diagnosis of Residual Urothelial Cancer before a Second Transurethral Resection of Bladder Cancer. *Int. Urol. Nephrol.* **2015**, *47*, 473–477. [CrossRef] [PubMed]
27. Gellhaus, P.T.; Genetic Aberrations in Bladder Cancer, Fluorescence in Situ Hybridization. In *Urine Tumor Markers in Bladder Cancer Diagnosis: Overview of Urine Tumor Markers*; 2020. Available online: <https://emedicine.medscape.com/article/195302-2-overview> (accessed on 1 March 2021).
28. Mowatt, G.; Zhu, S.; Kilonzo, M.; Boachie, C.; Fraser, C.; Griffiths, T.R.L.; N'Dow, J.; Nabi, G.; Cook, J.; Vale, L. Systematic Review of the Clinical Effectiveness and Cost-Effectiveness of Photodynamic Diagnosis and Urine Biomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and Cytology for the Detection and Follow-up of Bladder Cancer. *Health Technol. Assess.* **2010**, *14*, 1–331. [CrossRef]
29. Moonen, P.M.J.; Kiemeny, L.A.L.M.; Witjes, J.A. Urinary NMP22[®] BladderChek[®] Test in the Diagnosis of Superficial Bladder Cancer. *Eur. Urol.* **2005**, *48*, 951–956. [CrossRef]
30. Doğan, C.; Pelit, E.S.; Yıldırım, A.; Zemheri, I.E.; Çanakçı, C.; Başoğlu, E.K.; Çaşkurlu, T. The Value of the NMP22 Test for Superficial Bladder Cancer Diagnosis and Follow-Up. *Turk. J. Urol.* **2013**, *39*, 137–142. [CrossRef] [PubMed]
31. Kumar, A.; Kumar, R.; Gupta, N.P. Comparison of NMP22 BladderChek Test and Urine Cytology for the Detection of Recurrent Bladder Cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2006**, *36*, 172–175. [CrossRef]

32. Fradet, Y.; Larue, H.; Parent-Vaugeois, C.; Bergeron, A.; Dufour, C.; Boucher, L.; Bernier, L. Monoclonal Antibody against a Tumor-Associated Sialoglycoprotein of Superficial Papillary Bladder Tumors and Cervical Condylomas. *Int. J. Cancer* **1990**, *46*, 990–997. [[CrossRef](#)]
33. Bergeron, A.; LaRue, H.; Fradet, Y. Identification of a Superficial Bladder Tumor-Associated Glycoform of the Carcinoembryonic Antigen by Monoclonal Antibody 19A211. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 908–915. [[PubMed](#)]
34. Têtu, B.; Tiguert, R.; Harel, F.; Fradet, Y. ImmunoCyt/uCyt+TM Improves the Sensitivity of Urine Cytology in Patients Followed for Urothelial Carcinoma. *Mod. Pathol.* **2005**, *18*, 83–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bergeron, A.; Champetier, S.; LaRue, H.; Fradet, Y. MAUB Is a New Mucin Antigen Associated with Bladder Cancer. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6933–6940. [[CrossRef](#)]
36. Bergeron, A.; LaRUE, H.; Fradet, Y. Biochemical Analysis of a Bladder-Cancer-Associated Mucin: Structural Features and Epitope Characterization. *Biochem. J.* **1997**, *321*, 889–896. [[CrossRef](#)]
37. Allard, P.; Fradet, Y.; Têtu, B.; Bernard, P. Tumor-Associated Antigens as Prognostic Factors for Recurrence in 382 Patients with Primary Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Clin. Cancer Res.* **1995**, *1*, 1195–1202. [[PubMed](#)]
38. Greene, K.L.; Berry, A.; Konety, B.R. Diagnostic Utility of the ImmunoCyt/uCyt+ Test in Bladder Cancer. *Rev. Urol.* **2006**, *8*, 190–197.
39. Piaton, E.; Daniel, L.; Verrielle, V.; Dalifard, I.; Zimmermann, U.; Renaudin, K.; Gobet, F.; Caratero, A.; Desvaux, D.; Pouille, Y.; et al. Improved Detection of Urothelial Carcinomas with Fluorescence Immunocytochemistry (UCyt+ Assay) and Urinary Cytology: Results of a French Prospective Multicenter Study. *Lab. Investig.* **2003**, *83*, 845–852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Schmitz-Dräger, C.; Bonberg, N.; Pesch, B.; Todenhöfer, T.; Sahin, S.; Behrens, T.; Brüning, T.; Schmitz-Dräger, B.J. Replacing Cystoscopy by Urine Markers in the Follow-up of Patients with Low-Risk Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer?—An International Bladder Cancer Network Project. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2016**, *34*, 452–459. [[CrossRef](#)]
41. Kassouf, W.; Traboulsi, S.L.; Schmitz-Dräger, B.; Palou, J.; Witjes, J.A.; van Rhijn, B.W.G.; Grossman, H.B.; Kiemeny, L.A.; Goebell, P.J.; Kamat, A.M. Follow-up in Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer—International Bladder Cancer Network Recommendations. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2016**, *34*, 460–468. [[CrossRef](#)]
42. Björklund, B.; Björklund, V. Antigenicity of Pooled Human Malignant and Normal Tissues by Cyto-Immunological Technique: Presence of an Insoluble, Heat-Labile Tumor Antigen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1957**, *10*, 153–184. [[CrossRef](#)]
43. Lünig, B.; Wiklund, B.; Redelius, P.; Björklund, B. Biochemical Properties of Tissue Polypeptide Antigen. *Biochim. Biophys. Acta BBA Protein Struct.* **1980**, *624*, 90–101. [[CrossRef](#)]
44. Maulard-Durdux, C.; Toubert, M.E.; Hennequin, C.; Housset, M. Serum Tissue Polypeptide Antigen in Bladder Cancer as a Tumor Marker: A Prospective Study. *J. Clin. Oncol.* **1997**, *15*, 3446–3450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Sánchez-Carbayo, M.; Urrutia, M.; Silva, J.M.; Romani, R.; García, J.; Alférez, F.; González de Buitrago, J.M.; Navajo, J.A. Urinary Tissue Polypeptide-Specific Antigen for the Diagnosis of Bladder Cancer. *Urology* **2000**, *55*, 526–532. [[CrossRef](#)]
46. Ritter, R.; Hennenlotter, J.; Kühs, U.; Hofmann, U.; Aufderklamm, S.; Blutbacher, P.; Deja, A.; Hohneder, A.; Gerber, V.; Gakis, G.; et al. Evaluation of a New Quantitative Point-of-Care Test Platform for Urine-Based Detection of Bladder Cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2014**, *32*, 337–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ecke, T.H.; Arndt, C.; Stephan, C.; Hallmann, S.; Lux, O.; Otto, T.; Ruttloff, J.; Gerullis, H. Preliminary Results of a Multicentre Study of the UBC Rapid Test for Detection of Urinary Bladder Cancer. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 2651–2655.
48. Ecke, T.H.; Weiß, S.; Stephan, C.; Hallmann, S.; Barski, D.; Otto, T.; Gerullis, H. UBC[®] Rapid Test for Detection of Carcinoma in Situ for Bladder Cancer. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, 101042831770162. [[CrossRef](#)]
49. Pichler, R.; Tulchiner, G.; Fritz, J.; Schaefer, G.; Horninger, W.; Heidegger, I. Urinary UBC Rapid and NMP22 Test for Bladder Cancer Surveillance in Comparison to Urinary Cytology: Results from a Prospective Single-Center Study. *Int. J. Med. Sci.* **2017**, *14*, 811–819. [[CrossRef](#)]
50. Mourant, A.E. A ‘New’ Human Blood Group Antigen of Frequent Occurrence. *Nature* **1946**, *158*, 237–238. [[CrossRef](#)]
51. Itzkowitz, S.H.; Yuan, M.; Fukushi, Y.; Palekar, A.; Phelps, P.C.; Shamsuddin, A.M.; Trump, B.F.; Hakomori, S.; Kim, Y.S. Lewis^X- and Sialylated Lewis^X-Related Antigen Expression in Human Malignant and Nonmalignant Colonie Tissues. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 2627–2632.
52. Pode, D.; Golijanin, D.; Sherman, Y.; Lebensart, P.; Shapiro, A. Immunostaining of Lewis X in cells from voided urine, cytopathology and ultrasound for noninvasive detection of bladder tumors. *J. Urol.* **1998**, *159*, 389–393. [[CrossRef](#)]
53. Planz, B.; Synek, C.; Deix, T.; Böcking, A.; Marberger, M. Diagnosis of Bladder Cancer with Urinary Cytology, Immunocytology and DNA-Image-Cytometry. *Anal. Cell. Pathol.* **2001**, *22*, 103–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Golijanin, D.; Sherman, Y.; Shapiro, A.; Pode, D. Detection of Bladder Tumors by Immunostaininc of the Lewis x Antigen in Cells from Voided Urine. *Urology* **1995**, *46*, 173–177. [[CrossRef](#)]
55. Ambrosini, G.; Adida, C.; Altieri, D.C. A Novel Anti-Apoptosis Gene, Survivin, Expressed in Cancer and Lymphoma. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 917–921. [[CrossRef](#)]
56. Li, F.; Ambrosini, G.; Chu, E.Y.; Plescia, J.; Tognin, S.; Marchisio, P.C.; Altieri, D.C. Control of Apoptosis and Mitotic Spindle Checkpoint by Survivin. *Nature* **1998**, *396*, 580–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Li, F.; Ackermann, E.J.; Bennett, C.F.; Rothermel, A.L.; Plescia, J.; Tognin, S.; Villa, A.; Marchisio, P.C.; Altieri, D.C. Pleiotropic Cell-Division Defects and Apoptosis Induced by Interference with Survivin Function. *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*, 461–466. [[CrossRef](#)]

58. Altieri, D.C.; Marchisio, P.C.; Marchisio, C. Survivin Apoptosis: An Interloper between Cell Death and Cell Proliferation in Cancer. *Lab. Investig.* **1999**, *79*, 1327–1333.
59. Reed, J.C. The Survivin Saga Goes In Vivo. *J. Clin. Investig.* **2001**, *108*, 965–969. [[CrossRef](#)]
60. Satoh, K.; Kaneko, K.; Hirota, M.; Masamune, A.; Satoh, A.; Shimosegawa, T. Expression of Survivin Is Correlated with Cancer Cell Apoptosis and Is Involved in the Development of Human Pancreatic Duct Cell Tumors. *Cancer* **2001**, *92*, 271–278. [[CrossRef](#)]
61. Tanaka, C.; Uzawa, K.; Shibahara, T.; Yokoe, H.; Noma, H.; Tanzawa, H. Expression of an Inhibitor of Apoptosis, Survivin, in Oral Carcinogenesis. *J. Dent. Res.* **2003**, *82*, 607–611. [[CrossRef](#)]
62. Dallaglio, K.; Marconi, A.; Pincelli, C. Survivin: A Dual Player in Healthy and Diseased Skin. *J. Investig. Dermatol.* **2012**, *132*, 18–27. [[CrossRef](#)]
63. Eissa, S.; Swellam, M.; Shehata, H.; El-Khouly, I.M.; El-Zayat, T.; El-Ahmady, O. Expression of *HYAL1* and Survivin RNA as Diagnostic Molecular Markers for Bladder Cancer. *J. Urol.* **2010**, *183*, 493–498. [[CrossRef](#)]
64. Wang, H.; Xi, X.; Kong, X.; Huang, G.; Ge, G. The Expression and Significance of Survivin mRNA in Urinary Bladder Carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2004**, *130*, 487–490. [[CrossRef](#)]
65. Smith, S.D.; Wheeler, M.A.; Plescia, J.; Colberg, J.W.; Weiss, R.M.; Altieri, D.C. Urine Detection of Survivin and Diagnosis of Bladder Cancer. *JAMA* **2001**, *285*, 324–328. [[CrossRef](#)]
66. Lokeshwar, V.B.; Block, N.L. HA-HAase URINE TEST: A Sensitive and Specific Method for Detecting Bladder Cancer and Evaluating Its Grade. *Urol. Clin. N. Am.* **2000**, *27*, 53–61. [[CrossRef](#)]
67. Knudson, W. Tumor-Associated Hyaluronan. *Am. J. Pathol.* **1996**, *148*, 1721–1726. [[PubMed](#)]
68. Pham, H.T.; Block, N.L.; Lokeshwar, V.B. Tumor-Derived Hyaluronidase: A Diagnostic Urine Marker for High-Grade Bladder Cancer. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Kramer, M.W.; Golshani, R.; Merseburger, A.S.; Knapp, J.; Garcia, A.; Hennenlotter, J.; Duncan, R.C.; Soloway, M.S.; Jorda, M.; Kuczyk, M.A.; et al. HYAL-1 Hyaluronidase: A Potential Prognostic Indicator for Progression to Muscle Invasion and Recurrence in Bladder Cancer. *Eur. Urol.* **2010**, *57*, 86–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Morera, D.S.; Hennig, M.S.; Talukder, A.; Lokeshwar, S.D.; Wang, J.; Garcia-Roig, M.; Ortiz, N.; Yates, T.J.; Lopez, L.E.; Kallifatidis, G.; et al. Hyaluronic Acid Family in Bladder Cancer: Potential Prognostic Biomarkers and Therapeutic Targets. *Br. J. Cancer* **2017**, *117*, 1507–1517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Van Tilborg, A.A.G.; Bangma, C.H.; Zwarthoff, E.C. Bladder Cancer Biomarkers and Their Role in Surveillance and Screening. *Int. J. Urol.* **2009**, *16*, 23–30. [[CrossRef](#)]
72. Parker, J.; Spiess, P.E. Current and Emerging Bladder Cancer Urinary Biomarkers. *Sci. World J.* **2011**, *11*, 1103–1112. [[CrossRef](#)]
73. Liang, Z.; Zhang, Q.; Wang, C.; Shi, F.; Cao, H.; Yu, Y.; Zhang, M.; Liu, X. Hyaluronic Acid/ Hyaluronidase as Biomarkers for Bladder Cancer: A Diagnostic Meta-Analysis. *Neoplasia* **2017**, *64*, 901–908. [[CrossRef](#)]
74. Konety, B.R.; Nguyen, T.-S.T.; Dhir, R.; Day, R.S.; Becich, M.J.; Stadler, W.M.; Getzenberg, R.H. Detection of Bladder Cancer Using a Novel Nuclear Matrix Protein, BLCA-4. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2618–2625.
75. Getzenberg, R.H.; Konety, B.R.; Oeler, T.A.; Quigley, M.M.; Hakam, A.; Becich, M.J.; Bahnson, R.R. Bladder Cancer-Associated Nuclear Matrix Proteins. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 1690.
76. Myers-Irvin, J.M.; Landsit, D.; Getzenberg, R.H. Use of the novel marker blca-1 for the detection of bladder cancer. *J. Urol.* **2005**, *174*, 64–68. [[CrossRef](#)]
77. Santoni, M.; Catanzariti, F.; Minardi, D.; Burattini, L.; Nabissi, M.; Muzzonigro, G.; Cascinu, S.; Santoni, G. Pathogenic and Diagnostic Potential of BLCA-1 and BLCA-4 Nuclear Proteins in Urothelial Cell Carcinoma of Human Bladder. *Adv. Urol.* **2012**, *2012*, 397412. [[CrossRef](#)]
78. Lotan, Y.; Roehrborn, C.G. Sensitivity and Specificity of Commonly Available Bladder Tumor Markers versus Cytology: Results of a Comprehensive Literature Review and Meta-Analyses. *Urology* **2003**, *61*, 109–118. [[CrossRef](#)]
79. Cai, Q.; Wu, Y.; Guo, Z.; Gong, R.; Tang, Y.; Yang, K.; Li, X.; Guo, X.; Niu, Y.; Zhao, Y. Urine BLCA-4 Exerts Potential Role in Detecting Patients with Bladder Cancers: A Pooled Analysis of Individual Studies. *Oncotarget* **2015**, *6*, 37500–37510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Wang, S.; Xia, T.; Zhang, Z.; Kong, X.; Zeng, L.; Mi, P.; Xue, Z. Expression of VEGF and Tumor Angiogenesis in Bladder Cancer. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* **2000**, *38*, 34–36.
81. Schmetter, B.S.; Habicht, K.K.; Lamm, D.L.; Morales, A.; Bander, N.H.; Grossman, H.B.; Hanna, M.G.J.; Silberman, S.R.; Butman, B.T. A Multicenter Trial Evaluation of the Fibrin/Fibrinogen Degradation Products Test for Detection and Monitoring of Bladder Cancer. *J. Urol.* **1997**, *158*, 801–805. [[CrossRef](#)]
82. Topsakal, M.; Karadeniz, T.; Anaç, M.; Dönmezer, S.; Besisik, A. Assessment of Fibrin–Fibrinogen Degradation Products (Accu–Dx) Test in Bladder Cancer Patients. *Eur. Urol.* **2001**, *39*, 287–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Wajzman, Z.; Williams, P.D.; Greco, J.; Murphy, G.P. Further Study of Fibrinogen Degradation Products in Bladder Cancer Detection. *Urology* **1978**, *12*, 659–661. [[CrossRef](#)]
84. Label INCa-HAS—Surveillance Médico-Professionnelle des Travailleurs Exposés ou Ayant Été Exposés à des Agents Cancérogènes Chimiques: Application aux Cancérogènes Pour la Vessie. Available online: https://www.has-sante.fr/jcms/c_1246108/fr/label-inca-has-surveillance-medico-professionnelle-des-travailleurs-exposes-ou-ayant-ete-exposes-a-des-agents-cancerogenes-chimiques-application-aux-cancerogenes-pour-la-vessie (accessed on 14 April 2020).

85. Silvers, C.R.; Miyamoto, H.; Messing, E.M.; Netto, G.J.; Lee, Y.-F. Characterization of Urinary Extracellular Vesicle Proteins in Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 91199–91208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Lin, S.-Y.; Chang, C.-H.; Wu, H.-C.; Lin, C.-C.; Chang, K.-P.; Yang, C.-R.; Huang, C.-P.; Hsu, W.-H.; Chang, C.-T.; Chen, C.-J. Proteome Profiling of Urinary Exosomes Identifies Alpha 1-Antitrypsin and H2B1K as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Urothelial Carcinoma. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34446. [[CrossRef](#)]
87. Silvers, C.R.; Liu, Y.-R.; Wu, C.-H.; Miyamoto, H.; Messing, E.M.; Lee, Y.-F. Identification of Extracellular Vesicle-Borne Periostin as a Feature of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 23335–23345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Hunter, T. Signaling—2000 and Beyond. *Cell* **2000**, *100*, 113–127. [[CrossRef](#)]
89. Sakamoto, K.; Kadomatsu, K. Midkine in the Pathology of Cancer, Neural Disease, and Inflammation. *Pathol. Int.* **2012**, *62*, 445–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Jones, D.R. Measuring Midkine: The Utility of Midkine as a Biomarker in Cancer and Other Diseases. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 2925–2939. [[CrossRef](#)]
91. Ikematsu, S.; Okamoto, K.; Yoshida, Y.; Oda, M.; Sugano-Nagano, H.; Ashida, K.; Kumai, H.; Kadomatsu, K.; Muramatsu, H.; Muramatsu, T.; et al. High Levels of Urinary Midkine in Various Cancer Patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *306*, 329–332. [[CrossRef](#)]
92. Shimwell, N.J.; Bryan, R.T.; Wei, W.; James, N.D.; Cheng, K.K.; Zeegers, M.P.; Johnson, P.J.; Martin, A.; Ward, D.G. Combined Proteome and Transcriptome Analyses for the Discovery of Urinary Biomarkers for Urothelial Carcinoma. *Br. J. Cancer* **2013**, *108*, 1854–1861. [[CrossRef](#)]
93. Soukup, V.; Kalousová, M.; Capoun, O.; Sobotka, R.; Breyl, Z.; Pešl, M.; Zima, T.; Hanuš, T. Panel of Urinary Diagnostic Markers for Non-Invasive Detection of Primary and Recurrent Urothelial Urinary Bladder Carcinoma. *Urol. Int.* **2015**, *95*, 56–64. [[CrossRef](#)]
94. Vu Van, D.; Heberling, U.; Wirth, M.P.; Fuessel, S. Validation of the Diagnostic Utility of Urinary Midkine for the Detection of Bladder Cancer. *Oncol. Lett.* **2016**, *12*, 3143–3152. [[CrossRef](#)]
95. Luo, Y.; She, D.-L.; Xiong, H.; Yang, L.; Fu, S.-J. Diagnostic Value of Liquid-Based Cytology in Urothelial Carcinoma Diagnosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0134940. [[CrossRef](#)]
96. Kapoor, K.; Datta, C.; Pal, D.K. Is Liquid-Based Cytology an Alternative to Conventional Cytology for Detection of Malignant Cells in Urine of Bladder Cancer? Eastern Indian Prospective Observational Study. *Turk. J. Urol.* **2019**, *45*, 351–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Lee, H.; Kim, K.; Woo, J.; Park, J.; Kim, H.; Lee, K.E.; Kim, H.; Kim, Y.; Moon, K.C.; Kim, J.Y.; et al. Quantitative Proteomic Analysis Identifies AHNAK (Neuroblast Differentiation-Associated Protein AHNAK) as a Novel Candidate Biomarker for Bladder Urothelial Carcinoma Diagnosis by Liquid-Based Cytology. *Mol. Cell. Proteom.* **2018**, *17*, 1788–1802. [[CrossRef](#)]
98. Sokolova, I.A.; Halling, K.C.; Jenkins, R.B.; Burkhardt, H.M.; Meyer, R.G.; Seelig, S.A.; King, W. The Development of a Multitargeted, Multicolor Fluorescence in Situ Hybridization Assay for the Detection of Urothelial Carcinoma in Urine. *J. Mol. Diagn. JMD* **2000**, *2*, 116–123. [[CrossRef](#)]
99. van Valenberg, F.J.P.; Strauss-Ayali, D.; Agmon-Gerstein, Y.; Friedman, A.; Arentsen, H.C.; Schaafsma, H.E.; Witjes, J.A.; Oosterwijk, E. Assessment of the Efficacy of Repeated Instillations of Mitomycin C Mixed with a Thermosensitive Hydrogel in an Orthotopic Rat Bladder Cancer Model. *Ther. Adv. Urol.* **2018**, *10*, 213–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Yoder, B.J.; Skacel, M.; Hedgepeth, R.; Babineau, D.; Ulchaker, J.C.; Liou, L.S.; Brainard, J.A.; Biscotti, C.V.; Jones, J.S.; Tubbs, R.R. Reflex UroVysion Testing of Bladder Cancer Surveillance Patients with Equivocal or Negative Urine Cytology: A Prospective Study with Focus on the Natural History of Anticipatory Positive Findings. *Am. J. Clin. Pathol.* **2007**, *127*, 295–301. [[CrossRef](#)]
101. Kojima, T.; Nishiyama, H.; Ozono, S.; Hinotsu, S.; Keino, N.; Yamaguchi, A.; Sakai, H.; Enomoto, Y.; Horie, S.; Fujimoto, K.; et al. Clinical Evaluation of Two Consecutive UroVysion Fluorescence in Situ Hybridization Tests to Detect Intravesical Recurrence of Bladder Cancer: A Prospective Blinded Comparative Study in Japan. *Int. J. Clin. Oncol.* **2018**, *23*, 1140–1147. [[CrossRef](#)]
102. Holyoake, A.; O'Sullivan, P.; Pollock, R.; Best, T.; Watanabe, J.; Kajita, Y.; Matsui, Y.; Ito, M.; Nishiyama, H.; Kerr, N.; et al. Development of a Multiplex RNA Urine Test for the Detection and Stratification of Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 742–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. O'Sullivan, P.; Sharples, K.; Dalphin, M.; Davidson, P.; Gilling, P.; Cambridge, L.; Harvey, J.; Toro, T.; Giles, N.; Luxmanan, C.; et al. A Multigene Urine Test for the Detection and Stratification of Bladder Cancer in Patients Presenting with Hematuria. *J. Urol.* **2012**, *188*, 741–747. [[CrossRef](#)]
104. Kavalieris, L.; O'Sullivan, P.J.; Suttie, J.M.; Pownall, B.K.; Gilling, P.J.; Chemasle, C.; Darling, D.G. A Segregation Index Combining Phenotypic (Clinical Characteristics) and Genotypic (Gene Expression) Biomarkers from a Urine Sample to Triage out Patients Presenting with Hematuria Who Have a Low Probability of Urothelial Carcinoma. *BMC Urol.* **2015**, *15*, 23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Darling, D.; Luxmanan, C.; O'Sullivan, P.; Lough, T.; Suttie, J. Clinical Utility of Cxbladder for the Diagnosis of Urothelial Carcinoma. *Adv. Ther.* **2017**, *34*, 1087–1096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Lough, T.; Luo, Q.; O'Sullivan, P.; Chemaslé, C.; Stotzer, M.; Suttie, J.; Darling, D. Clinical Utility of Cxbladder Monitor for Patients with a History of Urothelial Carcinoma: A Physician-Patient Real-World Clinical Data Analysis. *Oncol. Ther.* **2018**, *6*, 73–85. [[CrossRef](#)]
107. Dudley, J.C.; Schroers-Martin, J.; Lazzareschi, D.V.; Shi, W.Y.; Chen, S.B.; Esfahani, M.S.; Trivedi, D.; Chabon, J.J.; Chaudhuri, A.A.; Stehr, H.; et al. Detection and Surveillance of Bladder Cancer Using Urine Tumor DNA. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 500–509. [[CrossRef](#)]

108. Springer, S.U.; Chen, C.-H.; Rodriguez Pena, M.D.C.; Li, L.; Douville, C.; Wang, Y.; Cohen, J.D.; Taheri, D.; Silliman, N.; Schaefer, J.; et al. Non-Invasive Detection of Urothelial Cancer through the Analysis of Driver Gene Mutations and Aneuploidy. *eLife* **2018**, *7*. [[CrossRef](#)]
109. Eich, M.-L.; Rodriguez Pena, M.D.C.; Springer, S.U.; Taheri, D.; Tregnago, A.C.; Salles, D.C.; Bezerra, S.M.; Cunha, I.W.; Fujita, K.; Ertoy, D.; et al. Incidence and Distribution of UroSEEK Gene Panel in a Multi-Institutional Cohort of Bladder Urothelial Carcinoma. *Mod. Pathol.* **2019**, *32*, 1544–1550. [[CrossRef](#)]
110. de Jong, J.J.; Liu, Y.; Robertson, A.G.; Seiler, R.; Groeneveld, C.S.; van der Heijden, M.S.; Wright, J.L.; Douglas, J.; Dall’Era, M.; Crabb, S.J.; et al. Long Non-Coding RNAs Identify a Subset of Luminal Muscle-Invasive Bladder Cancer Patients with Favorable Prognosis. *Genome Med.* **2019**, *11*, 60. [[CrossRef](#)]
111. van Kessel, K.E.M.; Beukers, W.; Lurkin, I.; Ziel-van der Made, A.; van der Keur, K.A.; Boormans, J.L.; Dyrskjøet, L.; Márquez, M.; Ørntoft, T.F.; Real, F.X.; et al. Validation of a DNA Methylation-Mutation Urine Assay to Select Patients with Hematuria for Cystoscopy. *J. Urol.* **2017**, *197*, 590–595. [[CrossRef](#)]
112. Park, H.-S.; Park, W.S.; Bondaruk, J.; Tanaka, N.; Katayama, H.; Lee, S.; Spiess, P.E.; Steinberg, J.R.; Wang, Z.; Katz, R.L.; et al. Quantitation of Aurora Kinase A Gene Copy Number in Urine Sediments and Bladder Cancer Detection. *J. Natl. Cancer Inst.* **2008**, *100*, 1401–1411. [[CrossRef](#)]
113. Mobley, A.; Zhang, S.; Bondaruk, J.; Wang, Y.; Majewski, T.; Caraway, N.P.; Huang, L.; Shoshan, E.; Velazquez-Torres, G.; Nitti, G.; et al. Aurora Kinase A Is a Biomarker for Bladder Cancer Detection and Contributes to Its Aggressive Behavior. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 40714. [[CrossRef](#)]
114. Burgess, E.F.; Livasy, C.; Trufan, S.; Hartman, A.; Guerreri, R.; Naso, C.; Clark, P.E.; Grigg, C.; Symanowski, J.; Raghavan, D. High Aurora Kinase Expression Identifies Patients with Muscle-Invasive Bladder Cancer Who Have Poor Survival after Neoadjuvant Chemotherapy. *Urol. Oncol.* **2019**, *37*, 900–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Wang, L.; Shi, J.; Huang, Y.; Liu, S.; Zhang, J.; Ding, H.; Yang, J.; Chen, Z. A Six-Gene Prognostic Model Predicts Overall Survival in Bladder Cancer Patients. *Cancer Cell Int.* **2019**, *19*, 229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Reinert, T.; Borre, M.; Christiansen, A.; Hermann, G.G.; Ørntoft, T.F.; Dyrskjøet, L. Diagnosis of Bladder Cancer Recurrence Based on Urinary Levels of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM, and ZNF154 Hypermethylation. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46297. [[CrossRef](#)]
117. Maldonado, L.; Brait, M.; Michailidi, C.; Munari, E.; Driscoll, T.; Schultz, L.; Bivalacqua, T.; Schoenberg, M.; Sidransky, D.; Netto, G.J.; et al. An Epigenetic Marker Panel for Recurrence Risk Prediction of Low Grade Papillary Urothelial Cell Carcinoma (LGPUC) and Its Potential Use for Surveillance after Transurethral Resection Using Urine. *Oncotarget* **2014**, *5*, 5218–5233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Leal, A.; Sidransky, D.; Brait, M. Tissue and Cell-Free DNA-Based Epigenomic Approaches for Cancer Detection. *Clin. Chem.* **2020**, *66*, 105–116. [[CrossRef](#)]
119. D’Andrea, D.; Soria, F.; Zehetmayer, S.; Gust, K.M.; Korn, S.; Witjes, J.A.; Shariat, S.F. Diagnostic Accuracy, Clinical Utility and Influence on Decision-Making of a Methylation Urine Biomarker Test in the Surveillance of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *BJU Int.* **2019**, *123*, 959–967. [[CrossRef](#)]
120. Hermanns, T.; Savio, A.J.; Olkhov-Mitsel, E.; Mari, A.; Wettstein, M.S.; Saba, K.; Bhindi, B.; Kuk, C.; Poyet, C.; Wild, P.J.; et al. A Noninvasive Urine-Based Methylation Biomarker Panel to Detect Bladder Cancer and Discriminate Cancer Grade. *Urol. Oncol.* **2020**, *38*, 603.e1–603.e7. [[CrossRef](#)]
121. Steinbach, D.; Kaufmann, M.; Hippe, J.; Gajda, M.; Grimm, M.-O. High Detection Rate for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer Using an Approved DNA Methylation Signature Test. *Clin. Genitourin. Cancer* **2020**, *18*, 210–221. [[CrossRef](#)]
122. Zhang, N.; Chen, S.; Wu, L.; Wu, Y.; Jiang, G.; Shao, J.; Chen, L.; Sun, J.; Na, R.; Wang, X.; et al. Identification of Cancer-Specific Methylation of Gene Combination for the Diagnosis of Bladder Cancer. *J. Cancer* **2019**, *10*, 6761–6766. [[CrossRef](#)]
123. Batista, R.; Vinagre, J.; Prazeres, H.; Sampaio, C.; Peralta, P.; Conceição, P.; Sismeiro, A.; Leão, R.; Gomes, A.; Furrriel, F.; et al. Validation of a Novel, Sensitive, and Specific Urine-Based Test for Recurrence Surveillance of Patients with Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer in a Comprehensive Multicenter Study. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 1237. [[CrossRef](#)]
124. Birkó, Z.; Nagy, B.; Klekner, Á.; Virga, J. Novel Molecular Markers in Glioblastoma—Benefits of Liquid Biopsy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Pisapia, P.; Malapelle, U.; Troncone, G. Liquid Biopsy and Lung Cancer. *Acta Cytol.* **2019**, *63*, 489–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Alimirzaie, S.; Bagherzadeh, M.; Akbari, M.R. Liquid Biopsy in Breast Cancer: A Comprehensive Review. *Clin. Genet.* **2019**, *95*, 643–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Wang, H.; Men, C.-P. Correlation of Increased Expression of MicroRNA-155 in Bladder Cancer and Prognosis. *Lab. Med.* **2015**, *46*, 118–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Yin, X.-H.; Jin, Y.-H.; Cao, Y.; Wong, Y.; Weng, H.; Sun, C.; Deng, J.-H.; Zeng, X.-T. Development of a 21-MiRNA Signature Associated With the Prognosis of Patients With Bladder Cancer. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Bi, J.; Liu, H.; Dong, W.; Xie, W.; He, Q.; Cai, Z.; Huang, J.; Lin, T. Circular RNA Circ-ZKSCAN1 Inhibits Bladder Cancer Progression through MiR-1178-3p/P21 Axis and Acts as a Prognostic Factor of Recurrence. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 133. [[CrossRef](#)]
130. Kutwin, P.; Konecki, T.; Jabłonowski, Z. Urine MiRNA as a Potential Biomarker for Bladder Cancer Detection—A Meta-Analysis. *Cent. Eur. J. Urol.* **2018**, *71*, 177–185. [[CrossRef](#)]

Annexe revue

Table 1. Performances of non-invasive tests.

Test	Specificity	Sensitivity	Cohort	Publication
BTA-TRAK-BTA-STAT	68-72%	57-83%	from 40 to 163 patients (total of 1874)	[29-21, 23]
Alere NMP22-NMP22 BladderChek	79%	68%-65%	Total of 22 260 patients	[28-30]
Immunocyt-uCyt+	62%-84,2%	38,5%-92,1%	Total of 4 199 patients	[30,38-39]
UBC Rapid test	77,3%-81,8%	61,3%-64,5%	From to 31 to 452 (total of 773)	[46-49]
Lewis X antigen	85%	75%	From 101 to 260 (total of 361)	[52, 54]
Survivin	80%-90%	100%	From 30 to 46 (total of 188)	[64, 65]
HA-Haase test	82,50%	90,80%	From 51 to 504 (total of 1613)	[66, 73]
BLCA-1	87%	80%	71 patients	[76]
BLCA-4	97%	93%	From 76 to 253 patients (total of 1372)	[78, 79]
Accu-Dx FDP	68%-86%	52%-83%	From 56 to 97 patients (total of 153)	[82, 83]
Tumor-secreted extracellular vesicles	87,60%	62,70%	From 6 to 191 patients (total of 197)	[85, 86]
Urinary midkine protein	77,90%	69,70%	162 patients	[94]
Urovysion	80%-92%	74%-84%	From 179 to 400 patients	[98-101]
Xpert bladder cancer monitor	91%	84%	140 patients	[49]
CxBladder detect	85%-90%	47%-100%	From 152 to 485 patients	[102-105]
uCAPP-Seq		77%-100%	185 patients	[107]
UroSEEK	80%-93%	83%-95%	From 537 to 583 patients	[108-110]
Assure Mdx	86%	93%	200 patients	[111]
AURKA	80%-97%	80%-87%	From 248 to 487 patients	[112-115]
DNA methylation	94%-100%	82%-94%	From 36 to 440 patients	[116-122]
Uromonitor	93%	74%	185 patients	[123]

4.4 Recommandations

Selon l'Association Française d'Urologie, la cytologie urinaire et la cystoscopie restent les tests de référence et font partie des examens de première intention à ce jour. Le développement et la mise en place de nouveaux tests diagnostiques auxiliaires ont permis d'augmenter la sensibilité au détriment de la précision du diagnostic. Aucun test ne permet de distinguer les tumeurs de bas grade, non agressives, des carcinomes de haut grade, potentiellement mortels. Ils sont toutefois efficaces au stade avancé du CV pour le diagnostic et le suivi du patient. Les Associations Américaine et Européenne d'Urologie ne les recommandent pas pour une utilisation systématique¹¹⁹. Ainsi, ces nouveaux tests sont utilisés, dans le meilleur des cas, en combinaison avec les tests de référence pour affiner ou/et aider à la recherche de CV.

En dépit de son efficacité, l'invasivité de la cystoscopie et son utilisation récurrente (**Figure 30**) rendent cette méthode mal acceptée par les patients, notamment lors du suivi du CV. La répétition de ce test peut entraîner des infections des voies urinaires, des douleurs ou des gênes qui conduisent le patient à interrompre lui-même son suivi ^{198,199}. Enfin, le suivi à vie entraîne une lourde charge financière.

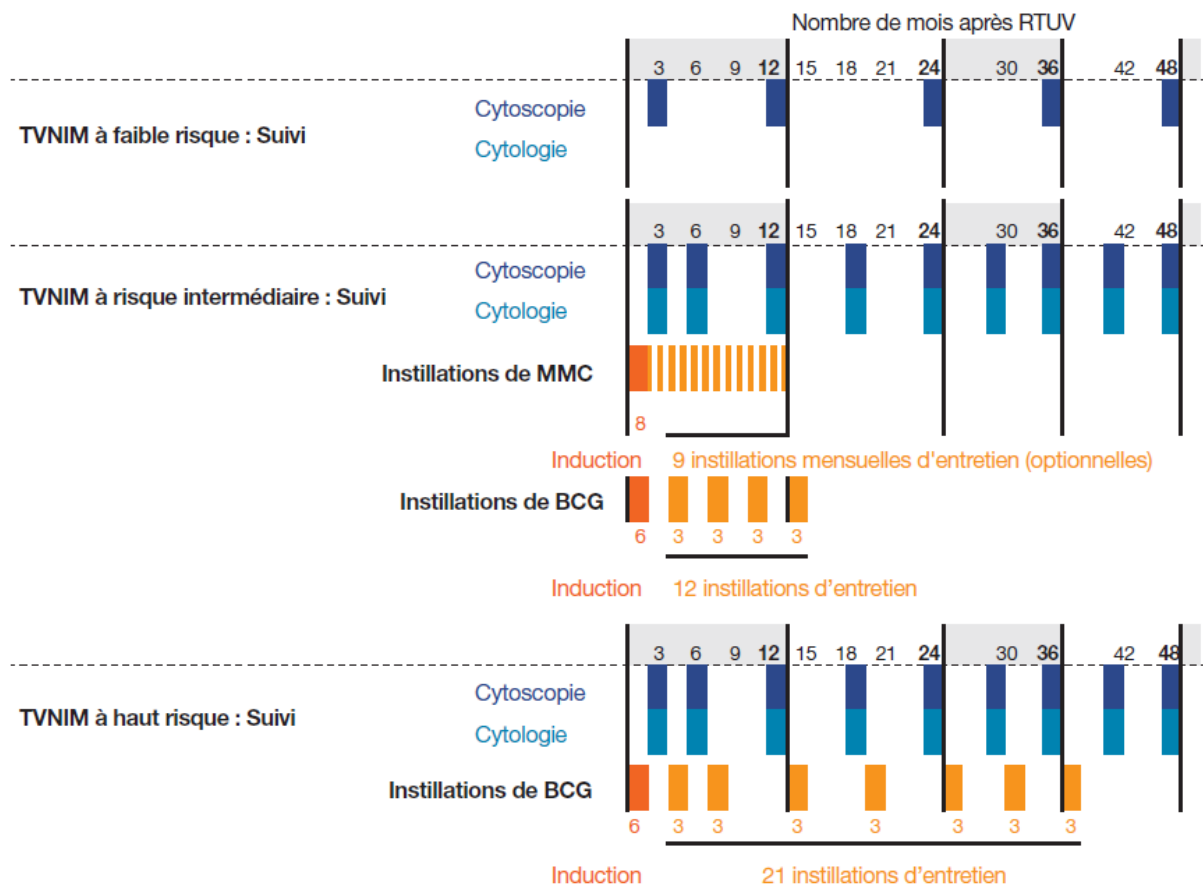


Figure 30 : Calendrier de traitement endovésicales et de suivi des TVNIM en fonction français bizarre de risque. MMC : Mitomycine C. Adapté de Rouprêt et al. ⁹⁵

4.5 Méthode exploitée par VitaDX

La recherche de méthodes alternatives ou complémentaires, à la fois performantes, simples et économiques, est essentielle pour l'amélioration du diagnostic (en particulier au stade précoce) et le bien-être du patient. Pour le diagnostic, la spécificité et la sensibilité du test doivent être très élevées et le test doit être le moins invasif possible (voire non invasif). La mise au jour de ce type de test permettrait de sauver de nombreuses vies.

Travaillant, depuis plus de dix ans, à améliorer la détection précoce du cancer de la vessie, le groupe de recherche dirigé par Marie-Pierre Fontaine-Aupart de l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, en partenariat avec le professeur Pascal Eschwege, urologue praticien de l'AP-HP, a découvert des propriétés fluorescentes sur des cytologies urinaires ou des lignées cellulaires colorées au Papanicolaou puis excitées à une certaine longueur d'onde¹⁸⁴. Ces observations ont permis de mettre en évidence la présence de différents modèles de fluorescence sur les CUR dans diverses conditions cliniques.

Les Cellules URothéliales Tumorales (CURT) présentent une intense fluorescence périmembranaire (FPM) (**Figure 31**). Une FPM sur certaines CUR réactives ou régénératives apparaissant dans les cas d'inflammation ou de lithiase. Enfin, les CUR normales et quiescentes sont caractérisées par une FPM de faible intensité ou une fluorescence homogène (**Figure 31**).

Le groupe de recherche a ainsi proposé d'utiliser ces différents profils de fluorescence pour détecter les CV. Cette méthode pourrait être mise en œuvre en utilisant un unique échantillon urinaire, sans avoir besoin de modifier le protocole de coloration de Papanicolaou, contrairement aux autres méthodes utilisant la fluorescence comme diagnostic photodynamique^{185,186}.

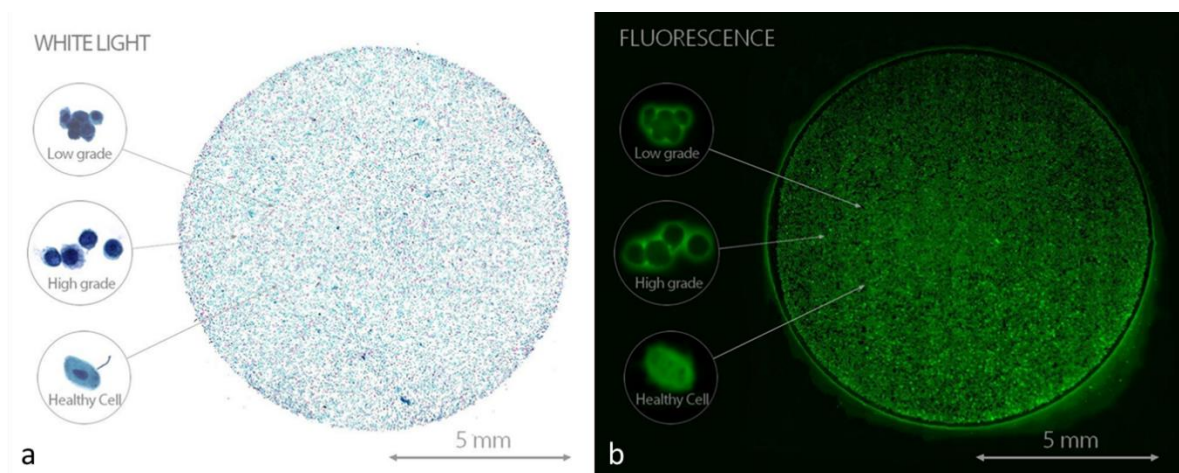


Figure 31 : Image d'une cytologie urinaire acquise en lumière blanche et en lumière émise (488 nm). a) On distingue très facilement les cellules de CUHG et saines en lumière blanche alors qu'il est difficile de différencier les cellules de CUBG des CUA. b) Dans le cas de la fluorescence, la cellule saine présente une fluorescence homogène alors que les cellules de CUBG et CUHG présentent une fluorescence péri-membranaire discriminante. *Images fournies par VitaDX*

Introduction

Cependant, la mise en place de l'analyse des cytologies urinaire utilisant les propriétés fluorescentes nécessiterait une double expertise de l'opérateur, en anatomocytopathologie et en microscopie à fluorescence. En outre, l'indispensabilité, la longue formation et la qualité de l'opérateur à analyser cet échantillon rendent la mise en œuvre de cette technique entièrement dépendante à ce dernier. Aussi, il a été jugé plus judicieux d'automatiser l'analyse (**Figure 31**) en la couplant à de l'intelligence artificielle (IA). L'utilisation de l'IA offre un avantage important, en particulier concernant les biais. En effet, la lecture d'une lame par plusieurs anatomopathologistes peut entraîner des conclusions différentes ou des décisions incorrectes et très subjectives alors que l'IA sera toujours sujette aux mêmes biais et donc, devrait toujours donner la même conclusion.

Ainsi, VitaDX, fort de ses résultats en rétrospectif, a souhaité développer un programme d'automatisation couplé à l'IA, avec pour objectif de devenir un acteur majeur du diagnostic précoce du CV en exploitant le phénomène de fluorescence. Leurs travaux, qui font l'objet d'un brevet¹⁸⁷ basé sur la méthode d'observation de fluorescence en microscopie décrite antérieurement, reposent sur un traitement algorithmique d'images de cytologie urinaire sur lame qui sont numérisées (**Figure 32**) en lumière blanche et en lumière émise (fluorescence). Ce dispositif, appelé VisioCyt®, a fait l'objet d'un essai clinique en 2017 en collaboration avec 14 centres hospitaliers français et a permis de récolter plus de 1400 échantillons. Parmi ces échantillons, 800 ont été utilisés pour constituer la base d'apprentissage et créer l'algorithme, et 400, pour constituer la base de test. Les premiers résultats du logiciel sont très prometteurs, avec :

- Une sensibilité générale pour la détection du CV plus de 75 %
- Une spécificité générale de 60 %

Depuis février 2020, le logiciel VisioCyt® a obtenu le marquage CE.

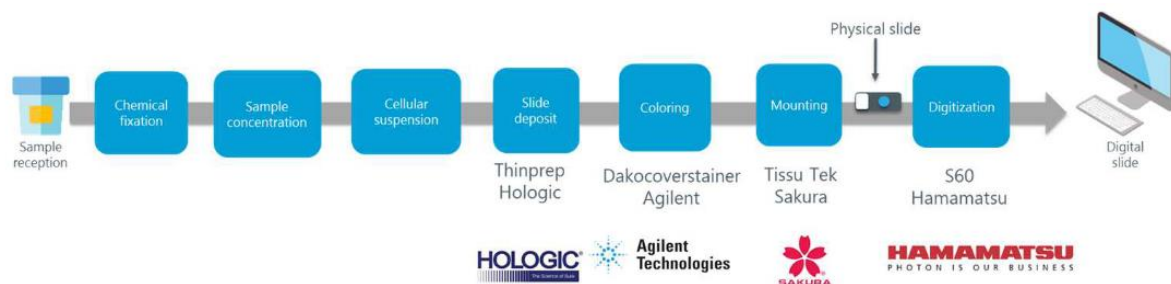


Figure 32 : Schéma récapitulatif du traitement automatisé de l'échantillon jusqu'à sa numérisation dans le cadre du Protocole VisioCyt®. Image fournie par VitaDX

4.5.1 Visiocyt®

Le principal avantage du logiciel réside dans la rapidité et l'exhaustivité de l'analyse. En effet, l'anatomopathologiste ne pourra jamais observer la totalité des cellules présentes sur la lame, contrairement au protocole Visiocyt®.

Introduction

L'analyse est divisée en deux parties : l'analyse cytologique en lumière transmise, suivie d'une analyse en lumière émise. Elle est faite par un scanner capable d'acquérir et de numériser les cytologies en lumière transmise et émise.

4.5.1.1 L'analyse cytologique en lumière transmise

L'analyse comprend une cytologie normale additionnée de plusieurs contrôles pour vérifier la qualité générale et l'exploitabilité de l'échantillon (**Figure 33**). Le logiciel est capable d'identifier trois types d'objets sur la lame : des CUR isolées, des CUR groupées et des amas sombres. L'analyse suit les critères du système de Paris, et se fait en plusieurs étapes pour chaque groupe.

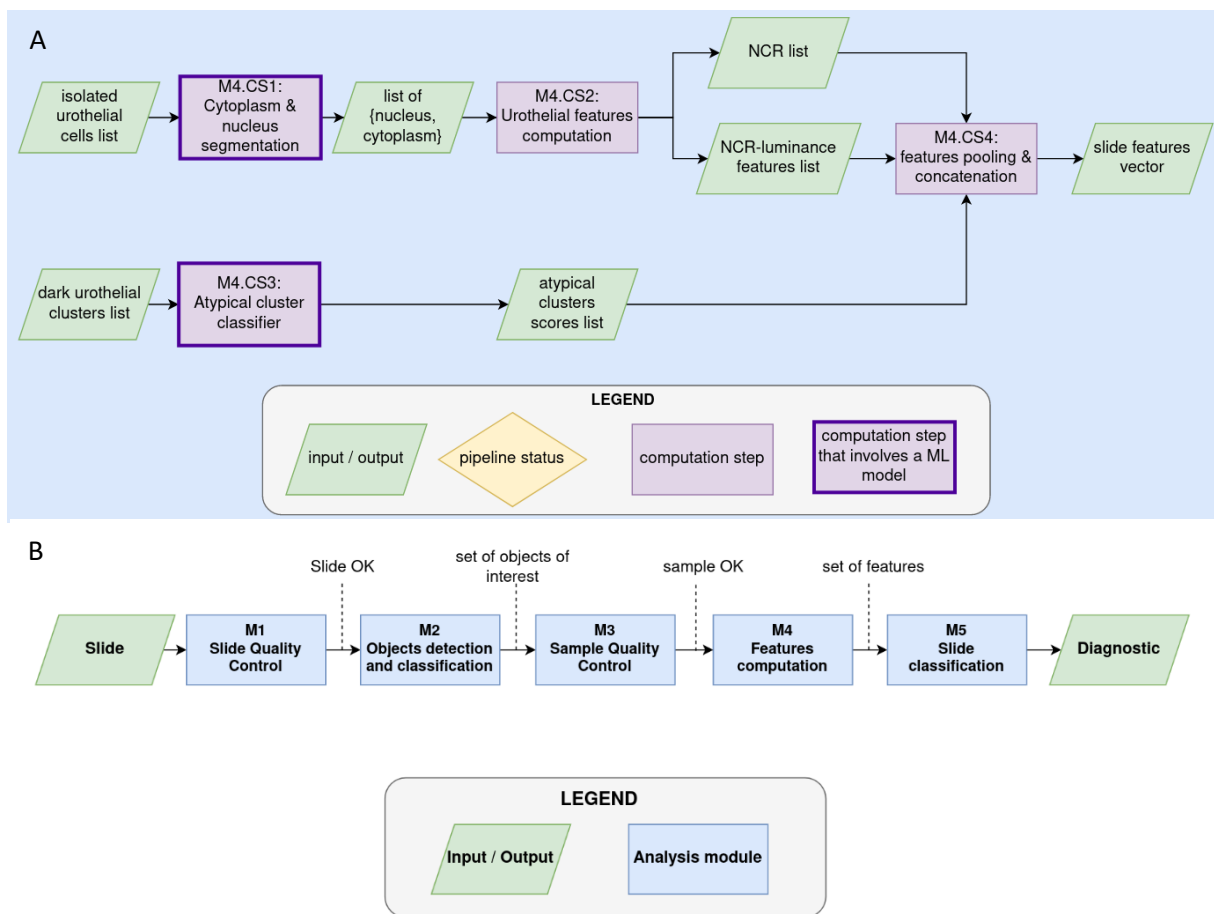


Figure 33 : Algorithme employé pour l'IA pour identifier le type d'objet et attribuer le score de chaque cellule analysée. **a)** schéma global de l'algorithme employé par l'IA pour détecter des cellules tumorales en lumière blanche. **b)** schéma général employé par l'IA pour contrôler la qualité d'une cytologie urinaire. *Image fournie par VitaDX*

Dans le cas des CUR isolées, l'analyse se fait uniquement sur les cellules non superficielles. Deux analyses sont opérées simultanément, une sur la couleur de la cellule après coloration au Papanicolaou et l'autre sur la morphologie du noyau et du cytoplasme. En se fondant sur des critères prédéfinis dans sa base de données, le logiciel sera en mesure de déterminer une anomalie plus ou moins sévère de la cellule (**Figure 33**).

Introduction

Pour les CUR groupées, le logiciel tente de séparer les cellules urothéliales non superficielles groupées. S'il y parvient, il reprend le programme précédent des cellules isolées (**Figure 33**). Dans le cas contraire, il abandonne cette tâche et passe à une autre.

Les amas sombres sont définis comme des amas cellulaires constitués de cellules atypiques (**Figure 33**). Ces amas sont analysés selon leur degré d'atypie, toujours en se référant à la base de données mise à la disposition du logiciel.

Une fois les trois analyses réalisées sur la totalité de la lame, un score général est attribué à chaque cellule analysée. La moyenne des scores fournit ensuite un résultat compris entre 0 et 1, 0 correspondant à un échantillon de patient sain et 1 à celui d'un malade.

L'utilisation de la lumière émise est très importante pour affiner le résultat de la cytologie urinaire.

4.5.1.2 L'analyse cytologique en lumière émise

La longueur d'onde utilisée pour observer le phénomène de FPM est celle de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) : les cellules sont excitées à 495 nm et émettent une fluorescence verte à 521nm¹⁸⁷.

La caractérisation de la FPM se fait avec plusieurs masques capables de déterminer une série de contrastes se fondant sur la fluorescence autour de la cellule, à l'intérieur de la cellule et sous plusieurs angles (**Figure 34**). Calculer une série de contrastes dans différents secteurs angulaires et prendre la médiane de la série permet une mesure robuste, qui sera moins perturbée par les variations de l'environnement. Une fois le contraste déterminé, un score est calculé. S'il est supérieur à 0, une FPM a été constatée. En revanche, un score inférieur à 0 signifie que la fluorescence est homogène dans la cellule.

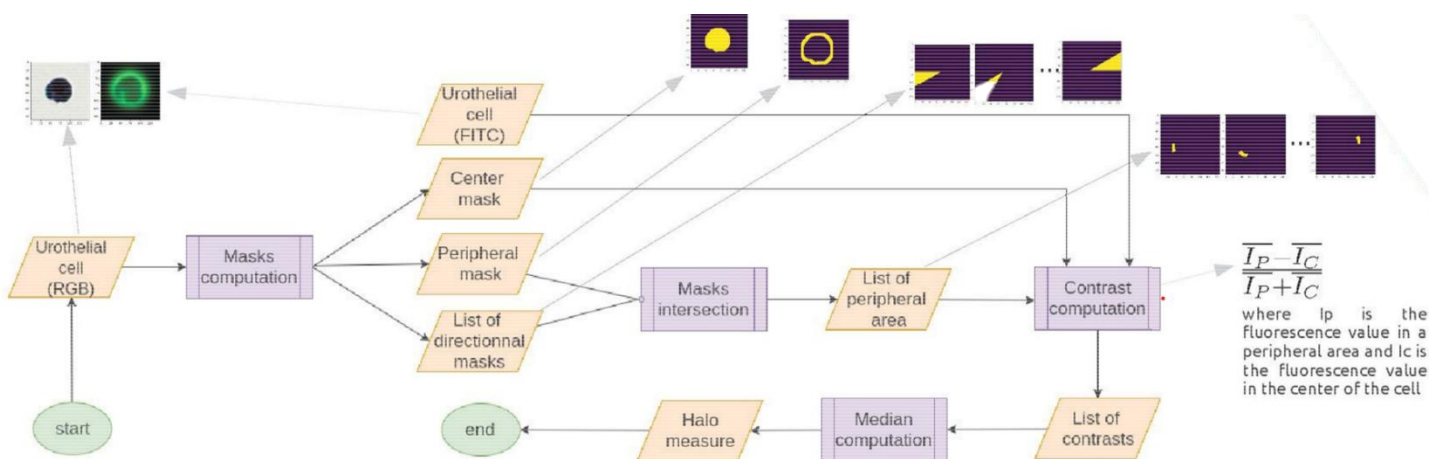


Figure 34 : Algorithme employé pour l'IA pour déterminer la présence d'une FPM ou non. Image fournie par VitaDX

4.5.1.3 *En conclusion*

L'association des deux analyses précédentes en lumière blanche et transmise rend ce test efficace, conformément aux résultats de l'essai clinique de 2017.

Cependant, la différence d'intensité et de localisation de la fluorescence observée sur les cellules urinaires de patients sains ou malades n'est, à l'heure actuelle, que partiellement expliquée¹⁸⁸. Une compréhension fine des molécules et réactions aboutissant à l'observation de cette fluorescence spécifique permettrait de comprendre précisément le phénomène et d'intégrer de nouvelles composantes algorithmiques qui limiteraient les faux positifs et amélioreraient la capacité de diagnostic du produit en cours de développement. Cela permettrait, par ailleurs, de mieux comprendre l'oncogenèse de ce tissu et apporterait de nouvelles pistes pour développer et appliquer les méthodes microscopiques employées par VitaDX (la super-résolution par exemple) afin de parfaire la caractérisation de ces cellules tumorales.

Objectifs

Depuis la mise en évidence du phénomène, les conditions idéales d'observation de la FPM, dans lesquelles il est possible de distinguer les CUR saines des tumorales, sont connues. Parmi ces conditions, il a été montré que l'utilisation d'un film de montage spécifique et celle des colorants OG6 et EA50 sont indispensables à la survenance du phénomène. En revanche, la ou les molécules biologiques ou chimiques impliquées dans la FPM sont encore inconnues.

Cette thèse a ainsi eu pour ambition de déterminer la ou les molécules biologiques des CURT impliquées dans le phénomène FPM dans la méthode exploitée par VitaDX. Nous nous sommes d'abord concentrés sur la recherche d'une lignée cellulaire ne présentant pas de FPM afin de comparer sa composition protéique et/ou lipidique avec des cellules T24, cellules modèles du CV et présentant une FPM.

Par la suite, nous avons mis en place un logiciel de quantification permettant d'obtenir des informations précises pour déterminer des variations de FPM dans les différentes lignées cellulaires utilisées et dans les différentes conditions de culture.

Enfin, nous avons choisi de nous concentrer sur la caractérisation du phénomène de FPM et de son rôle dans la mise en évidence des CURT dans les urines. Ne trouvant pas de modèle cellulaire n'exprimant pas de FPM, il a été important pour nous de comprendre dans quelles conditions intervenait la diminution de la FPM.

La mise en évidence d'un mécanisme impliqué dans la diminution de la FPM est une première étape vers l'identification de la ou des molécules biologiques impliquées dans la perte de la FPM afin de donner les outils nécessaires à VitaDX pour améliorer considérablement leur méthode liée à la FPM des cellules présentes dans les urines de patient pour la détection précoce du CV.

Résultats

1 Matériels et méthodes des résultats absents de l'article

1.1 Culture cellulaire

Les cellules épithéliales urétérales humaines immortalisées par le SV-40 (SV-HUC-1), fournies par VitaDX, ont été cultivées avec de l'Urothelial Cell Medium (UCM) (CliniSciences, 4321-prf-SC) complété avec 0,01 % de Pénicilline/Streptomycine (CliniSciences, 0503) et 0,01 % d'urothelial Cell Growth Supplement (CliniSciences, 4352). Les SV-HUC-1 ont été maintenues dans des flasques Falcon de 5 mL (25 cm²) et 15 mL (75 cm²) traitées au préalable, pendant au moins 1 h, avec 1 mg/mL de Poly-L-Lysine (CliniSciences, 0413-sc) avant d'être soigneusement rincées. Les cellules ont été cultivées à 37 °C dans un incubateur humidifié à 5 % de CO₂.

1.2 Marquage immunofluorescent

Les cellules ont été cultivées sur lamelle couvre-objet ronde en verre borosilicaté Menzel diamètre 14 mm épaisseur n 1 (LABELIANS, LCO14) dans des plaques à 24 puits à une concentration de $1,5 \times 10^5$ cellules/puits pendant 24 h à 37 °C dans un incubateur humidifié à 5 % de CO₂. Les cellules ont été fixées avec 100 % de méthanol pendant 5 min à 25 °C et perméabilisées avec du triton 0,2 %. Les cellules ont été saturées avec du sérum de poulet (SP) à 10 % pendant 15 à 20 min. L'anticorps primaire a été dilué, selon les recommandations du fournisseur, dans du SP10% et incubé selon la technique de la lamelle retournée pendant 1 h à 25 °C. L'anticorps secondaire a été dilué au 1/2000 dans du CS10% et incubé pendant 1 h dans le noir et sous agitation. Le montage a été fait avec du Mowiole, puis le séchage a duré toute la nuit. Les cellules sont lavées au PBS 1X entre chaque étape. Anticorps primaires utilisés : anti-cytokeratin 19 (Abcam, EP1580Y), monoclonale anti-cytokeratin 17 (E3) (ThermoFisher, MA5-13539), anti-UPIIIa (C-6) (Santa Cruz Biotechnology, inc, sc-166808) et anti-cytokeratin 20 (E-9) (Santa Cruz Biotechnology, inc, sc-271183). Les anticorps secondaires utilisés proviennent tous de Jackson ImmunoResearch (Cambridge Business Park), Alexa Fluor® 647-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (115-605-206), Rhodamine Red-X-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (115-295-206), Alexa Fluor® 488-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (115-545-206), Rhodamine Red-X-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (115-295-207), Alexa Fluor® 647-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (115-605-207) et Alexa Fluor® 488-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (115-545-207). Les images ont été obtenues avec un microscope confocal SP8 TCS Leica.

1.3 Westernblot,

Les échantillons sont traités selon le procédé décrit dans l'article. Anticorps primaires utilisés : anti-cytokeratin 19 (Abcam, EP1580Y), monoclonale anti-Cytokeratin 17 (E3) (ThermoFisher, MA5-13539), anti-UPIIIa (C-6) (Santa Cruz biotechnology, inc, sc-166808) et anti-cytokeratin 20 (E-9). Anticorps secondaires : anti-mouse IgG (CST 7076) et anti-rabbit IgG (CST 7074), HRP-linked Antibody (Cell Signaling

Résultats

Technology). Les échantillons de protéines ont été soumis à une électrophorèse à l'aide du système Novex wedgewell starter 4-12 %, 10-well Electrophoresis (Invitrogen™, XP0412A).

1.4 Cytométrie en flux

Les échantillons sont traités selon le procédé décrit précédemment. Anticorps primaires utilisés : anti-cytokeratin 19 (Abcam, EP1580Y), monoclonale anti-Cytokeratin 17 (E3) (ThermoFisher, MA5-13539), anti-UPIIIa (C-6) (Santa Cruz biotechnology, inc, sc-166808). Les anticorps secondaires utilisés proviennent tous de Jackson ImmunoResearch (Cambridge Business Park), Alexa Fluor® 647-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (115-605-206), Rhodamine Red-X-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (115-295-206), Alexa Fluor® 488-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (115-545-206), Rhodamine Red-X-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (115-295-207), Alexa Fluor® 647-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (115-605-207) et Alexa Fluor® 488-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (115-545-207).

1.5 Différenciation

Les SV-HUC-1 ont été utilisées uniquement entre le passage 3 et 5. 16 puits ont étéensemencés à 40 000 cellules/puits dans deux plaques de 24 puits qui ont été, préalablement, incubées à 37 °C avec de la Poly-L-Lysine (15 µg/mL) entre 1 h et toute une nuit dans un incubateur humidifié à 5 % de CO₂. 8 puits sont traités avec une solution contrôle (UCM, 100 ng/mL Human serum albumin [HSA] [CliniSciences, PCSL040212-1mg], H₂O₂) et les 8 autres, avec une solution de différenciation (UCM, 100 ng/mL HSA, 100 ng/mL FGF-7 [Miltenyi Biotec, 130-097-175]). Les cellules ont été cultivées à 37 °C dans un incubateur humidifié à 5 % de CO₂. Les solutions contrôles et différenciations ont été renouvelées après 2 et 5 jours d'incubation. La première plaque a été arrêtée après 5 jours et la deuxième, après 7 jours de traitement. Les cellules ont été trypsinées et rincées au PBS avant d'être fixées ou lysées selon les besoins.

1.6 Isolation de la membrane plasmique

L'isolation des membranes a été faite avec le kit OrgFrontier™ Plasma Membrane Isolation (BioVision, K414-10) selon les recommandations du fournisseur. 20.10⁷ T24 et entre 0,2 et 0,5 g de vessie de porc ont été utilisés. Les vessies de porc ont été généreusement fournies par le service d'urologie du CHU de Rennes. Les CUR de porc ont été récupérées en grattant l'intérieur de la vessie au scalpel. Les échantillons ont été ultracentrifugés avec une Optima L-80 XP Ultracentrifuge (Beckman Coulter).

1.7 Expérience avec les urines

Les T24 ont étéensemencées à 40 000 cellules/cm² 24 h dans des flasques Falcon de 5 mL (25 cm²) avant traitement aux urines. Les urines ont été récupérées chez des volontaires sains dans des tubes Falcons de 50 mL. Elles ont ensuite été filtrées avec des filtres-seringue PES 33 mm 0,2 µm stérile

Résultats

(Fisher Scientific SAS, 15 206 869) dans des Seringues plastiques Fisherbrand 3p, 60 ml, luer (Fisher Scientific SAS, 15 899 152). Après 24 h, les T24 ont été rincées avec du PBS puisensemencées avec 5 mL d'urine filtrée. Les cellules ont été récupérées sans utiliser de la trypsine, mais en tapant énergiquement les flasques, après 1 h, 2 h, 3 h et 6 h de culture en présence d'urine. Seule la condition 0 h a été récupérée en détachant les cellules avec de la trypsine.

2 Différenciation des cellules urothéliales basales en cellules urothéliales superficielles

La FPM étant différente entre les CUR et les CURT retrouvées dans les urines, nous avons émis l'hypothèse que la différence de FPM fût induite par la présence ou l'absence d'un ou plusieurs composants biologiques de la CURT ou de la CUR. Pour valider cette hypothèse, il était primordial de comparer la composition protéique et lipidique des CUR retrouvées dans les urines avec notre modèle du CV, les cellules T24. La quantité de CUR étant trop faible dans les urines, l'utilisation d'une lignée cellulaire mimant les caractéristiques de fluorescence de nos CUR était indispensable à cette étude.

Notre premier objectif a donc été de trouver une lignée cellulaire ne présentant pas de FPM, afin de la comparer avec nos T24. Les premières cellules candidates étaient les cellules normales de l'urothélium, en particulier les CP. Malheureusement, les CP sont des cellules hautement différenciées, qui, parce qu'elles ne se divisent plus, sont extrêmement compliquées à étudier *in vitro*. Nous nous sommes ainsi penchés sur les cellules basales. Ayant déjà fait l'objet d'une étude préliminaire menée par VitaDX, les cellules basales n'ont pas été utilisées directement, car l'étude a montré que leur modèle cellulaire basal présentait une FPM semblable aux CURT, contrairement aux CP qui n'en

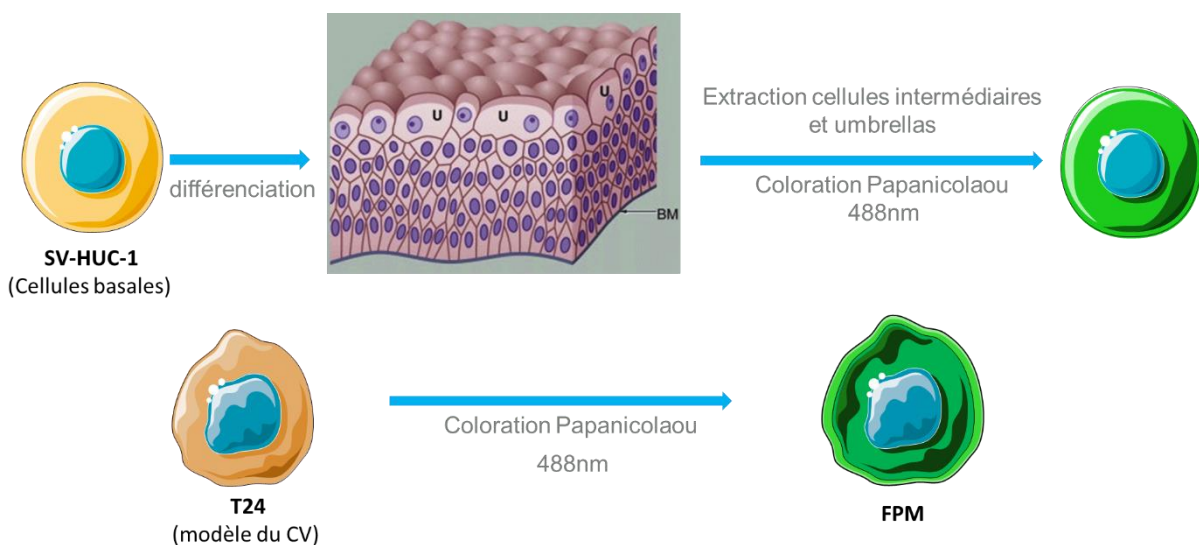


Figure 35 : Schéma hypothétique de la différenciation des cellules urothéliales basales en cellules urothéliales superficielles. U = Cellules parapluies, BM = cellules basales. *Adapté de Young et al.*

Résultats

présentent aucune quand elles sont récupérées dans les urines. Selon l'hypothèse la plus probable, le caractère progéniteur et la faible différenciation des cellules basales pourraient être responsables de la présence d'une FPM, contrairement aux CP qui sont des cellules hautement différenciées. La différenciation des cellules basales en CP a été jugée plus judicieuse pour comprendre à quel moment intervient le changement de FPM (**Figure 35**).

Avant de commencer la différenciation, il a fallu déterminer les marqueurs de différenciation des CUR et pour ainsi les trier. Les cytokératines (CK) ont été choisies comme les marqueurs principaux des différentes CUR, car il s'agit de protéines des filaments intermédiaires caractéristiques des cellules épithéliales et il existe une vingtaine d'isotypes différents. Parmi ces isotypes, entre deux et dix sont exprimés dans les cellules. La différence d'expression permet de déterminer le type d'épithélium et le statut de différenciation¹⁸⁹. La cytokératine 19 (CK19) a été utilisée pour le marquage de l'urothélium, car elle est retrouvée dans de nombreux tissus épithéliaux, et spécialement dans l'urothélium, où elle est présente partout^{189,190}. La CK17 est exprimée par les cellules basales¹⁸⁹ et a donc été choisie pour marquer ces dernières. CK20, spécifique aux CP, a été utilisée pour les marquer. Parce que CK20 est très occasionnellement retrouvée dans les cellules intermédiaires¹⁸⁹, elle a été combinée avec de l'uroplakine IIIa (UPIIIa). Les UP sont les principaux composants des CP et permettent de former les plaques urothéliales. Dans ces plaques, l'isoforme dominante est UPIIIa^{75,191,192}. Les différents marqueurs ont pu être utilisés en marquage immunofluorescent, en western blot ou en cytométrie de flux (**Figure 44**).

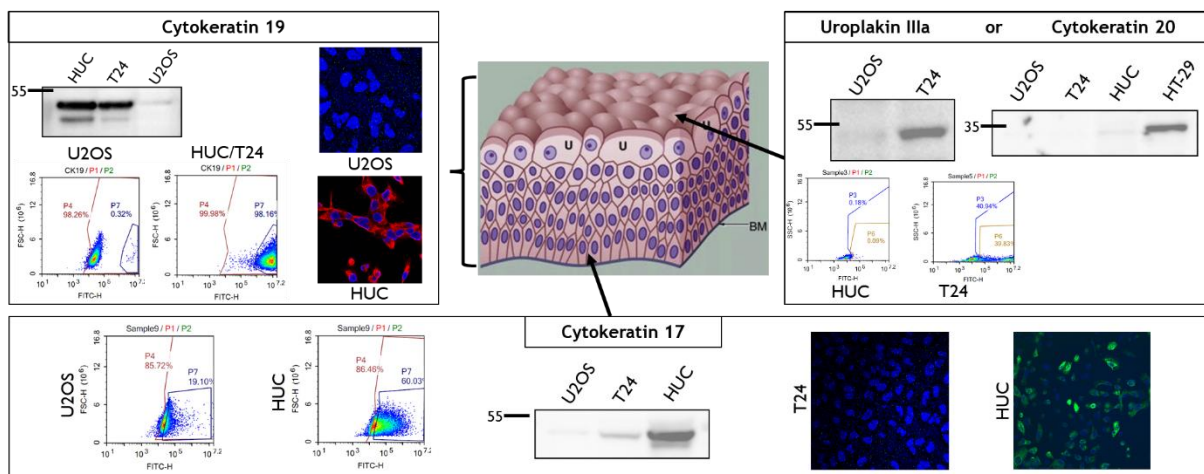


Figure 36 : détermination des différents marqueurs de différenciation des cellules de l'urothélium. Marquage de toutes les cellules urothéliales avec la CK19 en western blot, en cytométrie de flux et en immunofluorescence. Marquage des cellules basales avec la CK17 en western blot, en cytométrie de flux et en immunofluorescence. Marquage de cellules parapluies en cytométrie de flux

Néanmoins, de nombreux obstacles ont empêché le projet de différenciation d'aboutir. En premier lieu, nous n'avons pu valider le protocole de différenciation des SV-HUC-1 en CP, aucune différenciation n'a été observée après la mise en place du protocole. En matière cellulaire, les SV-HUC-1 présentaient de nombreux inconvénients. D'abord, la conservation des cellules était rendue difficile par une

Résultats

forte mortalité due à une mauvaise conservation lors du stockage en azote. Par ailleurs, la culture *in vitro* était mise en œuvre péniblement, en raison d'un temps de doublement très lent et une survie très faible après passage cellulaire. Enfin, la mise en évidence par l'équipe de *Georgopoulos et al.* de la compromission de la capacité de différenciation causée par l'immortalisation des cellules urothéliales humaines normales¹⁹³ nous a conduits à abandonner définitivement ce projet.

Dans le but de comprendre la FPM, nous avons ensuite essayé de caractériser son origine. Les résultats de ces recherches font l'objet d'un article scientifique soumis dans le journal *Cancers* : Charly Gutierrez, Xavier Pinson, Kathleen Jarnouen, Marine Charpentier, Raphaël Pineau, Laëtitia Lallement et Rémy Pedeux ; [Characterization of the perimembranous fluorescence phe-nomenon allowing the detection of urothelial tumor cells in urine.](#)

3 Article

3.1 Résumé

Dans cet article, nous nous sommes intéressés au rôle que joue la caractéristique morphologique de la CURT dans la FPM. Nous avons ensuite essayé de trouver un modèle de lignées cellulaires qui ne présentait pas de FPM dans l'objectif de cribler sa composition protéique et lipidique avec notre modèle du CV. Pour analyser de façon précise la moindre fluctuation de fluorescence, un logiciel de quantification de la FPM a été mis en place. Ne parvenant pas à trouver de lignées sans FPM, nous avons analysé la FPM des CUR récupérées dans les urines de rat avec celles récupérées directement dans l'urothélium de rat. En constatant une différence de FPM en fonction d'où les cellules ont été récupérées, nous avons voulu déterminer quel phénomène cellulaire pouvait intervenir dans la modification de la FPM quand la CUR passe de l'urothélium aux urines. La compréhension du phénomène impliqué dans la baisse de la FPM donnerait les outils nécessaires pour identifier la molécule biologique impliquée dans la FPM.

3.2 Résumé des résultats

3.2.1 Rôle du noyau cellulaire et du cytoplasme dans le phénomène de FPM

Les analyses des cytologies urinaires colorées au Papanicolaou sont généralement analysées en lumière blanche. Depuis la mise en évidence du caractère fluorescent des cellules après coloration de la cytologie, il est intéressant de coupler cette analyse en lumière blanche avec l'analyse en lumière transmise.

L'équipe de Steenkeste *et al.* a montré que l'utilisation de la fluorescence sur les CUR colorées par Papanicolaou permet de voir plus facilement, sur la cytologie urinaire du patient, les différents états des CUR. Les CUR saines présentent une fluorescence uniforme tandis que chez les CURT, qu'elles

Résultats

soient à un stade avancé ou précoce, la fluorescence est plus importante pour la membrane plasmique (en périphérie) que pour le cytoplasme et le noyau. Il s'agit du phénomène de FPM.

La première étape pour caractériser le phénomène de la FPM a été de déterminer s'il était causé par la caractéristique morphologique ou biologique de la CURT. Un des principaux indices du diagnostic des CURT en microscopie photonique est la présence de noyaux prenant 70 % de l'espace cellulaire. Ainsi, notre première hypothèse était liée à la taille du noyau qui, occupant la totalité du volume cellulaire, pouvait englober la quasi-totalité du cytoplasme. Seule une petite partie du cytoplasme, située à proximité de la membrane plasmique, serait alors visible et donc responsable du phénomène FPM, à l'instar de la lune qui couvre le soleil lors d'une éclipse. On parle alors d'un effet d'éclipse où le noyau joue le rôle de la lune et le cytoplasme celui du soleil.

Pour confirmer (ou infirmer) l'implication de l'effet d'éclipse dans la FPM, des T24 ont été analysées. Le cytoplasme a été marqué à la phalloïdine (488 nm) et le noyau cellulaire, au DAPI (350 nm). Les cellules ont été analysées au microscope confocal.

Ce marquage a permis de constater que le noyau n'occupait pas tout l'espace cellulaire. La FPM n'est ainsi pas liée au phénomène d'éclipse, évacuant l'hypothèse d'une causalité morphologique. La FPM résulterait alors d'une caractéristique biologique et périmembranaire.

3.2.2 FPM exprimée sur différentes lignées cellulaires

L'objectif suivant était de s'assurer que seules les CURT étaient capables d'exprimer une FPM, à la condition de trouver des cellules n'exprimant pas une FPM et de comparer leur composition à celle des T24.

Les cellules ont d'abord été trypsinées avant d'être comparées en suspension afin de mimer ce qui est obtenu avec une cytologie urinaire. Les T24 ont ensuite été comparées avec d'autres lignées tumorales épithéliales pour savoir si la FPM concernait uniquement les cellules de carcinome de la vessie ou tous les carcinomes épithéliaux. Après coloration, une FPM a été observée pour toutes les lignées tumorales épithéliales testées.

Poursuivant la recherche d'une lignée sans FPM, nous avons ensuite comparé les T24 avec des lignées cellulaires non issues de carcinomes épithéliaux. Ont été utilisées : des cellules de fibroblastes embryonnaires humains immortalisés (MRC-5 hTERT), une lignée d'ostéosarcome (U2-OS) et une lignée de carcinome à petites cellules (H69). Comme pour les lignées cellulaires provenant de carcinomes

Résultats

épithéliaux, nous avons constaté que toutes les lignées cellulaires présentaient une FPM, y compris celles ne provenant pas de carcinomes épithéliaux.

En dernier lieu, une lignée normale épithéliale immortalisée avec CDK4 et hTERT (HBEC3-KT) et une lignée cellulaire primaire de la vessie (HBlEpC) ont été testées. Comme les précédentes lignées testées, ces deux lignées présentent aussi une FPM, malgré l'origine urothéliale et primaire d'une des lignées.

N'ayant pas trouvé de lignées cellulaires ne présentant pas de FPM, nous avons ensuite voulu déterminer si les mécanismes protéiques impliqués dans l'adhésion cellulaire jouaient un rôle dans le phénomène de FPM. Pour ce faire, nous avons utilisé les lignées cellulaires précédemment testées : celles issues de carcinomes épithéliaux et celles ne provenant pas de carcinomes épithéliaux. Ces lignées ont été cultivées sur lame avant d'être directement colorées au Papanicolaou sans avoir été trypsinées. La coloration a montré que la fluorescence de la membrane plasmique était plus intense que celle du cytoplasme. En d'autres termes, la modulation de la FPM n'est pas liée au mécanisme d'adhésion, puisque perturber ou non ce dernier ne permet pas de modifier la FPM.

Afin de mieux comprendre le phénomène de FPM, un logiciel capable de déterminer quantitativement la fluorescence a été mis en place, nous évitant d'utiliser des données qualitatives variables et subjectives. Ce logiciel permet de discerner la moindre fluctuation de FPM et de déterminer le type de FPM exprimé par les cellules en fonction de leur état physiologique ou de leur origine tissulaire. Le logiciel ainsi créé a été nommé Perifluo QCG. Il est composé de 2 sous-logiciels qui sont des « *plugins* » pour ImageJ, la première partie permet d'alléger la charge de calcul pour l'ordinateur (créé par Charly Gutierrez) et la deuxième partie permet de calculer la FPM [créé avec l'aide de Xavier Pinson (Biosit UAR3480 US_S 018, MRic core facility, F-35000 Rennes, France) et améliorée par Charly Gutierrez].

Perifluo QCG est capable de détecter rapidement chaque cellule présente dans l'échantillon. Lorsqu'une cellule est détectée, sa fluorescence cytoplasmique et périphérique/membranaire est quantifiée, tout en en déduisant le bruit de fond. À la fin du processus, la FPM et la fluorescence cytoplasmique de chaque cellule ont été quantifiées. Un ratio de fluorescence (RF) est ensuite déterminé sur toutes les cellules en utilisant les données précédemment obtenues.

$$\text{RF d'une cellule} = \text{intensité de la fluorescence} \frac{\text{membrane plasmique}}{\text{cytoplasme}}$$

Un seuil de FPM a ainsi pu être déterminé : les échantillons avec une moyenne FR supérieure à 1 contiennent une majorité de cellules exprimant une FPM et ceux avec une moyenne FR inférieure à 1, une majorité de cellules n'exprimant pas de FPM.

Résultats

La quantification a permis de constater une moyenne FR supérieure à 1 pour l'ensemble des lignées cellulaires analysées, sans différence significative entre celles-ci, confirmant que les cellules testées expriment toutes une FPM.

Le phénomène de FPM s'est manifesté sur toutes les cellules, qu'elles soient adhérentes ou en suspension, cancéreuses ou non, et, quelle que soit leur origine. Sur la base de ces résultats, nous supposons que le phénomène se produit dans les cellules lors du passage de l'urothélium à l'urine, induisant la modification de la FPM.

3.2.3 Cellules urothéliales recueillies dans l'urine contre les cellules urothéliales recueillies dans l'urothélium

Afin de comprendre la différence de fluorescence entre les CUR recueillies dans les Urines (CURU) et celles recueillies dans l'Urothélium (CURUT), le rat, dont la quantité d'urines, la taille de la vessie et le nombre de cellules sont plus grands que chez la souris, a été utilisé comme modèle pour cette étude. Pour recueillir un plus grand nombre de données, un échantillon analysé regroupe 2 à 5 rats.

L'analyse quantitative a montré que le RF général est inférieur à 1 (allant de 0,62 pour le minimum à 0,85 pour le maximum), et a ainsi confirmé que les CURU ne présentent pas de FPM. En comparaison, une augmentation significative du RF a été observée pour les CURUT par rapport aux CURU, avec un RF de 1,081 et 0,708 respectivement.

En vue de ces résultats, on peut conclure que les CUR ne présentent pas la même FPM lorsqu'elles sont récupérées dans l'urine ou directement sur l'urothélium. Nous pensons que la modulation de la FPM est provoquée par une modification cellulaire au niveau de la membrane, induite lors du passage de l'urothélium à l'urine.

3.2.4 Rôle de l'intégrité de la membrane plasmique sur la FPM

Selon une première hypothèse, la modification de la FPM pourrait être induite lors de l'exfoliation normale des CUR de l'urothélium vers l'urine. L'exfoliation peut être la conséquence de stress cellulaires plus ou moins agressifs, tels que la sénescence, l'apoptose ou les blessures. De plus, une fois les cellules en suspension dans l'urine, l'absence d'interaction cellule-cellule entraîne l'activation de l'anoïkis, phénomène responsable de l'entrée en apoptose de la cellule.

Pour comprendre l'importance de l'intégrité de la membrane plasmique et son implication dans la FPM, une perméabilisation de cette dernière a été induite dans les T24, afin de mimer le phénomène potentiellement subi par les CURU lors d'un stress. La perméabilisation de la membrane plasmique a été faite en utilisant du 0,2 % Triton-PBS, un détergent monomère capable de s'insérer dans la membrane lipidique, ce qui perméabilise les membranes plasmiques. Après le traitement, une nette

Résultats

diminution de la FPM a été observée, ce qui permet de conclure que la perturbation de la structure de la membrane conduit à une perte de la FPM.

Pour confirmer l'importance de l'intégrité de la membrane sur la FPM, des urines de patients sains ont été comparées avec des urines de patient sain supplémentées en T24 ou T24 perméabilisées au Triton 0,2 % (P.T24). Cela a permis de constater que les urines supplémentées en P.T24 avaient un RF inférieur à 1 et ne présentaient pas de différences significatives avec les urines du patient sain (0,9022 et 0,9489 respectivement). Au contraire, les urines contenant des T24 non perméabilisées avaient un RF supérieur à 1 (1,16) et étaient significativement différentes des urines du patient sain et de celles contenant des P.T24.

En somme, nous avons pu recréer ce qui était observé avec les CURU. L'intégrité de la membrane est donc très importante pour le phénomène PMF puisque sa perturbation entraîne une perte de la FPM.

3.2.5 Influence des stress cellulaires sur la FPM.

L'importance de l'intégrité de la membrane étant confirmée, nous avons tenté de recréer des conditions défavorables pour les cellules afin de mimer ce qui est observé avec les CURU. Pour cela des stress cellulaires ont été induits. De cette manière, nous espérons moduler la FPM. À cette fin, des cellules saines immortalisées MRC-5-hTERT ou des T24 ont été étudiées. La sénescence (condition irradiée/non traitée ; I/N) a été induite dans ces cellules en les irradiant avec des rayons X. Pour induire un stress cellulaire plus intense que la sénescence (condition irradiée/traitée ; I/T), en plus des rayons X, les cellules ont été traitées pendant une heure avec de la nécarzinostatine (NCS) et de l'H₂O₂. Après une heure, le milieu a été changé et remplacé par un milieu contenant de l'étoposide. Les cellules ont été cultivées pendant 9 jours et en absence de sérum. Après neuf jours, une diminution significative du RF a été observée dans les deux lignées cellulaires pour la condition I/T par rapport aux conditions non irradiées/non traitées (N/N) et I/N.

Pour confirmer l'activation de la sénescence par la condition I/N, P21, protéine majeure impliquée dans la sénescence, a été dosée par western blot. Après analyse, P21 a été retrouvée plus exprimée dans les conditions irradiées, ce qui confirme l'activation de la sénescence. À l'inverse, P21 n'est que faiblement exprimée pour la condition N/N. Malgré l'activation de la sénescence, ce facteur seul est insuffisant pour induire une modification de la FPM. En somme, pour induire une modification, il est nécessaire d'induire un fort stress cellulaire.

Pour confirmer l'importance du traitement, les différentes phases et molécules utilisées pour induire un stress cellulaire ont été séparées. L'utilisation de l'étoposide a été le facteur majeur et déterminant dans la diminution de la FPM. Un effet synergique a été observé lorsqu'en plus de l'étoposide, les cellules sont traitées pendant une heure avec le H₂O₂.

Résultats

En conclusion, seule l'induction d'un stress cellulaire a pu induire un changement de la FPM, changement en partie dû à l'étoposide.

Ces résultats ont conduit à une nouvelle hypothèse : l'irradiation et le traitement induiraient un changement d'état cellulaire, qui pourrait être responsable du déplacement de la FPM.

3.2.6 Influence de la mort cellulaire dans la modulation de la FPM

Pour valider l'hypothèse d'un changement d'état cellulaire, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'apoptose sur la FPM. L'étoposide, s'il est utilisé à haute dose, est capable d'activer l'apoptose. Il était ainsi nécessaire, pour confirmer l'implication du stress cellulaire dans ce phénomène, de savoir si la FPM était induite par l'activité du stress cellulaire ou par l'apoptose, après les neuf jours de traitement.

Les RF et la mort cellulaire ont été analysés parallèlement le premier jour du traitement (J+0), le troisième (J+3), le sixième (J+6) et le dernier jour (J+9) sur les T24. La FPM a été quantifiée avec notre logiciel et l'annexine V (apoptose) et l'iodure de propidium (nécrose) ont été analysés en cytométrie de flux pour la mort cellulaire.

Une diminution significative du RF pour la condition I/T a été observée uniquement le dernier jour du traitement, confirmant qu'une exposition longue et répétée était nécessaire pour la perte de la FPM. En revanche, une augmentation globale de la mort cellulaire a été observée pour les conditions I/N et I/T, par rapport aux cellules N/N. Cependant, et en dépit d'un niveau élevé de mort cellulaire de J+0 à J+6 pour la condition I/T par rapport à I/N, aucun changement de RF n'a été remarqué. Malgré une augmentation significative de la mort cellulaire à J+3 pour la condition I/T par rapport à la condition I/N, aucune modification de la FPM n'a été observée, suggérant déjà que la mort cellulaire ne jouerait pas un rôle suffisamment important pour induire une modification de la FPM à ce stade.

À J+9, malgré une baisse significative de la FPM pour la condition I/T, un niveau de mort cellulaire plus élevé a été constaté pour la condition I/N, par rapport aux conditions I/T et N/N (42,17 % contre 22,23 % et 4,81 % respectivement). Si la mort cellulaire et la baisse de la FPM étaient corrélées, un faible RF et un fort niveau de mort cellulaire auraient dû être observé avec la condition I/T. Or, ces résultats montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre la mort cellulaire et la baisse de FPM.

En conclusion, la diminution de la FPM est observable entre le sixième et le neuvième jour du traitement et l'augmentation de la mort cellulaire causée par l'irradiation, accompagnée ou non du traitement n'est pas capable d'induire seule une diminution de la FPM.

Résultats

3.2.7 Conclusion

Ces travaux ont démontré l'absence de caractère morphologique et discriminant des CURT dans le phénomène de FPM. Au contraire, toutes les cellules récupérées hors des urines présentent une FPM. En outre, le rôle de la membrane dans la FPM et la sensibilité de la FPM aux forts stress cellulaires ont été mis en évidence.

Nous présumons que la forte résistance des CURT aux agressions extérieures leur permet de mieux survivre dans les urines, contrairement aux CUR qui, une fois en suspension, sont plus sensibles à ces agressions responsables de la perte de leur FPM.

3.3 Article

Caractérisation du phénomène de fluorescence périmembranaire permettant la détection des cellules tumorales urothéliales dans les urines

Characterization of the perimembranous fluorescence phenomenon allowing the detection of urothelial tumor cells in urine

Charly Gutierrez, Xavier Pinson, Kathleen Jarnouen, Marine Charpentier, Raphael Pineau, Laëticia Lallement et Rémy Pedoux Article soumis dans le journal Cancers

Article

Characterization of the perimembrane fluorescence phenomenon allowing the detection of urothelial tumor cells in urine

Charly Gutierrez ¹, Xavier Pinson², Kathleen Jarnouen³, Marine Charpentier¹, Raphael Pineau¹, Laëtitia Lallement³ and Rémy Pedoux ^{1,*}

¹ Oncogenesis Stress Signaling (OSS), Université de Rennes, INSERM U1242, CLCC Eugène Marquis 35042, Rennes, France; charly.gutierrez@univ-rennes1.fr (C.G.); m.charpentier75@laposte.net (M.C.); raphael.pineau.1@univ-rennes1.fr (P.R.); remy.pedoux@univ-rennes1 (R.P.)

² Univ Rennes, CNRS, Inserm, Biosit UAR3480 US_S 018, MRic core facility, F-35000 Rennes, France; xavier.pinson@univ-rennes1.fr (X.P.)

³ VitaDX International, 74F Rue de Paris, 35000 Rennes; kjarnouen@cell4tech.fr (K.J.); laetitia@vitadx.com (L.L.)

* Correspondence: remy.pedoux@univ-rennes1.fr; Tel.: +33-223-234-702

Simple Summary: To detect Bladder Cancer (BC), urinary cytology and cystoscopy are the primary diagnostic tests used. Urine cytology is non-invasive, easy to collect, with medium sensitivity and high specificity. It is an effective way to detect high-grade BC, but it is less effective on low-grade BC because the rate of equivocal results is much higher, making them difficult to detect. Despite the implementation of new diagnostics, urinary cytology and cystoscopy remain the gold standard. Instead of looking for new diagnostics, one of the new research areas is the improvement of urinary cytology. Recently, the fluorescent properties of plasma membranes of urothelial tumor cells, called perimembrane fluorescence, found in urinary cytology have been shown to be useful in improving the early detection of BC. The main objective of this study was to characterize the perimembrane fluorescence allowing the detection of urothelial tumor cells in urine.

Abstract: Urine cytology is non-invasive, easy to collect, with medium sensitivity and a high specificity. It is an effective way to detect high-grade bladder cancer (BC), but it is less effective on low-grade BC because the rate of equivocal results is much higher. Recently, the fluorescent properties of plasma membranes of urothelial tumor cells (UTC) found in urine cytology have been shown to be useful in improving the early detection of BC[1]. This phenomenon is called perimembrane fluorescence (PMF). Based on previous studies that have identified the PMF on UTCs, the main objective was to characterize this phenomenon. For this study, a software was specially created to quantify the PMF of all tested cells and different treatments performed. PMF was not found to be a morphological and discriminating feature of UTCs, all cells in shape and not from urine show PMF. We were able to highlight the crucial role of the plasma membrane integrity in the maintenance of PMF. Finally, it was found that the induction of a strong cellular stress induced a decrease of PMF, mimicking what was observed in non-tumor cells collected from urine. These results suggest that PMF is found in cells able to resist to this stress, such as tumor cells.

Keywords: Bladder Cancer; Fluorescence; diagnostic test; Urine; Urinary cytology; perimembrane fluorescence; Liquid biopsy; Non-invasive;

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Cancers* **2022**, *14*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Bladder cancer (BC) accounts for 90% of urothelial cancers. It is the 10th most common cancer worldwide, with an estimated 572,000 new cases and 212,000 deaths in 2020[2] and rank, second only to prostate cancer, among urological cancers. The countries with the highest rates of BC are in North America, Southern and Western Europe. At least 90% of cases are urothelial carcinomas or transitional cell carcinomas (TCC). They are classified according to the TNM system[3]. These carcinomas are divided into two categories, Non-muscle Invasive Bladder Cancer (NMIBC) and Muscle Invasive Bladder Cancer (MIBC). NMIBCs account for approximately 70–85% of diagnosed TCCs[4]. NMIBCs are an early stage of cancer and are classified as Ta to T1 and are found in the first layer (urothelium) and second layer (lamina propria) of the bladder. MIBCs are classified as T2 to T4, T2 are found in the third layer of the bladder (muscles), T3 in the fourth layer (perivesical tissue) and T4 invades adjacent tissue. Estimated survival for NMIBC is greater than 78% at 5 years, whereas for MIBC, a more aggressive tumor, it is estimated to be less than 50%. Therefore, early detection of TCC is important[5].

To detect BC, urine cytology and cystoscopy are the primary diagnostic tests used. Urinary cytology is non-invasive, easy to collect and with an overall sensitivity of 38% and a specificity of 98%[6]. It is an effective way to detect high-grade BC (improved sensitivity between 52 and 78%), but it is less effective on low grades than high grades because the rate of equivocal results is much higher, making them difficult to detect[6]. Because of the overall low sensitivity of the urine cytology, new diagnostic tests using urine and whose sensitivity is superior to that of urine cytology are being sought. It is also important that these diagnostic tests easily detect BC at an early stage and facilitate the follow-up of patients. This is why the search for urinary biomarkers of BC has been developed in recent years, such as circulating cell-free DNA, microRNA, circular RNA, non-coding RNA, proteins, cells, etc[4,7–9]. Since the beginning of the implementation of urine cytology, only three new diagnostic methods based on of urine BC protein markers have been validated by the Food and Drug Administration (FDA). BTA-TRAK™/STAT™ which quantifies the Bladder tumor antigen[10,11], NMP22 (nuclear matrix protein 22) Protein Test which quantifies for NMP22 protein[12,13] and ImmunoCyt™/uCyt+™ which targets two antigens (the carcinoembryonic antigen[14] and mucinous bladder antigen [15]). Three other methods have also been validated by the FDA and focus more on searching for DNA or RNA released or contained by malignant cells in the urine: UroVysion™ which is a multitarget fluorescence *in situ* hybridization that detects aneuploidy [16], Xpert a bladder cancer monitor which analyzes five mRNA targets frequently overexpressed in BC [17,18] and CxBladder detect which quantifies five mRNAs associated with growth and propagation of tumor tissue and with the inflammation. One of the advantages of using DNA or RNA is that it can be amplified and can be used at an early stage. Despite the introduction of these new diagnostics, they are, at best, used in combination with urine cytology or only for the follow-up of patients [19]. Urine cytology remains, along with cystoscopy, the diagnostic test of choice because of its higher specificity, although sensitivity may sometimes be lower than other diagnostics [20]. Some diagnostic tests also require specific skills on the part of pathologists, or the preparation of additional samples, resulting in limited access to these tests, while urine cytology remains the simplest diagnostic test to perform[21].

That's why, instead of developing new diagnostics, one of the new research directions is the improvement of urine cytology. Steenkeste *et al.* showed fluorescent properties of Papanicolaou-stained urine cytology after excitation at 488 nm[1]. These observations revealed the presence of different fluorescence patterns on urothelial cells (UC) under various clinical conditions without any intervention in the collection, fixation and staining protocol. It is observed on these fluorescent cytologies that normal and quiescent UC are characterized by a homogeneous and uniform fluorescence on cells, while cells from BC show a higher fluorescence at the plasma membrane than in the cytoplasm. This difference in fluorescence between the plasma membrane and the cytoplasm of BC cells is called

peri-membrane fluorescence (PMF). This same research group has therefore proposed to use these fluorescence patterns to differentiate between healthy and tumor cells and thus facilitate the detection of BC. This method could be implemented using a single urine sample, without the need to modify the Papanicolaou staining protocol, unlike other methods using fluorescence as a photodynamic diagnostic[22,23]. This PMF phenomenon is still poorly understood. Understanding the reaction induced to differentiate urothelial tumor cells (UTC) from healthy UCs is essential for the development of a new diagnostic method.

The main objective of this study was to characterize the PMF phenomenon allowing the detection of UTC in the urine. In this study, it has been shown that the morphological characteristics of the cell were not responsible for the PMF and, furthermore, PMF was found on all the cells of various origins. It was hypothesized that a physiological change in the healthy cell was induced during bladder cell detachment. First, a loss of PMF was observed when cell membranes were disrupted by permeabilization. Second, we have shown that induction of senescence, one of the cellular mechanisms involved in bladder cell detachment[24,25], was not sufficient to induce the loss of the PMF, a more aggressive stress was required. Thus, our results suggest that the presence of a PMF is due to the ability of tumor cells to survive the stressful conditions of their environment unlike the healthy cell.

2. Materials and Methods

2.1. Cytological slides

Urinary cytological slides coming from patients were given by VitaDX and were prepared according to the protocol explained by Steenkeste *et al.*[1] and adapted by VitaDX according to their patent [26]. Urine were gathered in a sterile container. The sample was concentrated by centrifugation in 50 mL Falcon vials (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) for 10 minutes at 600 g at room temperature. The supernatant was removed by inversion. The pellet was pipetted into PreservCyt® collection vials (Hologic, Marlborough, Massachusetts, USA) and incubated for 15 minutes at room temperature. Cells transfer on slides were performed with a ThinPrep 2000 Autoloader System (Hologic) and then were stained using the Papanicolaou technique[27] with a Dako CoverStainer automate CS1000 (Agilent, Santa Clara, California, USA). Slides were covered by a Tissue-Tek® Film Automated Coverslipper (Sakura, Japan) with Tissue-Tek® Coverslipping Film (Sakura) using the VitaDX protocol at FOCH Hospital. A minimum of 12 hours of drying time was required before scanning the slides. The slides were scanned in both transmission and fluorescence using a Hamamatsu Nanozoomer-S60 slide scanner with its additional fluorescence module (x40, inc, Japan, Hamamatsu).

2.2. Cell line culture

Human urinary bladder carcinoma T-24 cell line, human lung carcinoma A549 cell line, human non-small cell lung cancer H1975 cell line, human osteosarcoma U2OS cell line, human lung carcinoma H69 cell line, lung epithelial hTERT-immortalized HBEC3-KT cell line and lung adenocarcinoma HCC827 were purchased from the American Type Culture Collection-ATCC (Manassas, VA, USA). Human lung adenocarcinoma PC-9 was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Immortalized embryonic human fibroblasts MRC5-hTERT were generated by Curtis Harris laboratory[28]. Primary epithelial cells derived from normal human bladder HBIEpC was purchased from Cell Applications (Inc, San Diego, CA). Cell lines were maintained in 5 mL (25 cm²), 15 mL (75 cm²) or 20 mL (150 cm²) Falcon flasks (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). T24 and U2OS cell line were cultured in Mac Coy 5A's medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). A549 and MRC5-hTERT cell line were cultured in DMEM. H1975 and PC-9 cell lines were cultured in RPMI-1640 growth medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). HBEC3-KT cell lines were cultured in DMEM/F12 (Gibco;

Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). HBlEpC were cultured in Bladder Epithelial Cell Growth Medium (Cell Applications, Inc, San Diego, CA), according to the manufacturer’s instruction. All cells were supplemented with 10% fetal bovine serum, excepted HBlEpC, and cultured at 37°C in a humidified 5% CO2 incubator.

2.3. Cytological slides with cell line

In order to work similar to cytological slides obtained from patients, cells were trypsinized with 0.05% trypsin (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) and counted on Malassez cell. For one slide 80,000 cells were recovered and then fixed in PreservCyt®. Cells transfer on slides were performed with a ThinPrep 5000 Autoloader System (Hologic) and then were stained using the Papanicolaou technique with a Dako CoverStainer automate CS1000. Slides were covered by a Tissue-Tek® Film Automated Film Coverslipper with Tissue-Tek® Coverslipping Film. After 24 hours of drying, slides were acquired by a NanoZoomer-S60 Digital slide scanner in transmission mode (bright field light) and in fluorescent mode (488 nm line of argon lasers) with a 524/24, 485/20 nm BrightLine® single-band bandpass filter (Semrock, Rochester, New York, USA) or 506 nm edge BrightLine® single-edge standard epi-fluorescence dichroic beamsplitt (Semrock, Rochester, New York, USA). Slides were also acquired with a confocal SP8 T. C. S. Leica microscope (X40, Confocal Scan Head Leica SP8, Wetzlar, Allemagne) in fluorescent mode (488 nm line of argon lasers), according to the protocol explained by Steenkeste *et al.* [1]. Images acquired with the NanoZoomer are analyzed with NDP.view2 software[29] and images acquired with the SP8 confocal were analyzed with Fiji software[30]

2.4. Phalloidin staining

T24 cell line was cultured as previously described. Cells were trypsinized and counted on malassez cell. T24 cells were washed three times with warm PBS (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Then, a maximum volume of 5 mL containing 80,000 cells was collected and then cytopinned on a slide for 10 min at 800 g at RT. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes and washed three times with PBS. T24 cells were then stained, according to the manufacturer’s instruction, with Phalloidin-iFluor 488 (Abcam plc. Cambridge, UK) and Hoechst (33,258, Sigma-Aldrich). The slide was sealed with Mowiol® 4–88 mounting media (81,381, Sigma-Aldrich) and a coverslip. Images were acquired with a confocal SP8 TCS Leica microscope.

2.5. Quantification software

Perifluo QCG[31] is a software that has been specially created, to determine the ratio of the PMF to cytoplasm fluorescence, while deducting the background, from a urine cytology or a cell line cytology that was acquired with the NanoZoomer in transmission and fluorescent mode (Video S1). The cytology that was acquired with the NanoZoomer was saved in a “.ndpis” format. In this format, the transmission and fluorescent parts were merged into a single image. The conversion of the “.ndpis” format into “.tif” format and the separation of the transmission mode from the fluorescent mode into two distinct images were a mandatory step for the continuation of the software. To separate fluorescence from transmission, the image was exported in “.tif” format with the NDP.view2 software (Hamamatsu) where it was possible to choose the channel of the image to export. Image was zoomed to the X0.9 objective to have a visual of the whole cytology and recorded digitally magnified 10 times. Fluorescence image was renamed “fluo.tif” and transmission image “bf.tif”. Both images were saved in the same folder so that the Perifluo QCG software can find them. Perifluo QCG was composed of two sub-software developed under Fiji. The first one merges the “fluo.tif” and “bf.tif” images into a single “.tif” image with both channels. It was then required to the operator to delimit a square of 12,000/12,000 pixels that encompasses the cytology. With this square, the software can divide the merged image into 16 sub-images of 3,000/3,000 pixels in order to simplify the software’s

calculation load. Then, they were saved in the same folder where the “bf.tif” and “fluo.tif” images were already saved. The second part of the software searches and determines the surface of each cell with the help of the ROI, image by image. This step was made on the “bf.tif” part of the image. The ROI search allows the software to determine the size of the cell, where the edge of the cell and where the cytoplasm is. Only cells with a diameter between 1,000 and 10,000 pixels were retained. Once cells have been located and analyzed, the data were reported on the “fluo.tif” image. After the data was transferred, the software could define the edge of each cell according to their previously determined ROI. Then, the software has determined a perimeter of 5 pixels around the cell to calculate the PMF. At the end an open torus was obtained. This geometrical figure encircles the cytoplasm and the cylinder of the torus represent the PMF. The general intensity of the cytoplasm and the PMF were then calculated by the software and the result was reported in a spreadsheet with the cell number. The Fluorescence Ratio (RF) of PMF of each cell was calculated on Excel (Microsoft) with the formula:

$$FR \text{ of one cell} = \frac{\text{intensity of plasma membrane fluorescence (or PMF)}}{\text{intensity of cytoplasm fluorescence}}$$

2.6. Animals

Rat Sprague Dawley males, 300 g (Janvier, Laval, France) were used. All animals were treated in accordance with the European Community Directive guidelines (Agreement B35-238-40 Biosit Rennes, France/No DIR 5569) and were approved by the local ethics committee and ensuring the breeding and the daily monitoring of the animals in the best conditions of well-being according to the law and the rule of 3R (Reduce—Refine—Replace). The rats were housed in a specific pathogenefree level laboratory under controlled conditions (12-hour lightedark cycle, controlled temperature and humidity, ad libitum access to food and water).

2.7. Experimental Protocol

All rats used in this study had to be sacrificed for research not associated with this study. For the AM conditions, rats were sacrificed in the morning and for the PM conditions, in the afternoon. Three to 5 rats were pooled by sample. Urine were collected by suprapubic puncture (±1 mL/rat) immediately after dissection of the rats and were then kept in PreservCyt® before staining protocol. After puncture, bladders were collected and maintained at 37 °C in PBS until there were used. To isolate UC from bladders we followed the protocol of T. Kloskowski *et al.*[32]. Once bladders were collected, they were turned upside down and placed in a 15 mL Falcon (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) tube containing a 0.05% trypsin solution. Falcon tubes were gently shaken for 2h at 37 °C. Trypsin was then inactivated by the addition of a serum-supplemented culture medium and the bladders were removed and opened to be laid flat. Once they were flattened, they were gently scraped in warm PBS to obtain as many cells as possible. The cells obtained after scraping were put back into the Falcon containing the culture medium and trypsin. The tube was then centrifuged at 400G for 5 min. The supernatant was removed and the cells were resuspended in 1–2 mL of culture medium before being placed in the PreservCyt®. After fixation, urine and bladders were stained according to the protocol described by Steenkeste *et al.*[1].

2.8. Permeabilization assays

After trypsinization, T24 cells were counted in malassez cells. 80,000 T24 cells were recovered and transferred to a 1.5 mL eppendorf tube (Sigma-Aldrich) containing PBS for the condition without triton or Triton 0.4% for the condition with triton. For each condition, one volume of cells is added for one volume of PBS or Triton 0.4% to obtain a final concentration of 0.2%. Cells are incubated for 90 seconds under agitation. Approximately 300 mL of urine was collected in 50 mL Falcons from healthy volunteers. The urine was

centrifuged at 700G for 4 minutes. The supernatant was discarded. The urine was then resuspended in 3 mL of PBS. For the Urine condition, 1 mL of urine was directly put into a jar of fixative. For the Urine + T24 condition, 1 mL of urine and 80,000 T24 cells were put into PreservCyt®. For the Urine + P.T24 condition, 1 mL of urine and 80,000 T24 cells permeabilized, as described above, were put into a fixative jar. All three conditions were then stained according to the protocol described by Steenkeste *et al.*[1].

2.9. Induction of cellular stress 251

Cells were seeded at the density of 40,000 cells/cm² 24 hours before the treatment. For senescence (Irradiated/Unreated condition) cells were only irradiated with X-ray (20 Gy, CellRad, Faxitron [no filter] 130 kV, 5 mA). For the induced cell stress condition (Irradiated/Treated condition), and according to the protocol explained by Correia-Melo *et al.*[33], cells were irradiated with 20 Gy and treated with neocarzinostatin (80 ng/ml) and H₂O₂ (400µM) in serum-free media for 1 hour. Following treatment, culture medium was refreshed with serum-free media. Etoposide treatment (50µM) was performed continuously every 3 days for 9 days for Irradiated/Treated condition. Cells were cultured with serum-free media for 9 days. Then cells were recovered and put in PreservCyt® for the staining or washed with PBS 3 times for cell death assay.

2.10. Western blot 262

Whole cell protein extracts were prepared for immunoblotting by cell lysis with RIPA buffer (Cell Signaling; Danvers, MA, USA) in combination with a protease inhibitor cocktail (Cell Signaling). Protein samples were subjected to electrophoresis using the NuPAGE 12% Bis—Tris Gels Electrophoresis system (Invitrogen). The antibodies used in this study were β-actin from Sigma Aldrich, P21 from Santa Cruz, anti-mouse and anti-rabbit IgG IgG, HRP-linked antibody from Cell Signaling Technology.

2.11. Cells death assay and flow cytometry 269

For cells death assay cells were cultured as described in “Induction of cellular stress” and stopped with trypsinization after 1 hour of treatment with etoposide for J+0, after 3 days of treatment for J+3, after 6 days of treatment for J+6 and after 9 days of treatment for J+9. Cells were washed 3 times with cold PBS and were centrifuged at 700G for 4 minutes. Annexin V staining was performed with FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD biosciences, inc, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.) according to the manufacturer’s instructions. Cells were then acquired on Gallios flow cytometer (Beckman Coulter) and the data were analyzed using Kaluza software. Total cell death was determined by summing the percentage of cells positive for annexin V with a percentage of cells positive for propidium iodide and with the percentage of cells positive for both markers.

2.12. Statistical Analysis 280

Statistical analyses of PMF quantification were performed with one-way analysis of variance (ANOVA) to calculate significant differences between groups using Prism 8 (8.4.3). A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

3. Results 284

3.1. Role of the nucleus and the cytoplasm in the PMF phenomenon 285

The analysis of Papanicolaou-stained urine cytology is usually done only in bright field light, only very recently has the utility of analysis in transmitted light been demonstrated[1,34]. The use of fluorescence on Papanicolaou-stained UC facilitates the visualization of different states of the UC on the urine cytology of a patient. The healthy UC will fluoresce evenly throughout the cell (Figure 1a ; Figure 1Sa-b). In advance and early-stage UTC, fluorescence will be much more prominent in the plasma membrane (periphery)

than in the cytoplasm and nucleus (Figure 1 a-b; Figure 1Sa-b). The presence of such fluorescence on the UTC is referred to as peri-membrane fluorescence (PMF) and allows for an improved and easier diagnosis of the BC. The main characteristic that allows the diagnosis of a UTC with bright field light is the presence of a nucleus that occupies at least 70% of the cell space[35]. It is possible to find UTC in which the nucleus takes up almost all of the cytoplasm, which is why we were interested in determining whether the size of the nucleus plays a role on the PMF phenomenon and therefore whether it is due to the morphological features of the UTC. Thus, we investigated whether the presence of a large nucleus would take up the entire cell volume and engulf almost the entire cytoplasm. Only a small part of the cytoplasm, located close to the plasma membrane, would then be visible and thus responsible for the PMF phenomenon (Figure 1 a-b; Figure 1S), like the moon covering the sun during an eclipse. We speak then of an eclipse effect where the nucleus plays the role of the moon and the cytoplasm that of the sun. T24 cell line was used to study the BC. This cell line was derived from a malignant bladder cancer undergoing progression to the muscle layer of the bladder wall. To determine if the nucleus was able to induce this effect, we labeled the cytoplasm with phalloidin and the nucleus with

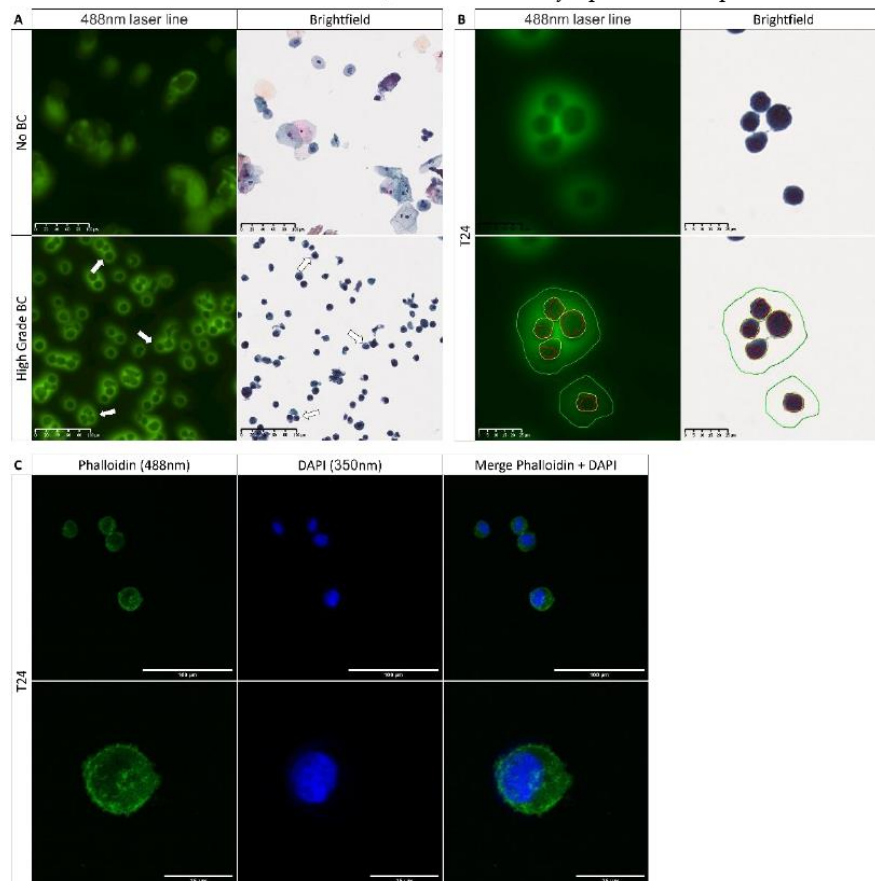


Figure 1 Characteristics of the fluorescence from healthy and tumoral urothelial cells. A) Urinary cytology acquired on the scanner of a healthy patient (No BC) and a patient with an HGBC (High-Grade BC) in bright field light and at 488 nm; arrows show the tumor cells expressing a PMF. B) Scanning images of T24 cells from a cell culture with a demarcation of the nuclear membrane in red, the plasma membrane in yellow and the PMF, in green in bright field light and at 488 nm. C) Immunofluorescence labeling of the cytoplasm with phalloidin (488 nm) and of the cell nucleus with DAPI (350 nm) to determine the presence of an eclipse effect.

DAPI. Following the labeling, we find that the nucleus does not take all the space in the cell (**Figure 1c**) and therefore does not induce this eclipse effect. We conclude that the PMF is not due to this effect. In summary, we have shown that the size of the nucleus does not intervene in the PMF phenomenon and that it is indeed a peri-membrane phenomenon.

3.2. PMF expressed on cells line from various origins

As described above, the cells which express a PMF in patient urine cytology are generally UTCs. Our BC model, the T24 cell, has the same PMF (**Figure 1 b ; Figure 1Sa-b**) as the UTC found in BC patients and is therefore valid for the study of PMF. For comparison purposes we wanted to know if other cell lines were able to express this PMF phenomenon. For this purpose, we first wanted to determine if only bladder carcinoma cells expressed this PMF by comparing them to other non-bladder epithelial carcinomas cell lines. For this first comparison, we used cells in suspension after detaching them with trypsin in order to mimic what is found in urine with the UTC (**Figure 2a**). As can be seen, whatever the cell derived from non-bladder epithelial carcinomas we observe the presence of a PMF identical to T24 cells. We therefore wanted to investigate whether this PMF was only present on the cell lines from non-bladder epithelial carcinomas by comparing them with the non-epithelial carcinomas cell lines. For this purpose, we used a line derived from the immortalized human embryonic fibroblasts (MRC-5 hTERT), a malignant tumor of bone origin (U2-OS) and a small cell lung carcinoma (H69) (**Figure 2c**). Like the previous cell lines, PMF was also found in cell lines not derived from epithelial carcinomas. Based on the fact that UCs are epithelial cells and don't express any PMF on urine cytology, it was hypothesized that only the normal healthy epithelial cells do not express PMF. To validate this hypothesis, a normal human bronchial epithelial line immortalized with CDK4 was tested. But in this case a PMF was also found (**Figure 2e**). Finally, we used a primary bladder cell line to determine if only healthy bladder cells did not express PMF, but even with this line PMF is observed (**Figure 2f ; Figure 2Sa**). We then wanted to determine whether protein mechanisms involved in cell adhesion played a role in the PMF phenomenon. For this we used adherent cell lines from non-bladder epithelial carcinomas and cell lines not from epithelial carcinomas. The cells were grown directly on slides and then stained with Papanicolaou without being trypsinized (**Figure 2b & 2d**). It can be seen that in this case, the fluorescence is always more pronounced at the plasma membrane than in the cytoplasm. Whether the cell is adherent or in suspension, a PMF is always observed. Thus, cell adhesion is not involved in this phenomenon. We therefore show here that cells, whether healthy or tumor cells, in suspension or adherent, exhibit PMF. To validate whether all cells exhibit identical PMF or cell type-dependent PMF, it was important to examine the fluorescence in more detail and move from a qualitative to a quantitative analysis. The advantage of a quantitative analysis is that if there is a variation in fluorescence between different cell lines that express a PMF, it will be possible to distinguish it. This allows to determine which type of PMF the cells express according to their physiological state or tissue origin. To determine the PMF in a quantitative way, a software capable of determining precisely the membrane and cytoplasmic fluorescence was developed. This software, Perifluo QCG[31], is able to detect every cell present in the sample. When a cell is detected, its cytoplasmic and peripheral/membrane fluorescence are quantified while deducting the background. At the end of the process, the PMF and cytoplasmic fluorescence of each cell have been quantified. A fluorescence ratio (FR) is then determined on all cells by using the previously obtained data.

This software allows us to determine a PMF threshold where all samples with an average FR greater than 1 were considered samples with a majority of cells expressing a PMF and conversely for samples with an average FR less than 1. After quantification, it was found that the FR of the different cell lines was higher than 1 and there was no significant difference between the different cell lines analyzed (**Figure 2g ; Figure 2Sb**). The presence of FR higher than 1 on all the cells analyzed confirmed that they all express a PMF. None of the

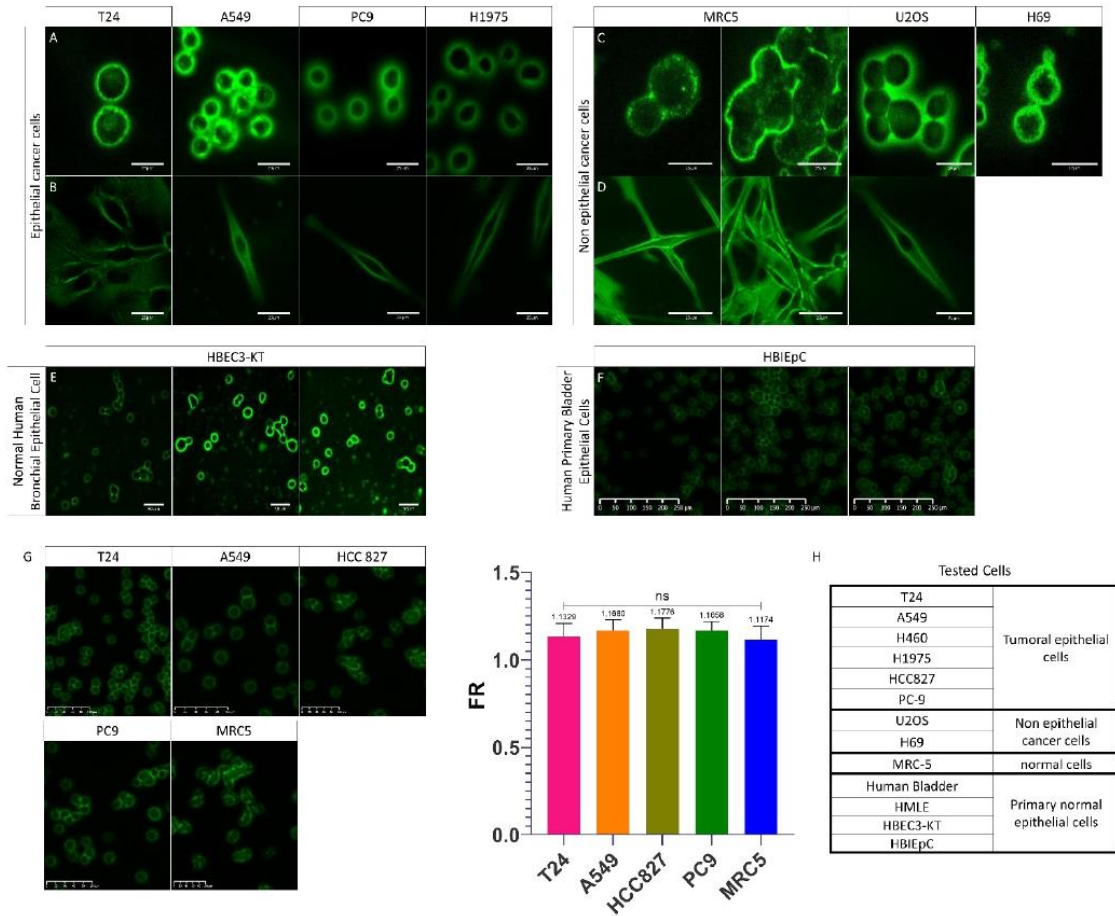


Figure 2 PMF on different cells line. a) Images acquired on confocal microscope of epithelial cancer cell lines in suspension mounted on the slide as a urinary cytology. b) Z-stack images acquired on confocal microscope of adherent epithelial cancer cell lines mounted in slide as urinary cytology. c) Images acquired on confocal microscope of non-epithelial cell lines in suspensions mounted in slide as urinary cytology. d) Z-stack images acquired on confocal microscope of adherent non-epithelial cell lines mounted on slide as urinary cytology. e) Images acquired on the scanner of a normal human bronchial epithelial cell line. f) Images acquired on the scanner of a normal human primary bladder epithelial cell line. g) Images acquired on the scanner on previously tested cell lines and quantification of their PMF with FR. Bar graphs represent mean (SD) (ns> 0.05). h) Origins of tested cells showing PMF.

cells tested (Figure 2h) were detected without PMF. Moreover, the absence of significant difference between the PMF of the tested cell lines confirmed that the PMF is cell type dependent but is found in all cells in all cases. We can therefore conclude that regardless of the type of cell line used and its status, the PMF phenomenon was always observed. Based on the fact that before being found in urine, UCs are present in their tissue of origin, the urothelium that lines the bladder[36] and all the cells tested showed a PMF, it was hypothesized that the passage of UCs from urothelium to urine induced a change in PMF which cannot be seen in cell culture.

360
361
362
363
364
365
366
367

3.3. Urothelial cells collected in the urine versus the urothelial cells collected in the urothelium 368

In order to understand the differences in PMF of the UCs recovered in the Urine 369 (UCU), the healthy rat model was used to determine whether or not UCUs recovered by 370 suprapubic puncture express a different PMF than UCs recovered from the UroThelium 371 (UCUT). The rat model was chosen because the quantity of urine and the size of the bladder 372 are much larger than in the mouse. For each condition between 2 and 5 rats were 373 analyzed. It was found, by quantitative analysis, the general FR of UCUs is less than 1 374 (ranging from 0.62 for the minimum to 0.85 for the maximum) (**Figure 3a**; **Figure 3sa**), 375 confirming that the UCUs do not show a PMF. In contrast to urine, for UCUTs we observe 376 a clear presence of PMF (**Figure 3b**; **Figure 3Sb**). Thus, there was a very significant increase 377 in the FR for UCUTs compared to UCUs, with a FR of 1.081 and 0.708 respectively 378 (**Figure 3c**). It can therefore be concluded that UCs do not have the same PMF when re- 379 covered from urine or directly from urothelium. 380

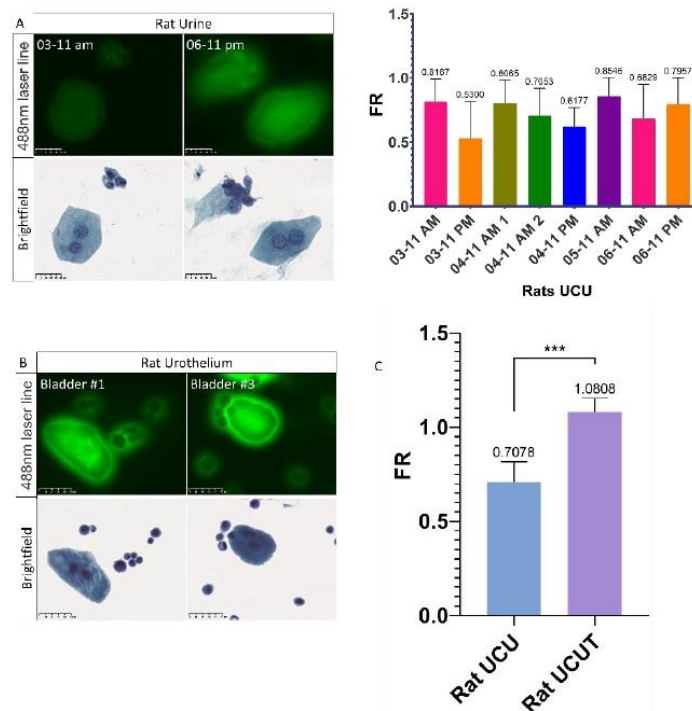


Figure 3 Fluorescence and PMF of UCUs and UCUTs. a) Images acquired on the scanner of UCUs and quantification of their PMF. Three to 5 rats were pooled by sample. b) Images acquired on the scanner of UCUTs. c) Quantification of the PMF of UCUs versus UCUTs. Bar graphs represent mean (SD) (***) $P < 0.001$.

3.4. Role of the plasma membrane integrity on the PMF 381

With these results, we hypothesized that the shift in PMF is due to a cellular modification 382 induced during the transition from urothelium to urine. We thought that this modification 383 of the PMF was possibly induced during the normal detachment of UCs from the 384 urothelium towards the urine. Detachment of UCs is frequently caused by more or less 385 aggressive cellular stresses such as senescence, apoptosis or injuries[36,37]. Furthermore, 386 once the cells are suspended in the urine, the lack of cell-cell interaction leads to the 387 activation of anoikis, a phenomenon responsible for the entry into apoptosis of the 388 cells[38,39]. All of these phenomena often lead to a metabolic change in the cell which can 389

result in a modification of its composition or its integrity, in particular at the level of the plasma membrane which can become permeable or change its composition[40–42]. To understand the importance of plasma membrane integrity, a permeabilization of the plasma membrane was induced in T24 cells to mimic this phenomenon potentially undergone by UCUs during stress and to determine its involvement in PMF. To recreate the phenomenon of permeabilization Triton was used. Triton is a monomeric detergent able to insert itself into the lipid membrane, ultimately permeabilizing the membranes. To determine the importance of membrane integrity on the PMF, T24 cells were treated with 0.2% Triton-PBS for 90 seconds. After treatment, a visual decrease in PMF was observed (Figure 4a). Following these results, we wanted to know if it was possible to recreate what was observed with UCUs. To do so, we compared the FR of urine from a healthy patient versus urine from a healthy patient supplemented with T24 cells versus urine from a healthy patient supplemented with T24 cells permeabilized with 0.2% triton (Figure 4b; Figure 4S). It was found that the FR of the urine supplemented with permeabilized T24 cells was less than 1 and did not differ significantly from the urine of the healthy patient (0.9022 and 0.9489 respectively) (Figure 4b; Figure 4S). On the contrary, the FR of urine containing non-permeabilized T24 cells was found to be greater than 1 (1.16) and was very significantly different from both healthy and permeabilized T24 cell-containing patient urine (Figure 4b; Figure 4S). Therefore, we were able to recreate what is observed with UCUs and the integrity of the membrane is very important for the PMF phenomenon since its disruption leads to a loss of the PMF.

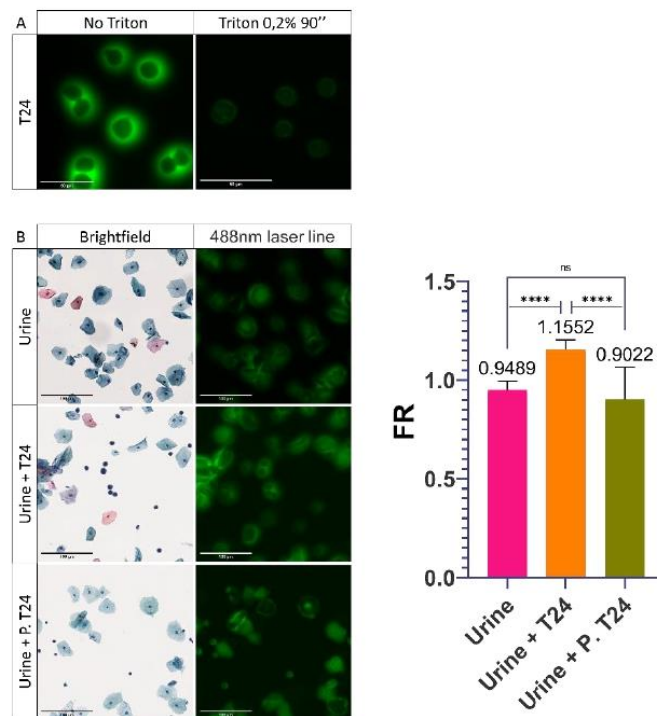


Figure 4 Influence of the permeabilization of the plasma membrane on cells. a) Images acquired on confocal microscope of the permeabilization of T24 cells with 0.2% triton for 90 seconds. b) Images acquired on the scanner of healthy urine alone (Urine), supplemented with T24 cells (Urine + T24) or supplemented with T24 cells permeabilized (Urine + P. T24) with 0.2% triton for 90 seconds and quantification of their PMF. Bar graphs represent mean (SD) (ns> 0.05; **** P <0.0001).

3.5. Influence of the cellular stresses on the PMF.

After having observed that the integrity of the membrane is very important for the PMF, we wanted to know if instead of inducing an alteration of the plasma membrane using detergent it could be induced by the activation of cellular stresses. Activating cellular stresses would bring us closer to the physiological phenomenon observed during the passage from urothelium to urine and thus recreate what is found in the UCU. Thus, immortalized healthy MRC-5-hTERT cells were first studied. Senescence was induced, as described by Correia-Melo *et al.*[33] by irradiating them with X-rays (20 Gy). This senescence condition was called Irradiated/ Untreated condition (I/U). To induce a stronger cellular stress than senescence, cells were treated according to the protocol of Correia-Melo *et al.* [33]. An initial X-ray treatment was performed (20 Gy) followed by a one hour incubation in fresh serum-free medium containing neocarzinostatin (NCS) and H₂O₂. Then the medium was removed and replaced with fresh serum-free medium supplemented with

411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423

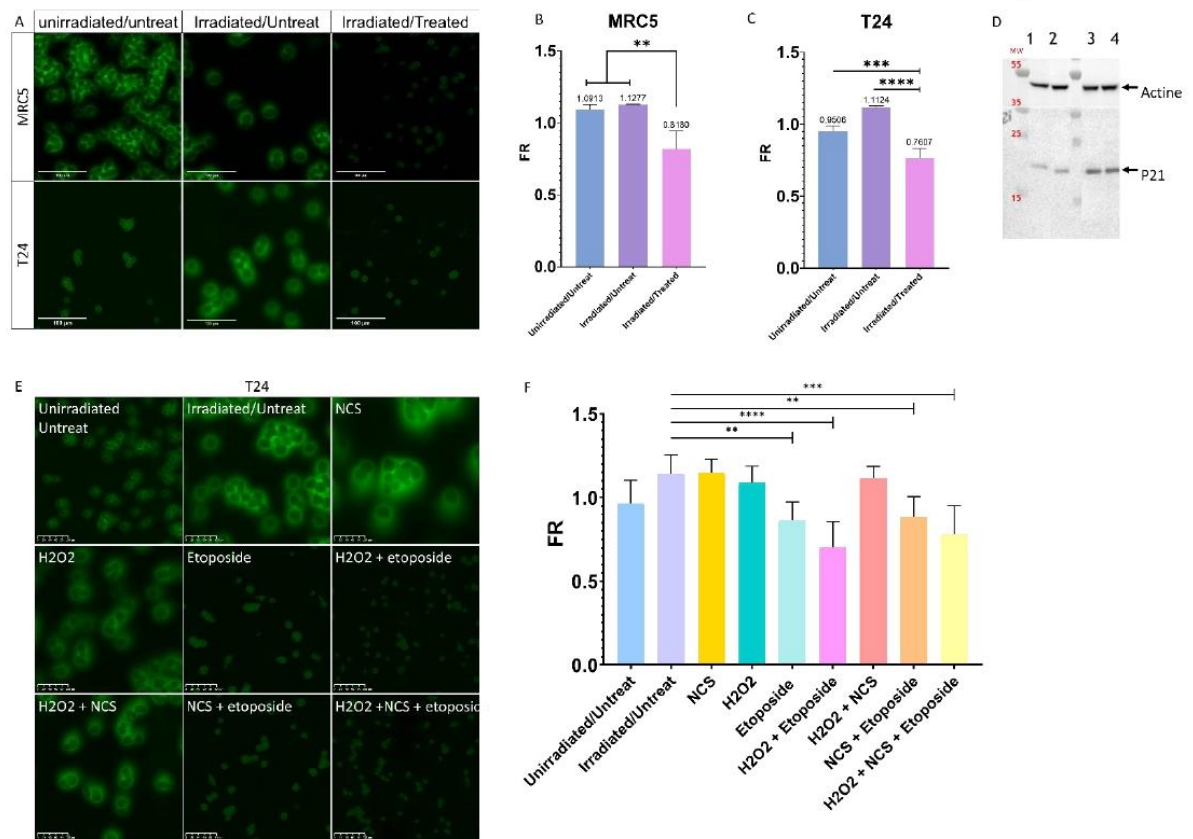


Figure 5 Involvement of cellular stress in the modulation of PMF. a) Effect of irradiation with or without treatment on the PMF of MRC-5hTERT and T24 cells after nine days. b) Quantitative determination of the effects of irradiation with or without treatment on the PMF of MRC-5 hTERT after nine days. Bar graphs represent mean (SD) (** P <0.01). c) Quantitative determination of the effects of irradiation with or without treatment on the PMF of T24 cells after nine days. Bar graphs represent mean (SD) (** P <0.001); **** P <0.0001). d) Western blot of P21; 1: unirradiated/ untreated T24 cells grown with serum, 2: unirradiated/ untreated T24 cells grown without serum, 3: irradiated/ untreated T24 cells grown without serum, 4: irradiated/ treated T24 cells grown without serum. e) Effect of the different treatments and molecules to induce senescence and cellular stress on the T24 cell PMF after nine days. f) Quantitative determination of the impact of different treatments and molecules to induce senescence and cellular stress on T24 cell PMF after nine days. Bar graphs represent mean (SD) (** P <0.01; *** P <0.001), **** P <0.0001).

etoposide. This cellular stress condition was called Irradiated/ Treated condition (I/T). After nine days of treatment, a significant decrease in the FR of MRC-5-hTERT was observed for I/T conditions compared with the Unirradiated/Untreated (U/U) and I/U conditions (**Figure 5 a-b; Figure 5 Sa**). To confirm the involvement of the stress in the decrease/loss of the PMF, we wanted to know if it was possible to obtain these same observations with our bladder cancer model whose cells are known to always express a PMF. For this purpose, cells were cultured under the same conditions as MRC-5-hTERT. After treatment, I/T T24 cells were also found to express significantly lower FR than U/U and I/U T24 cells (0.761 vs 0.951 and 1.1124 respectively) (**Figure 5a & 5c; Figure 5Sb**). To confirm the induction of senescence, the activity of P21, a major protein involved in the senescence[43], was determined. Western blot analysis revealed that P21 was found more expressed in the I/U condition than in the U/U condition (**Figure 5d**), confirming the activation of senescence by X-ray irradiation. Senescence activation alone in the I/U condition is not sufficient to induce the decrease in PMF, in contrast to the I/T condition where it was required to induce a strong cellular stress in addition to senescence activation (**Figure 5d**). To confirm the importance of the treatment, it was decided to separate the different phases and molecules used to induce a cellular stress (**Figure 5e -f ; Figure 6S**). The use of etoposide was determined to be the major and determining factor in the decrease in PMF. A synergistic effect was observed when cells were treated for one hour with H2O2 in addition to etoposide. In contrast, the use of NCS alone or added to etoposide conditions did not induce any change in PMF, an effect also seen with H2O2 used alone. In conclusion, inducing senescence with X-ray irradiation alone is not sufficient to induce a shift of the PMF. Only the treatment with etoposide and irradiation was able to induce a modification of the PMF similar to what was observed with the UCU. It was also found that this effect was enhanced by the presence of H2O2 capable of inducing oxidative stress. These results lead to the hypothesis that irradiation and treatment would induce a change in cellular state that could be responsible for the shift of the PMF.

3.6. Influence of the cell death in the modulation of PMF

To validate the hypothesis of cell state change, we wanted to know the importance of cell death on PMF. Etoposide is known to induce the cell death if used at high dose[44], so it was important for us to see if the decrease of the PMF was induced by an activation of cell stress or cell death and thus confirm the involvement of cell stress in this phenomenon. For this purpose, FR were analyzed on the first day of treatment (J+0), the third (J+3), the sixth (J+6) and the last day (J+9) of T24 cells (**Figure 6a**). Only a significant decrease in the FR of the I/T condition was observed on the last day of treatment, confirming that a long and repeated exposure was required for the loss of the PMF. It was therefore important to know whether after nine days of treatment the significant decrease in FR, and thus PMF was caused by a significant rate of cell death or by the presence of cell stress independent of apoptosis. To determine the impact of the cell death on PMF a flow cytometry assay with annexin V (apoptosis) and Propidium Iodide (necrosis)[45] on the T24 cell was performed in parallel with PMF quantification (**Figure 6b; Figure 7S**). An overall increase in cell death was observed for the I/U and I/T conditions compared to U/U cells (**Figure 6b; Figure 7S**). Despite this high level of cell death from J+0 to J+6 for the I/T condition than I/U, no change in FR was noticed (**Figure 6a**). Although there was a significant increase in cell death at J+3 for the I/T condition compared to the I/U condition, no change in PMF was observed (**Figure 6 a-b); Figure 7S**. This suggests that cell death would not be playing a significant enough role to induce a change in PMF at this stage. At J+9, while there was a significant decrease in PMF for the I/T condition, the level of cell death was greater for the I/U condition than I/T and U/U (42.17% vs. 22.23% and 4.81%) (**Figure 6 a-b; Figure 7S**). If cell death and decreased PMF were correlated, a low FR and high level of cell death should have been found with our I/Ts conditions. These results demonstrate that there is no correlation between cell death and PMF decrease. It can therefore be concluded that the decrease in PMF is observable between the sixth and ninth day of the

treatment and that the increase in cell death caused by irradiation with or without treatment is not able to induce a decrease in PMF. 477 478

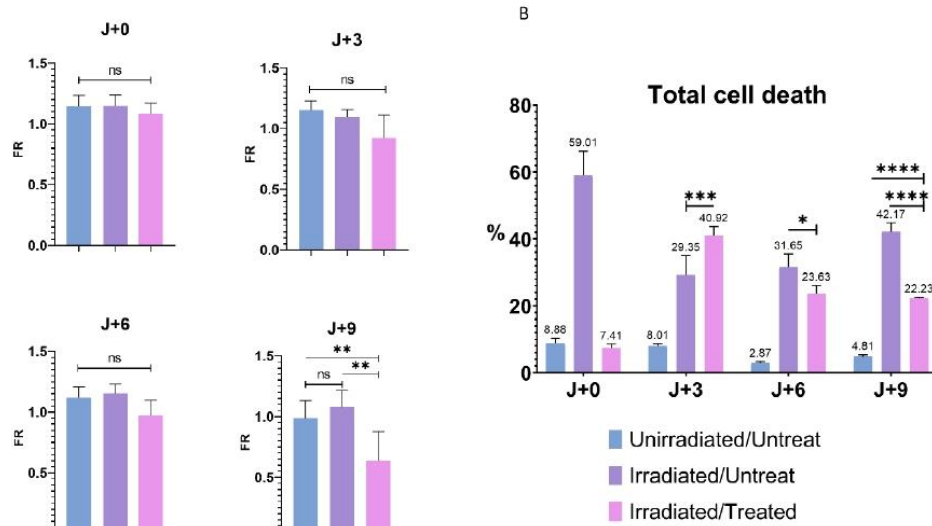


Figure 6 Cell death and PMF. a) Quantitative determination of PMF after irradiation- and treatment-induced senescence on T24 cells at J+0, J+3, J+6 and J+9. Bar graphs represent mean (SD) (ns> 0.05; ** P <0.01). b) Flow cytometry determination of early apoptosis, late apoptosis and necrosis combined after induction of cellular stress by irradiation and treatment on T24 cells, labeled with annexin V and propidium iodide. Bar graphs represent mean (SD) (* P <0.05; *** P <0.001); **** P <0.0001).

4. Discussion 479

Since the discovery of PMF by the team of Steenkeste *et al*[1] no research has been 480 conducted to understand its origin, so in this present study we sought to characterize 481 this phenomenon. We have shown that the phenomenon of PMF was not due to morphological 482 and discriminating features of BC cells, all cells in shape and not originating from urine 483 show PMF. The plasma membrane was then studied and we showed that its permeabilization 484 revealed the crucial role of its integrity in the maintenance of the PMF. Finally, by 485 recreating a strong cellular stress in T24 cells, it was possible to reproduce a PMF similar 486 to the UCUs, suggesting that such a phenomenon was responsible for the loss of the PMF 487 in the UCUs. 488

Today, early detection of BC is a crucial issue, especially for the increase of the survival 489 rate. BC is one of the most expensive cancers to treat and follow. The average cost of 490 care during the first year after diagnosis varies from \$47,500 for advanced stage to \$14,300 491 for an early stage. It can reach over than \$172,000 for a long-term survivor[46]. An early 492 detection of BC would improve the management of the patient, could lower these expenses 493 and increase the chances of survival. Indeed, the 5-year relative survival is 96% 494 when BC is detected as carcinoma in situ, and drops drastically for other stages (70% for 495 non-muscle invasive BCs, 37% for muscle invasive BCs and 6% for metastasized 496 BC)[5,47,48]. 497

Thus, research in recent years has focused on new diagnostic methods, based on the 498 search for biomarkers such as free DNA from circulating cells, microRNA, circular RNA, 499 non-coding RNA, proteins, cells, *etc.*[4,7–9]. Despite a continuous search for new 500 biomarkers and the introduction of new FDA-validated diagnostic tests, urine cytology and 501

cystoscopy remain the gold standard tests for BC[49]. The new diagnostics, used in parallel with the reference tests at best, only slightly improve the initial diagnosis and do not reduce the cost. However, the reference tests are not without flaws. Despite its high sensitivity and specificity[50], cystoscopy is particularly troublesome for patients. It is painful, despite the fact that it is performed under local anesthesia, and can lead to complications (e.g., urinary tract infections or pain during urination). These discomforts experienced by patients can lead to loss of follow-up, detrimental to patient survival[51,52]. Conversely, urine cytology, as a non-invasive and low-cost test, is very well experienced by the patient and gives good results for HGBC. Nevertheless, its sensitivity is too low for the diagnosis of LGBC. This is why, lately, research focused on improving urine cytology, a simple and low-cost technique. Since the identification of PMF by the team of Steenkeste *et al*[1], new possibilities for its improvement have emerged.

Based on their research, we wanted to understand and characterize the PMF. In this perspective, it was essential to know if the PMF was a phenomenon induced by the morphological feature, called eclipse effect, or if it was a biological event induced by the staining. We were interested in the morphological feature because a large number of studies describe the large size of the cell nucleus (greater than 70% of the cytoplasm volume) as a key factor in the identification of a UTC[35,53]. After labeling the nucleus and cytoplasm, we showed that the cell nucleus was large but not large enough to induce this phenomenon. We were therefore able to deduce that this was a biological feature, which occurs during staining.

Based on the assumption that only UTCs show PMF, we searched for cell lines not expressing PMF to compare their cell composition with T24 cells. After testing many cell lines, of various origins, healthy or tumor, we found that all cells showed PMF after Papanicolaou cytology staining.

In order to understand this phenomenon, it would have been useful to look at the dyes used, the Sakura® film that covers the cytology and the glue used for mounting. The results are not described in this publication, but have been researched in parallel to this study. To determine the role of the dyes in PMF, a study was done on the different staining steps where one of the dyes (hematoxylin, EA50 or OG6) was removed independently from the others to understand their respective importance. According to this study, EA50 and OG6 are essential to visualize the PMF and hematoxylin and EA50, for the intensity of the PMF (data not shown).

As we could not characterize the chemical origin of the PMF nor to find a cell line without PMF, we decided to set up a software able to give the precise PMF of a cell in order to determine if the cells already tested showed a variation of PMF or not, depending on the origin of the cell.

This software, Perifluo QCG, offered us the necessary elements to go from a qualitative analysis where we were looking for a cell model without PMF to compare with a model with PMF, to a quantitative analysis where we could significantly determine a variation in PMF. As a result, our software can quantify every cell on the cytology extremely quickly, giving us a great amount of information. Perifluo QCG uses a simple process whereby it calculates the cytoplasmic and membrane fluorescence (up to 5 pixels around the membrane), while deducting the background. Once the data is obtained, the PMF value is calculated by operating FR.

If this FR value is greater than 1, the membrane fluorescence is more important and a PMF is therefore present; conversely if the FR value is less than 1.

Thanks to this tool, the determination of the FR of cells already tested was facilitated, allowing to easily distinguish the variations of PMF according to the cell lines used. The use of the Perifluo QCG software did not reveal any significant differences in PMF and confirmed that all cells, after Papanicolaou staining, constitutively express this fluorescence. The software also allowed us to confirm the hypothesis that UCUs would have an FR lower than 1 and therefore would not express PMF, unlike UCs recovered from the UroThelium (UCUT) which have an FR higher than 1. From these results, it is clear that

the transition from bladder to urine induces a change in the cell that can interfere with the staining. Thus, we hypothesized that when UCs desquamate and find themselves in an environment unfavorable to their survival, various cellular mechanisms intervene and induce a strong cellular stress[24,25], leading to a membrane alteration responsible for the PMF decrease. To confirm the importance of the plasma membrane in the PMF phenomenon, we used a detergent to permeabilize the plasma membrane of our cells. Initially, a decrease in PMF, similar to that obtained with UCUs, was observed. This decrease was also observed after induction of intense stress, independently of the activation of senescence. These results confirm that the membrane plays an important role in PMF and that PMF is sensitive to strong cellular stress.

In view of these results, we suggest that the plasma membrane plays a primary role in the PMF, especially regarding its composition. We hypothesize that one of the main stresses on UCs could be induced by anoikis after UCs detachment. Anoikis induces the entry of the UCs into apoptosis, which leads to a change in the composition of the plasma membrane[38,54]. The resistance of tumor cells to this phenomenon and its importance in metastatic dissemination has been widely described[55,56]. Therefore, we suggest that UTCs, like many tumor cells, are able to resist anoikis when suspended in urine. This resistance prevents the induction of cellular stresses and thus the alteration of the plasma membrane.

Our study shows that the plasma membrane plays a major role in PMF, however this criterion alone would not be suitable to determine the presence or absence of UTCs (as for example a common live/dead cell staining) since not all live cells are necessarily UTCs.

To confirm this hypothesis, it would be interesting to study the activation of anoikis on our T24 cells using a drug, as proposed by Terasaki et al., whose research showed that norcantharidin induces anoikis in their cell model[57]. A second possible approach would be to directly induce a change in the composition of the plasma membrane by inhibiting the production of PhosphatidylCholine (PC), a major phospholipid of the plasma membrane (representing 40% of the phospholipids)[58]. The preliminary study which was conducted shows that inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis by miltefosine for 24 hours induced a significant decrease in PMF independent of apoptosis (Figure 8S). To go further, it would be useful to assay PC to determine its expression level in the membrane and highlight its importance in PMF.

In summary, we propose that PMF is not only observed in UTCs, but in any cell in good shape. We speculate that the high resistance of UTCs to external aggression allows them to survive better in urine, unlike UCs, which, once in suspension, dies more easily and lose their PMF.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title; Table S1: title; Video S1: title.

Author Contributions: Conceptualization, C.G., M.C., L.L. and R. P.; methodology, C.G., L.L., X.P. and R.P.; software, X.P., C.G. and M.C.; validation, R.P.; formal analysis, C.G.; investigation, C.G., L.L., M.C. and R.P.; resources, K.J., P.R., X.P., L.L. and R.P.; data curation, C.G.; writing—original draft preparation, C.G.; writing—review and editing, L.L. and R.P.; visualization, L.L. and R.P.; supervision, L.L. and R.P.; project administration, R.P.; funding acquisition, L.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Region Bretagne, European Regional Development Fund, Rennes Metropole, VitaDX, University Rennes 1 and INSERM. P.R. was funded by an ANR.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Comité de Protection des Patients (protocol 160,642, approval 07/2016) and Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de sante (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02966691).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. 609
610

Acknowledgments: We thank the photonic facility of the Microscopy Rennes Imaging Center (MRic-Photonics) of Biosit, Université de Rennes 1. MRic is member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). We thank the Animalerie Rennaise Centre d’Hébergement et d’Expérimentation (Arche) of Biosit, Université de Rennes 1, for graciously giving us rats and for the irradiation of the cells. 611
612
613
614
615

Conflicts of Interest: The authors declare conflicts of interest. The authors received fundings from VitaDX. VitaDX had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript. 616
617
618

References 619

1. Steenkeste, K.; Lécart, S.; Deniset, A.; Pernot, P.; Eschwège, P.; Ferlicot, S.; Lévêque-Fort, S.; Briandet, R.; Fontaine-Aupart, M.-P. Ex Vivo Fluorescence Imaging of Normal and Malignant Urothelial Cells to Enhance Early Diagnosis. *Photochem Photobiol* **2007**, *83*, 1157–1166, doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00079.x. 620
621
622
2. Global Cancer Observatory Available online: <https://gco.iarc.fr/> (accessed on 14 October 2021). 623
3. Barkan, G.A.; Wojcik, E.M.; Nayar, R.; Savic-Prince, S.; Quek, M.L.; Kurtycz, D.F.I.; Rosenthal, D.L. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology. *ACY* **2016**, *60*, 185–197, doi:10.1159/000446270. 624
625
626
4. Charpentier, M.; Gutierrez, C.; Guillaudeux, T.; Verhoest, G.; Pedeux, R. Noninvasive Urine-Based Tests to Diagnose or Detect Recurrence of Bladder Cancer. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 1650, doi:10.3390/cancers13071650. 627
628
5. Farling, K.B. Bladder Cancer: Risk Factors, Diagnosis, and Management. *The Nurse Practitioner* **2017**, *42*, 26–33, doi:10.1097/01.NPR.0000512251.61454.5c. 629
630
6. Planz, B.; Jochims, E.; Deix, T.; Caspers, H.P.; Jakse, G.; Boecking, A. The Role of Urinary Cytology for Detection of Bladder Cancer. *Eur J Surg Oncol* **2005**, *31*, 304–308, doi:10.1016/j.ejso.2004.12.008. 631
632
7. Birkó, Z.; Nagy, B.; Klekner, Á.; Virga, J. Novel Molecular Markers in Glioblastoma-Benefits of Liquid Biopsy. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, E7522, doi:10.3390/ijms21207522. 633
634
8. Pisapia, P.; Malapelle, U.; Troncone, G. Liquid Biopsy and Lung Cancer. *Acta Cytol* **2019**, *63*, 489–496, doi:10.1159/000492710. 635
636
9. Alimirzaie, S.; Bagherzadeh, M.; Akbari, M.R. Liquid Biopsy in Breast Cancer: A Comprehensive Review. *Clin Genet* **2019**, *95*, 643–660, doi:10.1111/cge.13514. 637
638
10. The Finn Bladder Group; Raitanen, M.-P.; Kaasinen, E.; Rintala, E.; Hansson, E.; Nieminen, P.; Aine, R.; Tammela, T.L.J. Prognostic Utility of Human Complement Factor H Related Protein Test (the BTA Stat®Test). *Br J Cancer* **2001**, *85*, 552–556, doi:10.1054/bjoc.2001.1938. 639
640
641
11. Kinders, R.; Jones, T.; Root, R.; Bruce, C.; Murchison, H.; Corey, M.; Williams, L.; Enfield, D.; Hass, G.M. Complement Factor H or a Related Protein Is a Marker for Transitional Cell Cancer of the Bladder. *Clin Cancer Res* **1998**, *4*, 2511–2520. 642
643
644
12. Miyanaga, N.; Akaza, H.; Tsukamoto, T.; Ishikawa, S.; Noguchi, R.; Ohtani, M.; Kawabe, K.; Kubota, Y.; Fujita, K.; Obata, K.; et al. Urinary Nuclear Matrix Protein 22 as a New Marker for the Screening of Urothelial Cancer in Patients with Microscopic Hematuria. *International Journal of Urology* **1999**, *6*, 173–177, doi:10.1046/j.1442-2042.1999.06437.x. 645
646
647
648
13. Balci, M.; Tuncel, A.; Guzel, O.; Aslan, Y.; Sezgin, T.; Bilgin, O.; Senel, C.; Atan, A. Use of the Nuclear Matrix Protein 22 Bladder Chek Test™ in the Diagnosis of Residual Urothelial Cancer before a Second Transurethral Resection of Bladder Cancer. *Int Urol Nephrol* **2015**, *47*, 473–477, doi:10.1007/s11255-015-0921-4. 649
650
651

14. Bergeron, A.; LaRue, H.; Fradet, Y. Identification of a Superficial Bladder Tumor-Associated Glycoform of the Carcinoembryonic Antigen by Monoclonal Antibody 19A211. *Cancer Res* **1996**, *56*, 908–915. 652
653
15. Bergeron, A.; Champetier, S.; LaRue, H.; Fradet, Y. MAUB Is a New Mucin Antigen Associated with Bladder Cancer (*). *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 6933–6940, doi:10.1074/jbc.271.12.6933. 654
655
16. Sokolova, I.A.; Halling, K.C.; Jenkins, R.B.; Burkhardt, H.M.; Meyer, R.G.; Seelig, S.A.; King, W. The Development of a Multitarget, Multicolor Fluorescence in Situ Hybridization Assay for the Detection of Urothelial Carcinoma in Urine. *The Journal of Molecular Diagnostics* **2000**, *2*, 116–123, doi:10.1016/S1525-1578(10)60625-3. 656
657
658
659
17. van Valenberg, F.J.P.; Strauss-Ayali, D.; Agmon-Gerstein, Y.; Friedman, A.; Arentsen, H.C.; Schaafsma, H.E.; Witjes, J.A.; Oosterwijk, E. Assessment of the Efficacy of Repeated Instillations of Mitomycin C Mixed with a Thermosensitive Hydrogel in an Orthotopic Rat Bladder Cancer Model. *Ther Adv Urol* **2018**, *10*, 213–221, doi:10.1177/1756287218762064. 660
661
662
663
18. Pichler, R.; Tulchiner, G.; Fritz, J.; Schaefer, G.; Horninger, W.; Heidegger, I. Urinary UBC Rapid and NMP22 Test for Bladder Cancer Surveillance in Comparison to Urinary Cytology: Results from a Prospective Single-Center Study. *Int. J. Med. Sci.* **2017**, *14*, 811–819, doi:10.7150/ijms.19929. 664
665
666
19. Shariat, S.F.; Karam, J.A.; Lotan, Y.; Karakiewicz, P.I. Critical Evaluation of Urinary Markers for Bladder Cancer Detection and Monitoring. *Rev Urol* **2008**, *10*, 120–135. 667
668
20. Oeyen, E.; Hoekx, L.; De Wachter, S.; Baldewijns, M.; Ameye, F.; Mertens, I. Bladder Cancer Diagnosis and Follow-Up: The Current Status and Possible Role of Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, E821, doi:10.3390/ijms20040821. 669
670
671
21. Kassouf, W.; Traboulsi, S.L.; Schmitz-Dräger, B.; Palou, J.; Witjes, J.A.; van Rhijn, B.W.G.; Grossman, H.B.; Kiemeny, L.A.; Goebell, P.J.; Kamat, A.M. Follow-up in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer—International Bladder Cancer Network Recommendations. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* **2016**, *34*, 460–468, doi:10.1016/j.urolonc.2016.05.028. 672
673
674
675
22. Oliivo, M.; Lau, W.; Manivasager, V.; Bhuvanewari, R.; Wei, Z.; Soo, K.C.; Cheng, C.; Tan, P.H. Novel Photodynamic Diagnosis of Bladder Cancer: Ex Vivo Fluorescence Cytology Using Hypericin. *Int J Oncol* **2003**, *23*, 1501–1504. 676
677
678
23. Tauber, S.; Schneede, P.; Liedl, B.; Liesmann, F.; Zaak, D.; Hofstetter, A. Fluorescence Cytology of the Urinary Bladder. *Urology* **2003**, *61*, 1067–1071, doi:10.1016/s0090-4295(02)02554-2. 679
680
24. McCart, E.A.; Thangapazham, R.L.; Lombardini, E.D.; Mog, S.R.; Panganiban, R.A.M.; Dickson, K.M.; Mansur, R.A.; Nagy, V.; Kim, S.-Y.; Selwyn, R.; et al. Accelerated Senescence in Skin in a Murine Model of Radiation-Induced Multi-Organ Injury. *J Radiat Res* **2017**, *58*, 636–646, doi:10.1093/jrr/rrx008. 681
682
683
25. Veranič, P.; Jezernik, K. Succession of Events in Desquamation of Superficial Urothelial Cells as a Response to Stress Induced by Prolonged Constant Illumination. *Tissue and Cell* **2001**, *33*, 280–285, doi:10.1054/tice.2001.0175. 684
685
26. Fabre, M.; Ferlicot, S.; Fontaine Aupart, M.-P.; Steenkeste, K.; Eschwege, P. Method of Detecting Tumour Cells by Fluorescence Signals 2011. 686
687
27. Papanicolaou, G.N. A NEW PROCEDURE FOR STAINING VAGINAL SMEARS. *Science* **1942**, *95*, 438–439, doi:10.1126/science.95.2469.438. 688
689
28. Pedoux, R.; Sengupta, S.; Shen, J.C.; Demidov, O.N.; Saito, S.; Onogi, H.; Kumamoto, K.; Wincovitch, S.; Garfield, S.H.; McMenamin, M.; et al. ING2 Regulates the Onset of Replicative Senescence by Induction of P300-Dependent P53 Acetylation. *Mol Cell Biol* **2005**, *25*, 6639–6648, doi:10.1128/MCB.25.15.6639-6648.2005. 690
691
692

29. NDP.View2 Viewing Software U12388-01 Available online: 693
<https://www.hamamatsu.com/eu/en/product/type/U12388-01/index.html> (accessed on 26 January 2022). 694
30. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; 695
 Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat Methods* **2012**, *9*, 696
 676–682, doi:10.1038/nmeth.2019. 697
31. IDDN Certificate Available online: 698
<https://secure2.iddn.org/app.server/certificate/?sn=2021180016000&key=8b289ffa692106d98093aecd8c7eaf6edcc158f9405c5598d1fd9a5819f1358b&lang=fr> (accessed on 26 January 2022). 699
700
32. Kloskowski, T.; Uzarska, M.; Gurtowska, N.; Olkowska, J.; Joachimiak, R.; Bajek, A.; Gagat, M.; Grzanka, A.; 701
 Bodnar, M.; Marszałek, A.; et al. How to Isolate Urothelial Cells? Comparison of Four Different Methods and 702
 Literature Review. *Human Cell* **2014**, *27*, 85–93, doi:10.1007/s13577-013-0070-y. 703
33. Correia-Melo, C.; Marques, F.D.M.; Anderson, R.; Hewitt, G.; Hewitt, R.; Cole, J.; Carroll, B.M.; Miwa, S.; Birch, 704
 J.; Merz, A.; et al. Mitochondria Are Required for Pro-Ageing Features of the Senescent Phenotype. *EMBO J* 705
2016, *35*, 724–742, doi:10.15252/embj.201592862. 706
34. Alsibai, K.D.; Daste, G.; Ferlicot, S.; Fabre, M.; Steenkeste, K.; Salleron, J.; Hammoudi, Y.; Fontaine-Aupart, M.- 707
 P.; Eschwege, P. Fluorescence Emitted by Papanicolaou-Stained Urothelial Cells Improves Sensitivity of Urinary 708
 Conventional Cytology for Detection of Urothelial Tumors. *World J Oncol* **2020**, *11*, 204–215, 709
 doi:10.14740/wjon1305. 710
35. Rosenthal, D.L.; Wojcik, E.M.; Kurtycz, D.F.I. *The Paris System for Reporting Urinary Cytology*; 2016; ISBN 978-3- 711
 319-22864-8. 712
36. Dalghi, M.G.; Montalbetti, N.; Carattino, M.D.; Apodaca, G. The Urothelium: Life in a Liquid Environment. 713
Physiological Reviews **2020**, *100*, 1621–1705, doi:10.1152/physrev.00041.2019. 714
37. Yamany, T.; Van Batavia, J.; Mendelsohn, C. Formation and Regeneration of the Urothelium. *Current Opinion in* 715
Organ Transplantation **2014**, *19*, 323–330, doi:10.1097/MOT.000000000000084. 716
38. Malagobadan, S.; Nagoor, N.H. Anoikis. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2017; p. 717
 B9780128012383650000 ISBN 978-0-12-801238-3. 718
39. Gilmore, A.P. Anoikis. *Cell Death & Differentiation* **2005**, *12*, 1473–1477, doi:10.1038/sj.cdd.4401723. 719
40. Zhang, Y.; Chen, X.; Gueydan, C.; Han, J. Plasma Membrane Changes during Programmed Cell Deaths. *Cell Res* 720
2018, *28*, 9–21, doi:10.1038/cr.2017.133. 721
41. Tekpli, X.; Holme, J.A.; Sergeant, O.; Lagadic-Gossmann, D. Role for Membrane Remodeling in Cell Death: 722
 Implication for Health and Disease. *Toxicology* **2013**, *304*, 141–157, doi:10.1016/j.tox.2012.12.014. 723
42. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, 724
 I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature 725
 Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* **2018**, *25*, 486–541, doi:10.1038/s41418-017-0012-4. 726
43. Karimian, A.; Ahmadi, Y.; Yousefi, B. Multiple Functions of P21 in Cell Cycle, Apoptosis and Transcriptional 727
 Regulation after DNA Damage. *DNA Repair* **2016**, *42*, 63–71, doi:10.1016/j.dnarep.2016.04.008. 728
44. Karpnich, N.O.; Tafani, M.; Rothman, R.J.; Russo, M.A.; Farber, J.L. The Course of Etoposide-Induced Apoptosis 729
 from Damage to DNA and P53 Activation to Mitochondrial Release of Cytochrome c*. *Journal of Biological* 730
Chemistry **2002**, *277*, 16547–16552, doi:10.1074/jbc.M110629200. 731
45. van Engeland, M.; Nieland, L.J.; Ramaekers, F.C.; Schutte, B.; Reutelingsperger, C.P. Annexin V-Affinity Assay: 732
 A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry* **1998**, *31*, 1–9, 733
 doi:10.1002/(sici)1097-0320(19980101)31:1<1::aid-cyto1>3.0.co;2-r. 734

46.	Sloan, F.A.; Yashkin, A.P.; Akushevich, I.; Inman, B.A. The Cost to Medicare of Bladder Cancer Care. <i>Eur Urol Oncol</i> 2020 , <i>3</i> , 515–522, doi:10.1016/j.euo.2019.01.015.	735 736
47.	Richters, A.; Aben, K.K.H.; Kiemeny, L.A.L.M. The Global Burden of Urinary Bladder Cancer: An Update. <i>World J Urol</i> 2020 , <i>38</i> , 1895–1904, doi:10.1007/s00345-019-02984-4.	737 738
48.	Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. <i>CA: A Cancer Journal for Clinicians</i> 2021 , <i>71</i> , 7–33, doi:10.3322/caac.21654.	739 740
49.	Ng, K.; Stenzl, A.; Sharma, A.; Vasdev, N. Urinary Biomarkers in Bladder Cancer: A Review of the Current Landscape and Future Directions. <i>Urol Oncol</i> 2021 , <i>39</i> , 41–51, doi:10.1016/j.urolonc.2020.08.016.	741 742
50.	Zhu, C.-Z.; Ting, H.-N.; Ng, K.-H.; Ong, T.-A. A Review on the Accuracy of Bladder Cancer Detection Methods. <i>J Cancer</i> 2019 , <i>10</i> , 4038–4044, doi:10.7150/jca.28989.	743 744
51.	McClintock, G.; Wong, E.; Mancuso, P.; Lalak, N.; Gassner, P.; Haghighi, K.; Rathore, P.; McAulay, L.; Jeffery, N. Music during Flexible Cystoscopy for Pain and Anxiety - a Patient-Blinded Randomised Control Trial. <i>BJU Int</i> 2021 , <i>128 Suppl 1</i> , 27–32, doi:10.1111/bju.15527.	745 746 747
52.	Schrag, D.; Hsieh, L.J.; Rabbani, F.; Bach, P.B.; Herr, H.; Begg, C.B. Adherence to Surveillance among Patients with Superficial Bladder Cancer. <i>J Natl Cancer Inst</i> 2003 , <i>95</i> , 588–597, doi:10.1093/jnci/95.8.588.	748 749
53.	Poropatich, K.; Yang, J.C.; Goyal, R.; Parini, V.; Yang, X.J. Nuclear Size Measurement for Distinguishing Urothelial Carcinomas from Reactive Urothelium on Tissue Sections. <i>Diagn Pathol</i> 2016 , <i>11</i> , 57, doi:10.1186/s13000-016-0501-7.	750 751 752
54.	Bailey, R.W.; Nguyen, T.; Robertson, L.; Gibbons, E.; Nelson, J.; Christensen, R.E.; Bell, J.P.; Judd, A.M.; Bell, J.D. Sequence of Physical Changes to the Cell Membrane During Glucocorticoid-Induced Apoptosis in S49 Lymphoma Cells. <i>Biophys J</i> 2009 , <i>96</i> , 2709–2718, doi:10.1016/j.bpj.2008.12.3925.	753 754 755
55.	Paoli, P.; Giannoni, E.; Chiarugi, P. Anoikis Molecular Pathways and Its Role in Cancer Progression. <i>Biochim Biophys Acta</i> 2013 , <i>1833</i> , 3481–3498, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.026.	756 757
56.	Simpson, C.D.; Anyiwe, K.; Schimmer, A.D. Anoikis Resistance and Tumor Metastasis. <i>Cancer Lett</i> 2008 , <i>272</i> , 177–185, doi:10.1016/j.canlet.2008.05.029.	758 759
57.	Terasaki, M.; Maeda, H.; Miyashita, K.; Mutoh, M. Induction of Anoikis in Human Colorectal Cancer Cells by Fucoxanthinol. <i>Nutrition and Cancer</i> 2017 , <i>69</i> , 1043–1052, doi:10.1080/01635581.2017.1339814.	760 761
58.	Furse, S.; de Kroon, A.I.P.M. Phosphatidylcholine’s Functions beyond That of a Membrane Brick. <i>Molecular Membrane Biology</i> 2015 , <i>32</i> , 117–119, doi:10.3109/09687688.2015.1066894.	762 763 764

3.4 Supplementals

3.4.1 Supplementals legends

Figure 1S Characteristic of the fluorescence from healthy and tumoral urothelial cells.

a) Global view of a urinary cytology acquired on the scanner of a healthy patient (No BC); a patient with LGBC (Low Grade BC); a patient with HGBC (High Grade BC) and T24 (T24 Cell line) in bright field light and at 488 nm. b) Zoomed view of a urinary cytology acquired on the scanner of a healthy patient (No BC); a patient with LGBC (Low Grade BC); a patient with HGBC (High Grade BC) and T24 (T24 Cell line) in bright field light and at 488 nm.

Figure 2S, PMF on different cells line.

a) Global view of a normal human primary bladder epithelial cell line acquired on the scanner. b) Global view cell lines acquired on the scanner.

Figure 3S, Fluorescence and PMF of UCU and UCUT.

a) Global view of UCU acquired on the scanner. b) Global view of UCUT acquired on the scanner.

Figure 4S, Fluorescence and PMF of UCU and UCUT.

Global view of images acquired on the scanner of healthy urine alone (Urine), supplemented with T24 (Urine + T24) or supplemented with T24 permeabilized (Urine + P. T24) with 0.2% tritons for 90 seconds

Figure 5S, Involvement of senescence in the modulation of PMF.

Global view of images acquired on the scanner of the effect of irradiation with or without treatment after nine days on a) the PMF of MRC-5hTERT; b) the PMF of T24

Figure 6S, Involvement of the treatment on the modulation of PMF.

Global view of images acquired on the scanner of the effect of the different treatments and molecules to induce senescence on the T24 PMF after nine days.

Figure 7S, Total cell death determination by flow cytometry after induction of cellular stress by irradiation and treatment on T24.

On graphs : bottom right square: early apoptosis, top right square: late apoptosis, top left square: necrosis. Cells were labeled with annexin V and propidium iodide.

Figure 8S, Disruption of the plasma membrane by miltefosine treatment.

Résultats

a) Images acquired on the scanner of T24 after 24h treatment with different concentrations of miltefosine and quantification of their PMF b) Flow cytometry determination of early apoptosis, late apoptosis and necrosis combined after 24h treatment with different concentrations of miltefosine, annexin V and propidium iodide labelling. Bar graphs represent mean (SD) (ns> 0.05; ; ** P <0.1) ** P <0.01; **** P <0.0001).

3.4.2 Supplementals Figures

Figure 1S

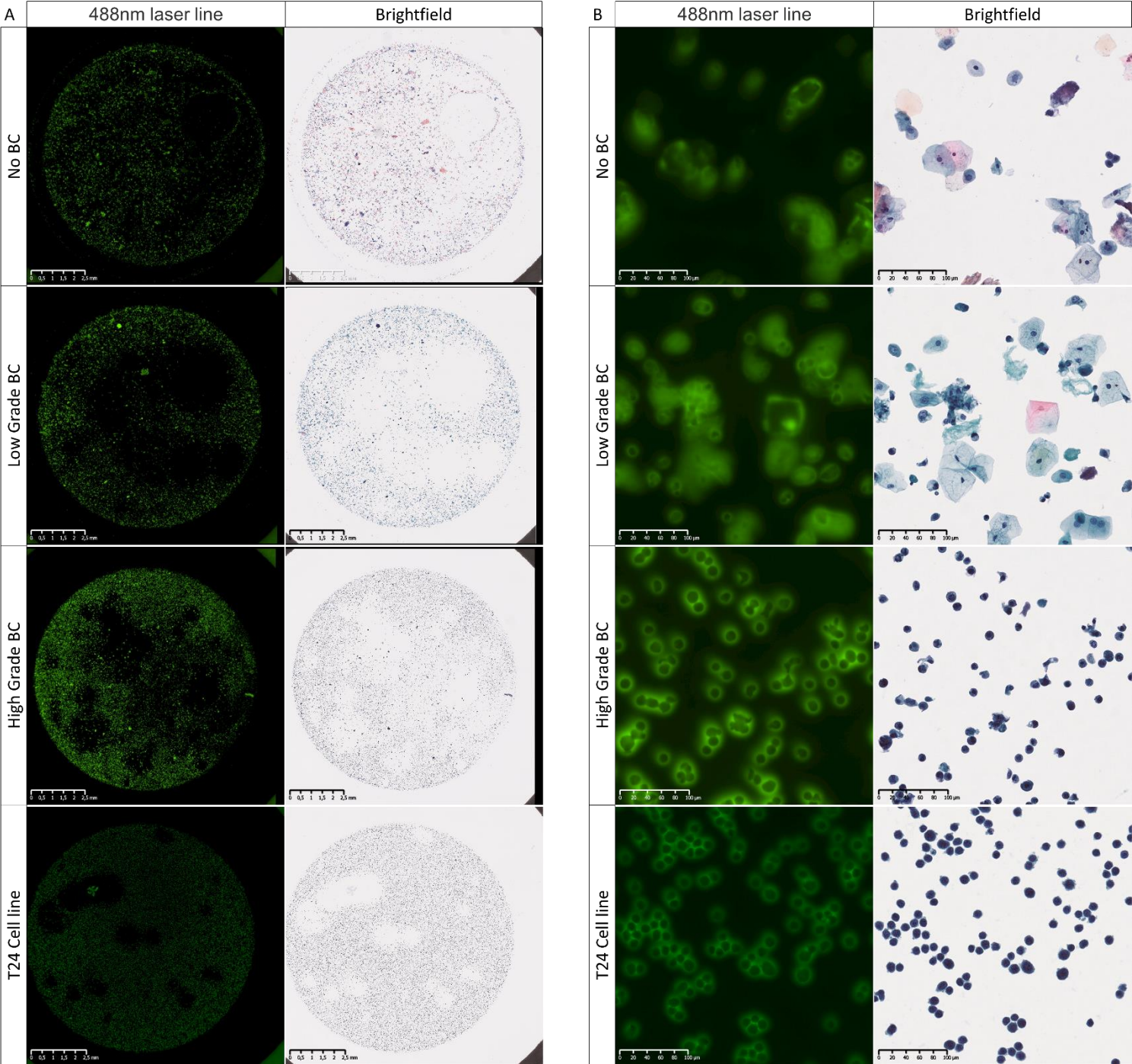


Figure 2S

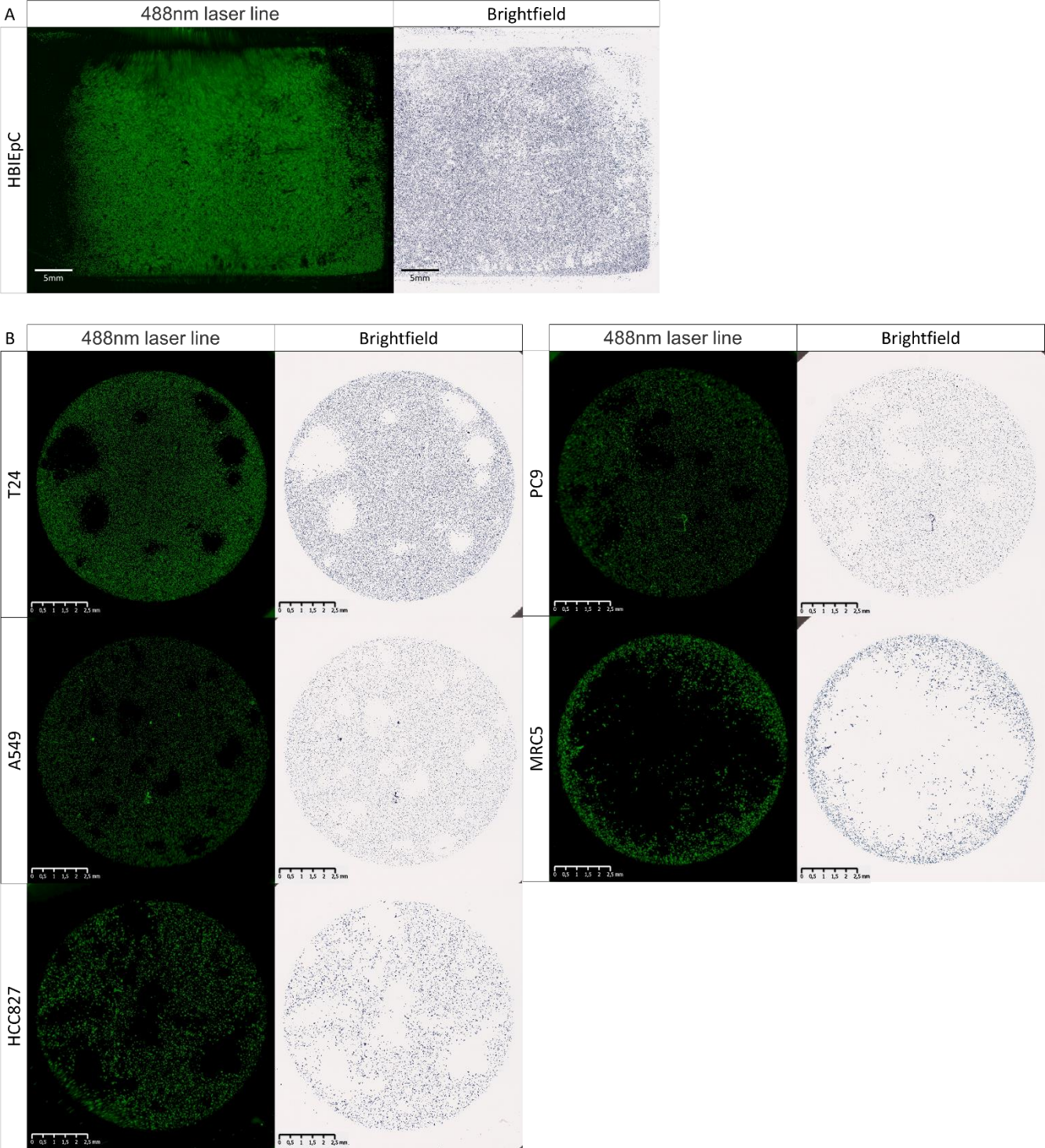


Figure 3S

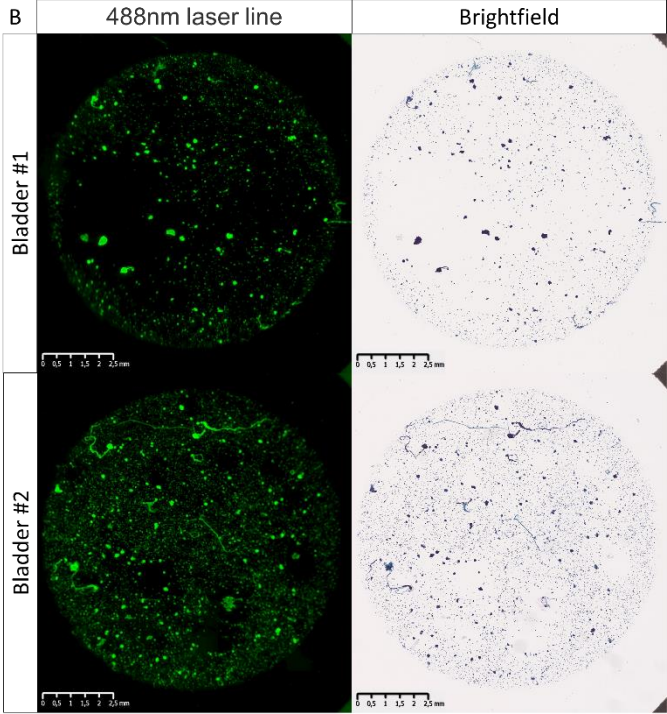
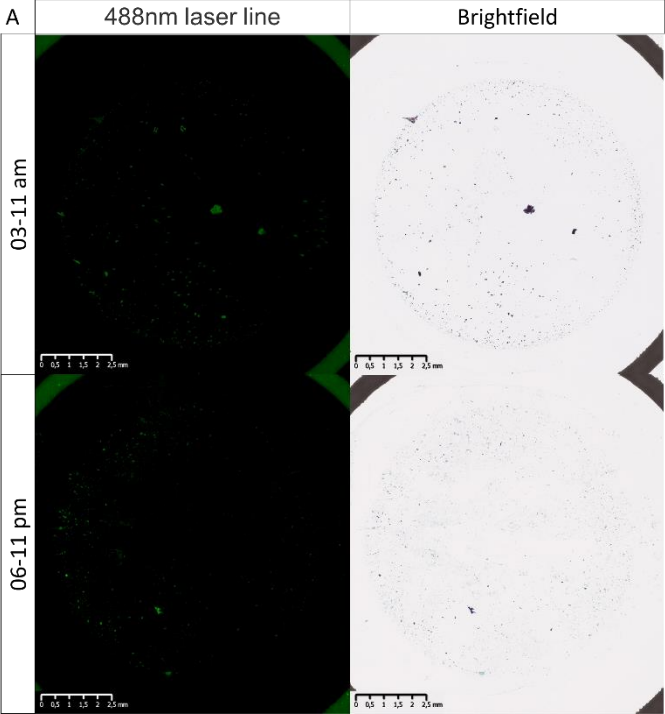


Figure 4 S

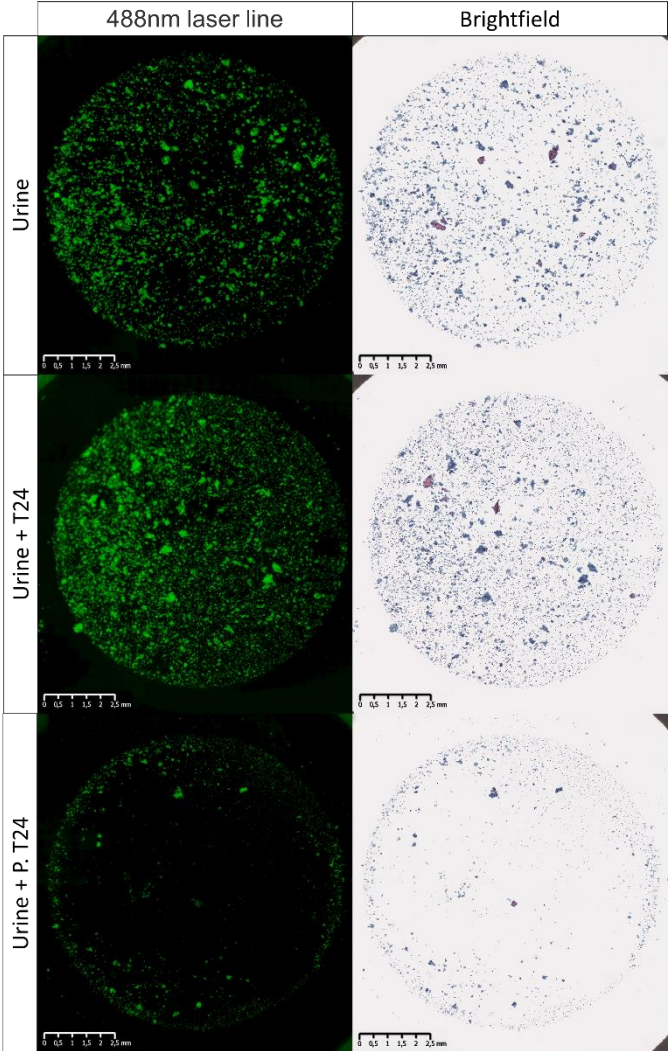


Figure 5 S

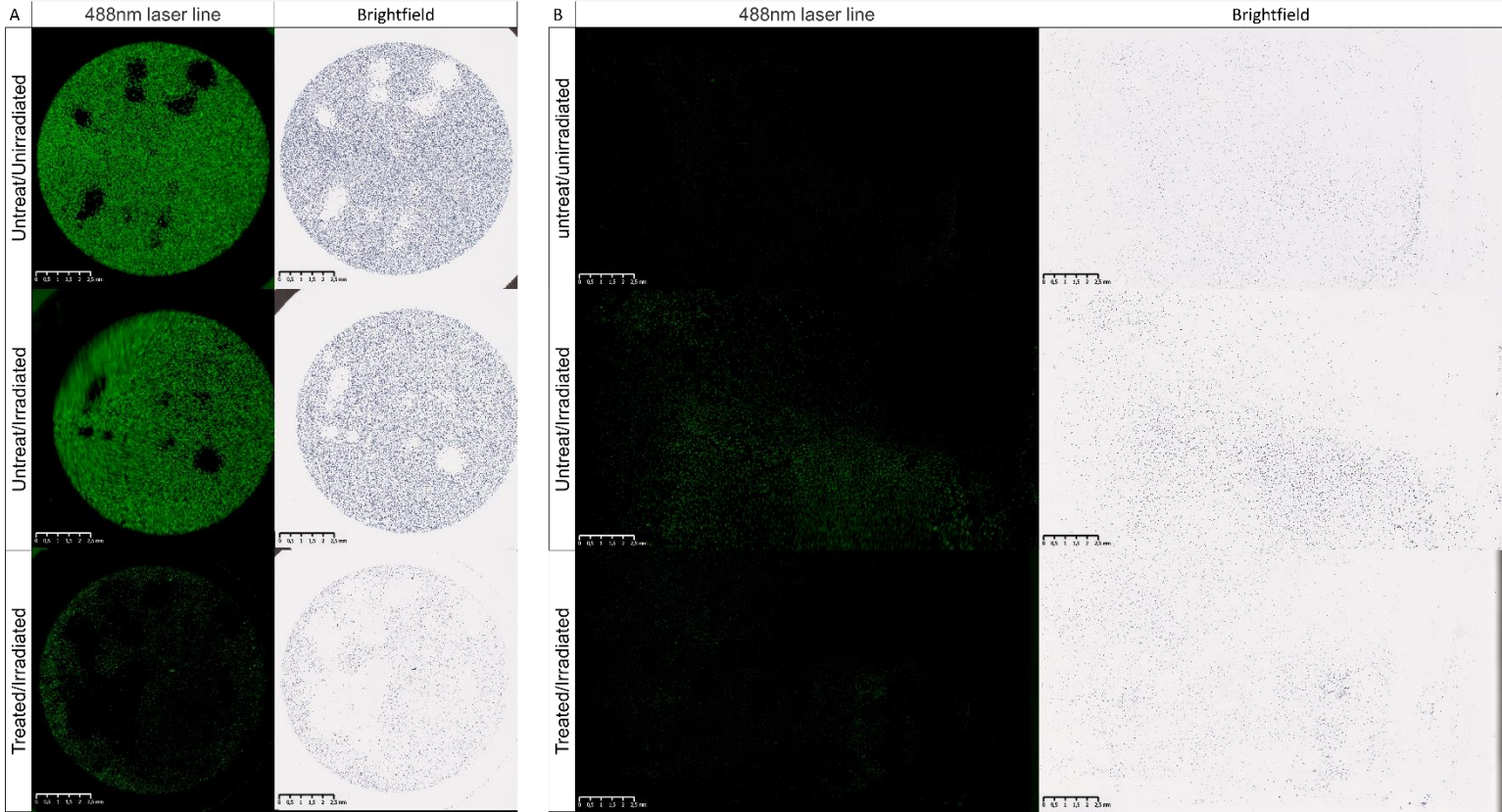


Figure 6 S

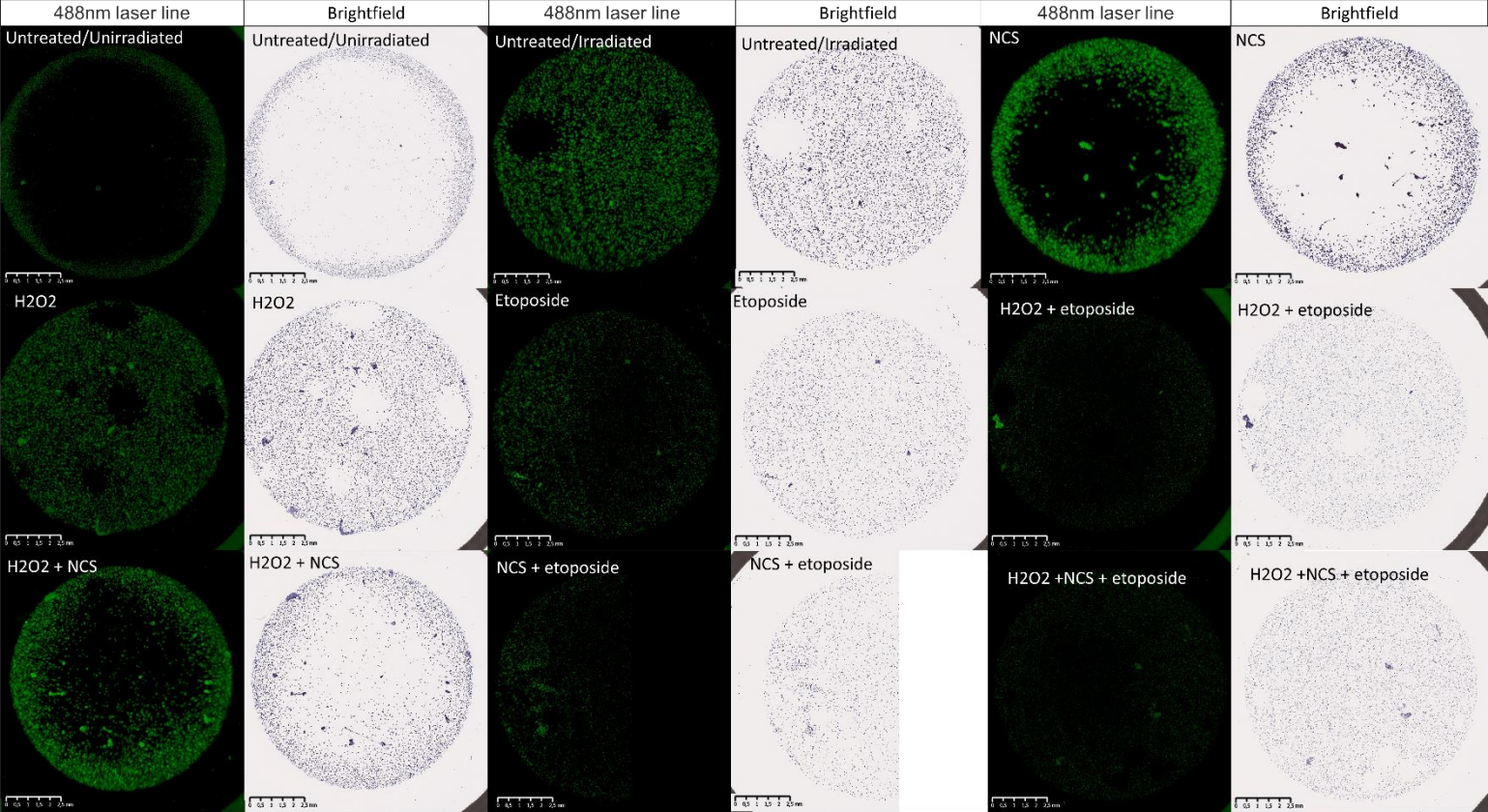


Figure 7 S

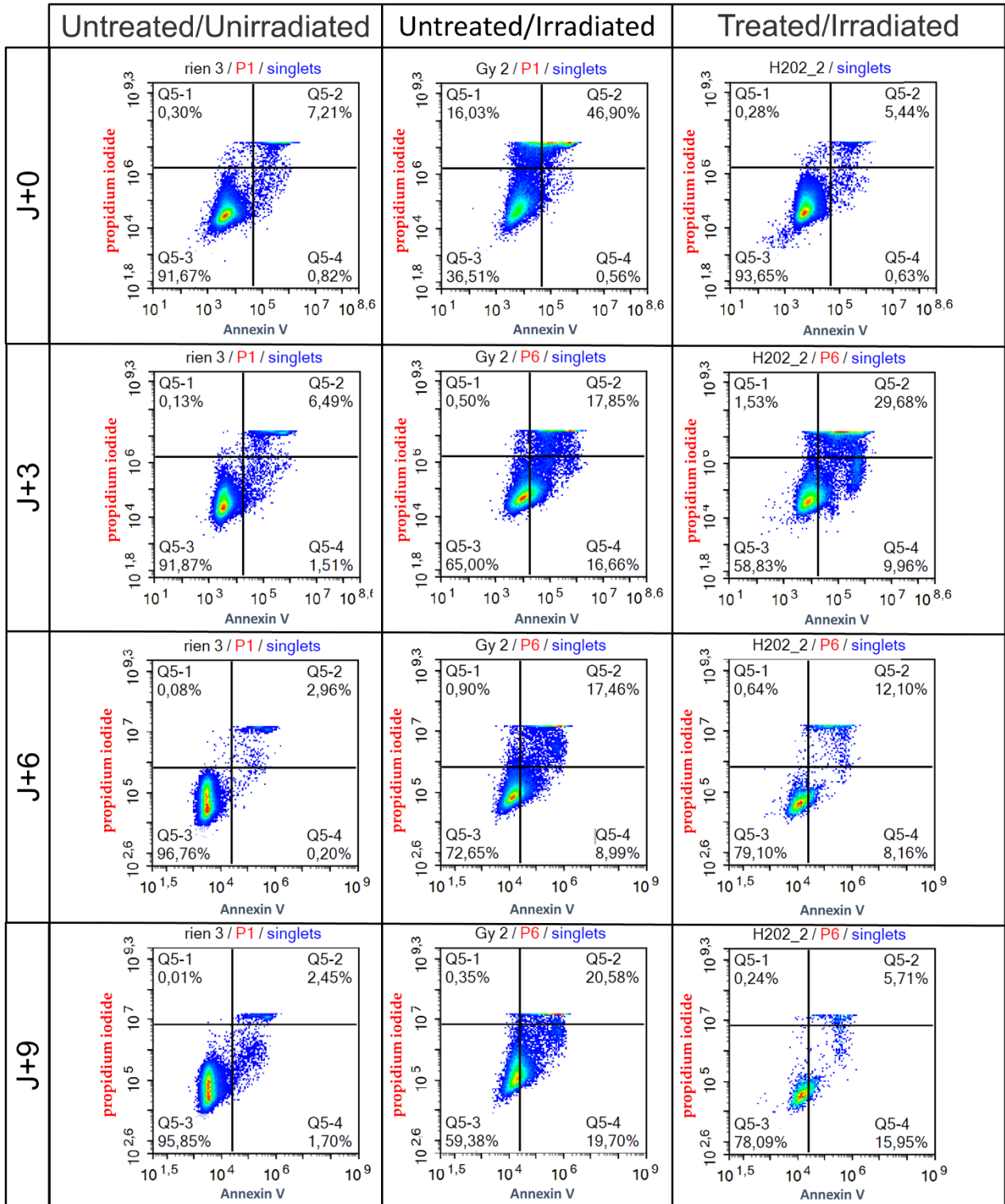
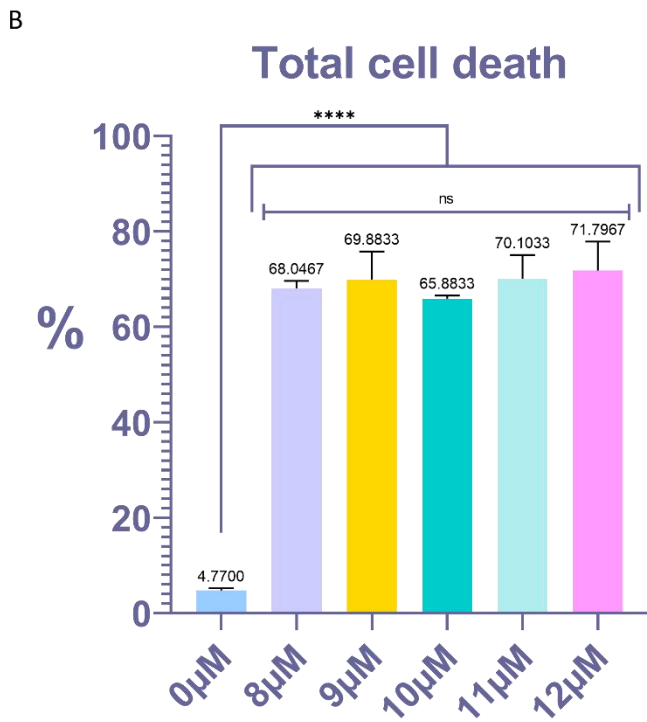
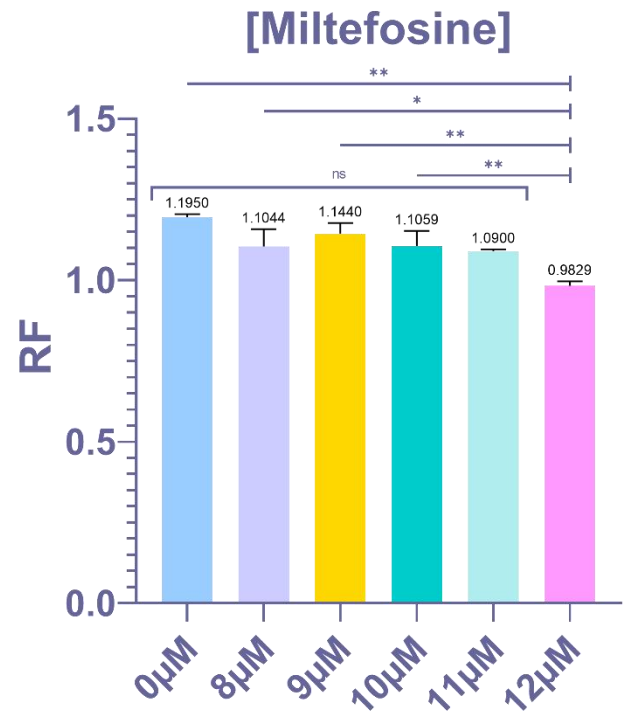
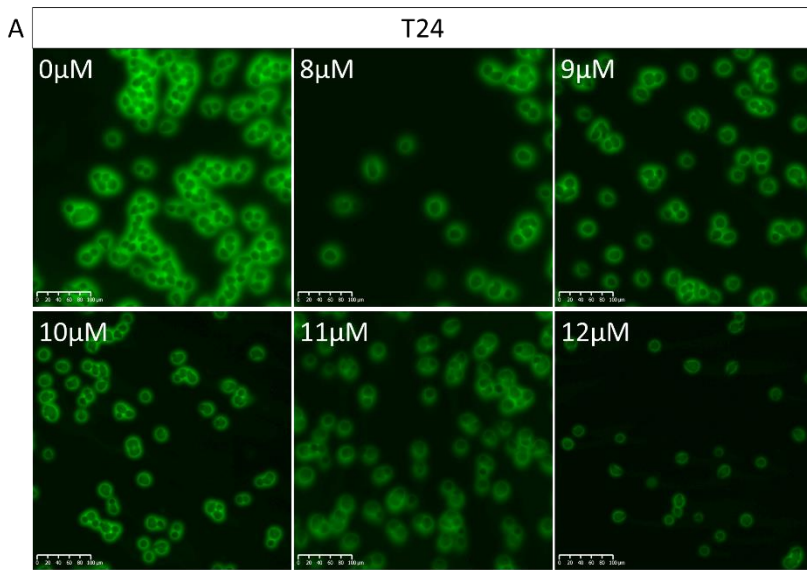


Figure 8 S



4 isolation et coloration de la membrane plasmique

Afin de mieux caractériser la FPM et après avoir constaté que toutes les cellules retrouvées ou cultivées dans des conditions idéales présentaient une FPM, nous avons souhaité savoir si la membrane plasmique seule était capable d'émettre une fluorescence.

Pour déterminer l'importance de la membrane plasmique, des membranes plasmiques de CUR de vessie de porc et de T24 ont été isolées et colorées au Papanicolaou. Les CUR de vessie de porc ont été récupérées directement sur une vessie fraîche et les T24, après culture en flasque. Une fois les membranes isolées, une fluorescence a été constatée sur les membranes isolées de T24 et de CUR de vessie de porc, suggérant que la membrane seule puisse émettre une fluorescence (**Figure 37**). Face à ces résultats, nous avons souhaité travailler sur les membranes de CURU. Cependant, la quantité de cellules récupérées étant trop faible, nous avons été forcés d'abandonner cette voie et nous sommes concentrés sur la perméabilisation.

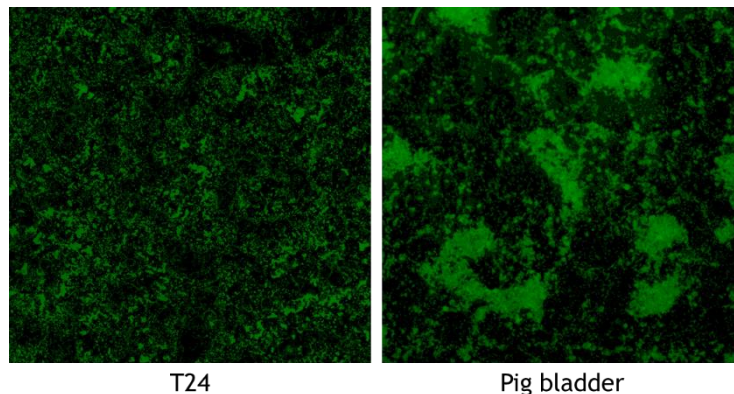


Figure 37 : Coloration des membranes plasmiques isolées de T24 et de cellules urothéliales originaire d'une vessie de cochon.

5 Impacte de l'urine sur la FPM

Une autre hypothèse concernait l'impact de l'urine sur la fluorescence : la fluorescence pourrait résulter du stress cellulaire provoqué par l'urine lorsque les cellules sont mises en contact avec elle.

Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, des T24 ont été cultivées 1 h, 2 h, 3 h et 6 h. Sachant qu'une personne en bonne santé urine en moyenne six ou sept fois sur une période de 24 heures, le temps maximum a été fixé à 6 h.

Après culture avec urine et coloration au Papanicolaou, aucune différence n'est observée dans la FPM (**Figure 38**), infirmant notre hypothèse. En somme, l'urine n'est pas un facteur important dans la modulation de la FPM.

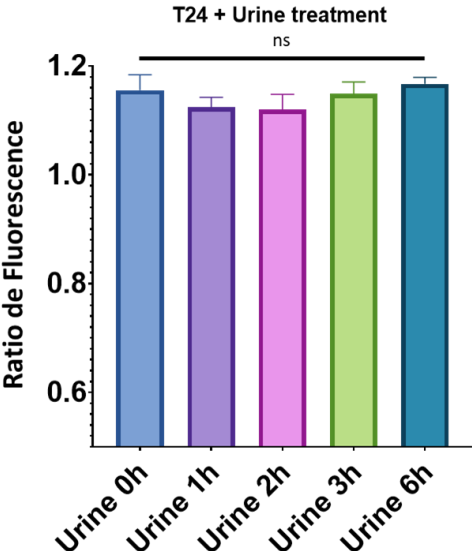


Figure 38 : Quantification de la FPM après traitement des T24 avec des urines humaines.

Discussion et perspectives

Aujourd'hui, la détection précoce du CV est un enjeu crucial, en particulier pour son traitement. Ce cancer est l'un des cancers les plus onéreux à traiter et à surveiller. En moyenne, son coût au cours de la première année après le diagnostic fluctue entre 47 500 US\$, pour un stade avancé, à 14 300 US\$ pour un stade plus précoce. Il peut atteindre plus de 172 000 US\$ pour un survivant à long terme¹⁴⁵. Une détection précoce du CV permet d'améliorer la prise en charge du patient, abaisse les dépenses et augmente les chances de survie. En effet, la survie relative à 5 ans s'élève à 96 % lorsque le CV est détecté sous forme de *Tis*, et descend drastiquement pour les autres stades (70 % pour les TVNIM, 37 % pour les TVIM et 6 % pour les CV métastasés)^{99 217 218}.

Ainsi, la recherche s'est concentrée, ces dernières années, sur de nouvelles méthodes de diagnostics, basées sur la recherche de biomarqueurs tels que l'ADN libre circulant, le microARN, l'ARN circulaire, l'ARN non codant, les protéines, les cellules, etc.^{96,196-198}. Malgré une recherche continue de nouveaux biomarqueurs et la mise en place de nouveaux tests de diagnostic validés par la FDA, la cytologie urinaire et la cystoscopie restent les tests de référence dans le dépistage du CV¹⁹⁹. Les nouveaux diagnostics sont utilisés, dans le meilleur des cas, en parallèle de tests de références, n'améliorent que légèrement le diagnostic initial et ne permettent pas d'abaisser le coût. Cependant, les tests de référence ne sont pas exempts de défauts. En dépit d'une forte sensibilité et d'une spécificité élevée, la cystoscopie¹⁴² est particulièrement inconfortable pour les patients. Elle est douloureuse, en dépit du fait qu'elle soit utilisée sous anesthésie locale, et peut entraîner certaines complications (par exemple, des infections urinaires ou des douleurs lors des mictions). Or, ces inconforts que subissent les patients peuvent conduire à une perte de suivi^{198,199}. À l'inverse, la cytologie urinaire, étant un test non invasif et peu coûteux, est très bien vécue par le patient et donne de bons résultats pour les CUHG. Néanmoins, sa sensibilité est trop faible pour le diagnostic des CUBG. C'est pourquoi, dernièrement, la recherche s'intéresse plus spécialement à l'amélioration de la cytologie urinaire, technique simple à mettre en place. Depuis la mise en évidence de la FPM par l'équipe de Steenkeste *et al.*¹⁸⁴, de nouvelles possibilités se sont ouvertes pour son amélioration.

En nous basant sur leurs recherches, nous avons voulu comprendre et caractériser la FPM. Dans cette perspective, il était essentiel de savoir si la FPM était un phénomène induit par la caractéristique morphologique, dénommé effet d'éclipse, ou s'il s'agissait d'un événement biologique induit par la coloration. Nous nous sommes intéressés à la caractéristique morphologique, car une large littérature décrit la grande taille du noyau cellulaire (supérieur à 70 % du volume du cytoplasme) comme un facteur essentiel de la détermination d'une CURT^{119,200}. Après marquage du noyau et du cytoplasme, nous avons montré que le noyau cellulaire était de grande taille, mais pas suffisamment pour induire ce phénomène. Nous avons donc pu déduire qu'il s'agissait d'une caractéristique biologique, qui se produit avec la coloration.

Partant de l'hypothèse, décrite par Steenkeste *et al.*¹⁸⁴, selon laquelle seules les CURT présentaient une FPM, nous avons voulu comparer la composition protéique et lipidique de cellules n'ayant pas de FPM avec les T24. La quantité de CURU étant trop faible dans les urines, l'utilisation d'une lignée cellulaire était indispensable à cette étude. Après avoir testé de nombreuses lignées cellulaires, de diverses origines, saines ou tumorales, nous avons constaté que toutes les cellules présentaient une FPM après coloration de la cytologie au Papanicolaou.

N'étant pas en mesure de trouver une lignée cellulaire sans FPM, nous avons décidé de mettre en place un logiciel capable de donner la FPM précise d'une cellule afin de déterminer la présence de variations de FPM en fonction du type cellulaire, de sa provenance ou de l'influence d'un traitement. Ce logiciel, Perifluo QCG, nous a donné les outils nécessaires pour augmenter la précision de notre analyse de la FPM en passant d'une analyse qualitative où nous recherchions un modèle cellulaire sans FPM à comparer avec un modèle présentant une FPM, à une analyse quantitative où nous pouvions déterminer de façon significative la moindre variation (ou non) de FPM. Avantage conséquent, notre logiciel peut quantifier chaque cellule présente sur la cytologie extrêmement rapidement, nous donnant un grand nombre d'informations. Perifluo QCG utilise un procédé simple par lequel il calcule la fluorescence cytoplasmique et la fluorescence de la membrane (jusqu'à 5 pixels autour de la membrane), tout en déduisant le bruit de fond. Une fois les données obtenues, la valeur de la FPM d'une cellule est obtenue en opérant un RF, où :

$$\text{RF d'une cellule} = \text{intensité de la fluorescence} \frac{\text{membrane plasmique}}{\text{cytoplasme}}.$$

Si la valeur moyenne du RF de toutes les cellules présentes sur l'échantillon est supérieure à 1, alors la fluorescence de la membrane est plus importante que celle du cytoplasme, et les cellules présentent une FPM ; inversement si la valeur moyenne de RF est inférieure à 1.

Grâce à cet outil, la détermination du RF des cellules déjà testées a été facilitée, permettant de distinguer aisément les variations de la FPM en fonction des lignées cellulaires utilisées. Le recours au logiciel Perifluo QCG, n'ayant pas mis en évidence des différences significatives de FPM, a confirmé que toutes les cellules, après coloration au Papanicolaou, expriment de façon constitutive cette fluorescence. Le logiciel nous a aussi permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle les CURU auraient un RF inférieur à 1 et n'exprimeraient donc pas de FPM, au contraire des CURUT qui ont un RF supérieur à 1. D'après ces résultats, il est clair que le passage de la vessie aux urines induit une modification de la cellule pouvant interférer avec la coloration. Malheureusement, ce sujet d'étude étant relativement nouveau, il n'existe pas d'étude portant sur la perte de la FPM de la CURU. Nous avons ainsi émis l'hypothèse selon laquelle, lorsque les CUR s'exfolient et se retrouvent dans un milieu défavorable à leur survie, divers mécanismes cellulaires interviennent et induisent un fort stress cellulaire, conduisant à une

altération de la membrane^{228,229}. Pour confirmer l'importance de la membrane plasmique dans le phénomène de FPM, nous avons utilisé du détergent afin de perméabiliser la membrane plasmique de nos cellules. Dans un premier temps, une baisse de la FPM, semblable à ce qui est obtenu avec les CURU, a été observée. Cette baisse a été également constatée après induction d'un stress intense sur les cellules, indépendamment de l'activation de la mort cellulaire. Ces résultats confirment que la membrane joue un rôle important dans la FPM et que cette dernière est sensible aux forts stress cellulaires.

Au vu de ses résultats, nous supposons que la membrane plasmique joue un rôle primordial dans la FPM, en particulier concernant sa composition. Nous avons pour hypothèse qu'un des principaux stress subis par la CUR pourrait être induit par l'anoïkis après détachement de la CUR. L'anoïkis provoque l'entrée de la CUR en apoptose, ce qui entraîne une modification de la composition de la membrane plasmique^{230,231}. La résistance des cellules tumorales à ce phénomène et l'importance de ce dernier dans la dissémination métastatique ont été largement décrit^{232,233}. Aussi, nous suggérons que nos CURT, une fois en suspension dans les urines, sont insensibles à l'anoïkis, responsable d'une altération de la membrane plasmique impliquée dans la FPM.

Étude de l'anoïkis

Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'activation de l'anoïkis sur nos T24 en utilisant une drogue, ce que proposent Terasaki *et al.* dont les recherches ont montré que la norcantharidine induit l'anoïkis dans leur modèle cellulaire²⁰⁶.

Étude de la modification de la composition de la membrane plasmique

La FPM étant localisée au niveau de la membrane, modifier les protéines et lipides membranaires sont deux hypothèses intéressantes pour confirmer cette hypothèse, plusieurs approches sont possibles.

Modifier de la composition de la membrane plasmique en inhibant la production de phosphatidylcholine (PC) peut être une première approche. La PC est le phospholipide majeur de la membrane plasmique (représentant 40 % des phospholipides)²³⁵. L'étude préliminaire qui a été menée a montré que l'inhibition de la biosynthèse de la phosphatidylcholine par la miltefosine pendant 24 heures induit une baisse significative de la FPM indépendamment de l'apoptose (**Figure 8S de l'article**). Pour prolonger cet axe, il serait utile de doser la PC afin de déterminer son niveau d'expression dans la membrane et mettre en évidence son importance dans la FPM.

Une seconde approche serait de modifier la synthèse de protéines membranaire en utilisant l'hydroxyurée, molécule qui est un puissant inhibiteur de la synthèse de l'ADN, mais dans une moindre mesure, peut également inhiber la synthèse de l'ARN et des protéines²⁰⁸. Il serait intéressant d'observer si la baisse de production de protéines induit une baisse d'expression de protéines dans la

membrane responsable de la diminution de la FPM. Des études préliminaires de l'hydroxyurée sur la FPM ont été faites en parallèle et n'ont, pour le moment, pas montré de modification de la FPM (données non montrées). La Tunicamycine peut aussi être utilisée dans ce but. Cette drogue bloque aussi la production en empêchant le repliement des protéines et leur transit dans le réticulum endoplasmique.

Enfin, une nouvelle approche possible serait d'induire des modifications post-traductionnelles des protéines exprimées au niveau de la membrane plasmique, plus particulièrement sur les groupements phosphates. Il est possible d'induire ces modifications en utilisant la Lambda Phosphatase, enzyme capable de libérer les groupes phosphate des résidus protéiques phosphorylés sur la sérine, thréonine, tyrosine et sur les résidus histidine phosphorylés²⁰⁹. Il serait intéressant d'observer si la libération des groupements phosphates induit une modification de la FPM. Des études préliminaires sur la Lambda Phosphatase sur la FPM ont été faites en parallèle et n'ont, pour le moment, pas montré de modification de la FPM (données non montrées).

Le modèle humain

Il aurait été très intéressant de travailler directement sur du matériel humain. Travailler dessus nous aurait permis de voir facilement que toutes les cellules récupérées sur la vessie présentaient toute une FPM, ce qui aurait été un vrai gain de temps. Malheureusement il est très compliqué de travailler directement sur du tissu humain. Nous avons essayé de travailler sur des lignées urothéliales (SV-HUC-1) ou des lignées primaires de vessie (HBlEpC) pour nous rapprocher de la vessie. Il s'est trouvé que ces lignées étaient très difficiles à cultiver et au final présentaient, logiquement, une FPM. C'est grâce au modèle murin et la possibilité d'obtenir des vessies et des urines que le projet a pu avancer, même si les quantités de cellules dans les urines étaient faibles. Si nous avions utilisé des vessies humaines, il aurait été possible de comparer les membranes plasmiques des CURUT et des CURU, chose impossible avec la vessie de porc où nous n'avons pas les urines et les rats où le nombre de cellules dans les urines était trop faible. Il aurait été aussi intéressant de marquer les CURUT de rats pour confirmer que les cellules récupérées soient bien urothéliales, voire basales, intermédiaires ou superficielles.

Étude des cellules cultivées dans des urines

Pour conclure correctement sur l'impact de l'urine et la FPM, il aurait été intéressant de cultiver une autre lignée tumorale non urothéliale en présence d'urine. Si aucune modification de la FPM n'avait été constatée alors il aurait été judicieux de mettre en culture une lignée urothéliale saine et observer ou non une modification de la FPM. Enfin, il aurait été aussi très intéressant d'étudier nos T24 en suspension et avec une faible agitation dans des urines. En fonction des résultats, d'autres lignées

cellulaires auraient été étudiées. L'observation de la FPM après les 1, 2, 3 ou 6 h d'incubation dans les urines nous auraient données de précieuses informations sur l'importance de l'anoïkis et la FPM.

Étude chimique du colorant et du montage cytologique

Afin de saisir ce phénomène, il aurait été utile de s'intéresser aux colorants utilisés, au film Sakura® qui recouvre les cytologies et à la colle utilisée pour le montage (présente seulement sur une face du film de manière lyophilisée et qui est activée par du xylène). Les résultats ne sont pas décrits dans cette thèse, mais ont fait l'objet de recherche en parallèle. Pour déterminer le rôle des colorants dans la FPM, une étude a été faite sur les différentes étapes de colorations où un des colorants (hématoxyline, EA50 ou OG6) a été retiré indépendamment des autres pour comprendre leur importance respective. Selon cette étude, l'EA50 et l'OG6 sont indispensables pour visualiser la FPM et l'hématoxyline et l'EA50, déterminants pour l'intensité de la FPM (données non présentées).

Concernant le film Sakura® et sa colle, plusieurs approches ont été considérées. La première s'est intéressée à la composition du film Sakura®. L'entreprise *Specific polymers* (Castries, France), missionnée pour l'analyse du film, a mis en évidence les molécules susceptibles de jouer un rôle dans la fluorescence : le triphényl-phosphate, le biphenyl-4-yl diphenyl, le phenyl bis (4-phenylphenyl) et une matrice polymérique très minoritaire pouvant être un poly-(Butyl Acrylate-co-méthacrylonitrile). La seconde approche s'est fondée sur les analyses précédentes pour recréer ce film en utilisant une lame colorée classiquement et en y ajoutant, sous différentes combinaisons, des milieux de montages différents, des molécules d'intérêt et des protections compatibles avec la microscopie. Cependant, aucune FPM n'a été obtenue en tentant de recréer le film (*données non présentées*). Notre faible connaissance en chimie et les effets du secret industriel ont rendu difficile la détermination de la molécule impliquée dans la FPM. Ainsi, malgré les différents essais menés, les recherches restent, à ce jour, infructueuses. Il serait intéressant d'avoir un point de vue orienté vers la chimie sur ce projet, avec comme candidat sérieux le biphenyle attaché au phosphate dont la fluorescence a été démontrée²¹⁰⁻²¹².

Recherche de la ou les molécules biologiques impliquées dans la perte de la FPM

Finalement, la mise en évidence de l'implication du stress cellulaire dans la diminution de la FPM nous donne des informations précieuses pour la recherche de la ou les molécules biologiques impliquées dans la perte de la FPM. Si une protéine membranaire est mise en évidence, il serait intéressant de modifier son niveau d'expression membranaire en la surexprimant ou en la sous-exprimant²¹³ pour observer, ou non, une modulation de la FPM. S'il s'agit d'un phospholipide, tels que PC, des modèles pourront être réalisés sous forme de liposomes géants^{214,215} constitués du ou des lipides d'intérêt et voir s'il est possible de recréer le phénomène de FPM.

Discussion et perspectives

De plus, si une ou plusieurs molécules biologiques sont mises en évidence comme exprimée différemment dans la CURT, cela apportera des éléments clés sur la genèse de la tumeur et sur les évolutions d'une cellule précancéreuse à cancéreuse nécessaire pour la prise en charge ou pour l'élaboration d'un nouveau biomarqueur.

En conclusion, nous avons réussi à mieux comprendre et caractériser le phénomène de FPM. Nous avons montré qu'elle n'est pas uniquement observée dans les CURT, mais que toute cellule en forme est capable de l'exprimer. Enfin l'intégrité de la membrane joue un rôle primordial dans l'apparition de ce phénomène. Au regard de nos résultats, nous suggérons que la forte résistance des CURT aux agressions extérieures leur permet de mieux survivre dans les urines, contrairement aux CUR qui, une fois en suspension, sont plus sensibles à ces agressions responsables de la perte de leur FPM. Néanmoins, une étude approfondie des colorants, du film Sakura® et de la colle utilisée est nécessaire afin de comprendre les interactions de ces derniers avec les cellules et ainsi, d'affiner encore la caractérisation de ce phénomène.

Bibliographie

- (1) Cancer <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/cancer> (accessed 2021 -12 -03).
- (2) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2021**, *71* (3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- (3) Synthèse - Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Ref : SYNINCENAT2019 <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Synthese-Estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-entre-1990-et-20182> (accessed 2021 -10 -14).
- (4) Marant Micalef, C.; Shield, K.; Vignat, J.; Hill, C.; Rogel, A.; Menvielle, G.; Dossus, L.; Ormsby, J.-N.; Rehm, J.; Rushton, L.; Vineis, P.; Parkin, M.; Bray, F.; Soerjomataram, I. Nombre et Fractions de Cancers Attribuables Au Mode de Vie et à l'environnement En France Métropolitaine En 2015 : Résultats Principaux. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire* **2018**.
- (5) Cancers et substances chimiques - Ref : FRSUBCHIM10 <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Cancers-et-substances-chimiques> (accessed 2021 -11 -03).
- (6) Données globales d'épidémiologie des cancers - Epidémiologie des cancers <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Donnees-globales> (accessed 2021 -11 -04).
- (7) Herbst, A. L.; Scully, R. E. Adenocarcinoma of the Vagina in Adolescence. A Report of 7 Cases Including 6 Clear-Cell Carcinomas (so-Called Mesonephromas). *Cancer* **1970**, *25* (4), 745–757. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197004\)25:4<745::aid-cnrc2820250402>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197004)25:4<745::aid-cnrc2820250402>3.0.co;2-2).
- (8) Les facteurs de risque et la prévention | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer <https://www.fondation-arc.org/facteurs-risque-cancer> (accessed 2021 -11 -04).
- (9) Ayed, W.; Gouas, L.; Penault-Llorca, F.; Amouri, A.; Tchirkov, A.; Vago, P. [Trisomy 21 and cancers]. *Morphologie* **2012**, *96* (314–315), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2012.10.001>.
- (10) Aggarwal, B. B.; Shishodia, S.; Sandur, S. K.; Pandey, M. K.; Sethi, G. Inflammation and Cancer: How Hot Is the Link? *Biochem Pharmacol* **2006**, *72* (11), 1605–1621. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.06.029>.
- (11) Pasquet, F.; Pavic, M.; Ninet, J.; Hot, A. Maladies auto-immunes et cancers. Première partie : cancers au cours des maladies auto-immunes et de leur traitement. *La Revue de Médecine Interne* **2014**, *35* (5), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2013.10.336>.
- (12) Allan, J. M.; Travis, L. B. Mechanisms of Therapy-Related Carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **2005**, *5* (12), 943–955. <https://doi.org/10.1038/nrc1749>.
- (13) Compton, C. Cancer Initiation, Promotion, and Progression and the Acquisition of Key Behavioral Traits. In *Cancer: The Enemy from Within: A Comprehensive Textbook of Cancer's Causes, Complexities and Consequences*; Compton, C., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp 25–48. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40651-6_2.
- (14) Compton, C. Understanding the Hallmark Characteristics of Cancer. In *Cancer: The Enemy from Within: A Comprehensive Textbook of Cancer's Causes, Complexities and Consequences*; Compton, C., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp 49–81. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40651-6_3.
- (15) Esteller, M. Epigenetics in Cancer. *New England Journal of Medicine* **2008**, *358* (11), 1148–1159. <https://doi.org/10.1056/NEJMr072067>.
- (16) Deltour, S.; Chopin, V.; Leprince, D. Modifications épigénétiques et cancer. *Med Sci (Paris)* **2005**, *21* (4), 405–411. <https://doi.org/10.1051/medsci/2005214405>.
- (17) Daddy, M. sugar. Glossomics: Cell Cycle Checkpoints. *Glossomics*, 2012.

- (18) Favaloro, B.; Allocati, N.; Graziano, V.; Ilio, C. D.; Laurenzi, V. D. Role of Apoptosis in Disease. *Aging* **2012**, *4* (5), 330–349. <https://doi.org/10.18632/aging.100459>.
- (19) D'Arcy, M. S. Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biology International* **2019**, *43* (6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
- (20) Brenner, D.; Mak, T. W. Mitochondrial Cell Death Effectors. *Curr Opin Cell Biol* **2009**, *21* (6), 871–877. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.004>.
- (21) Yun, C. W.; Lee, S. H. The Roles of Autophagy in Cancer. *Int J Mol Sci* **2018**, *19* (11), 3466. <https://doi.org/10.3390/ijms19113466>.
- (22) Gong, Y.; Fan, Z.; Luo, G.; Yang, C.; Huang, Q.; Fan, K.; Cheng, H.; Jin, K.; Ni, Q.; Yu, X.; Liu, C. The Role of Necroptosis in Cancer Biology and Therapy. *Molecular Cancer* **2019**, *18* (1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1029-8>.
- (23) Linkermann, A.; Green, D. R. Necroptosis. *N Engl J Med* **2014**, *370* (5), 455–465. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1310050>.
- (24) Wyld, L.; Bellantuono, I.; Tchkonja, T.; Morgan, J.; Turner, O.; Foss, F.; George, J.; Danson, S.; Kirkland, J. L. Senescence and Cancer: A Review of Clinical Implications of Senescence and Senotherapies. *Cancers* **2020**, *12* (8), 2134. <https://doi.org/10.3390/cancers12082134>.
- (25) Davaapil, H.; Brockes, J. P.; Yun, M. H. Conserved and Novel Functions of Programmed Cellular Senescence during Vertebrate Development. *Development* **2017**, *144* (1), 106–114. <https://doi.org/10.1242/dev.138222>.
- (26) Calcinotto, A.; Kohli, J.; Zagato, E.; Pellegrini, L.; Demaria, M.; Alimonti, A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev* **2019**, *99* (2), 1047–1078. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018>.
- (27) Wang, W.; Chen, J. X.; Liao, R.; Deng, Q.; Zhou, J. J.; Huang, S.; Sun, P. Sequential Activation of the MEK-Extracellular Signal-Regulated Kinase and MKK3/6-P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediates Oncogenic Ras-Induced Premature Senescence. *Mol Cell Biol* **2002**, *22* (10), 3389–3403. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.10.3389-3403.2002>.
- (28) Naka, K.; Tachibana, A.; Ikeda, K.; Motoyama, N. Stress-Induced Premature Senescence in HTERT-Expressing Ataxia Telangiectasia Fibroblasts. *J Biol Chem* **2004**, *279* (3), 2030–2037. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309457200>.
- (29) Barascu, A.; Le Chalony, C.; Pennarun, G.; Genet, D.; Imam, N.; Lopez, B.; Bertrand, P. Oxidative Stress Induces an ATM-Independent Senescence Pathway through P38 MAPK-Mediated Lamin B1 Accumulation. *EMBO J* **2012**, *31* (5), 1080–1094. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.492>.
- (30) Franceschi, C.; Bonafè, M.; Valensin, S.; Olivieri, F.; De Luca, M.; Ottaviani, E.; De Benedictis, G. Inflamm-Aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2000**, *908* (1), 244–254. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>.
- (31) Pluquet, O.; Pourtier, A.; Abbadie, C. The Unfolded Protein Response and Cellular Senescence. A Review in the Theme: Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. *Am J Physiol Cell Physiol* **2015**, *308* (6), C415–425. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00334.2014>.
- (32) Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W. Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science* **1994**, *266* (5193), 2011–2015. <https://doi.org/10.1126/science.7605428>.
- (33) Carmeliet, P.; Jain, R. K. Molecular Mechanisms and Clinical Applications of Angiogenesis. *Nature* **2011**, *473* (7347), 298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>.
- (34) Fukumura, D.; Xavier, R.; Sugiura, T.; Chen, Y.; Park, E. C.; Lu, N.; Selig, M.; Nielsen, G.; Taksir, T.; Jain, R. K.; Seed, B. Tumor Induction of VEGF Promoter Activity in Stromal Cells. *Cell* **1998**, *94* (6), 715–725. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81731-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81731-6).
- (35) Bergers, G.; Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the Angiogenic Switch. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3* (6), 401–410. <https://doi.org/10.1038/nrc1093>.

- (36) Abramsson, A.; Berlin, O.; Papayan, H.; Paulin, D.; Shani, M.; Betsholtz, C. Analysis of Mural Cell Recruitment to Tumor Vessels. *Circulation* **2002**, *105* (1), 112–117. <https://doi.org/10.1161/hc0102.101437>.
- (37) Morikawa, S.; Baluk, P.; Kaidoh, T.; Haskell, A.; Jain, R. K.; McDonald, D. M. Abnormalities in Pericytes on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. *Am J Pathol* **2002**, *160* (3), 985–1000. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64920-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64920-6).
- (38) Baluk, P.; Morikawa, S.; Haskell, A.; Mancuso, M.; McDonald, D. M. Abnormalities of Basement Membrane on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. *Am J Pathol* **2003**, *163* (5), 1801–1815. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63540-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63540-7).
- (39) Kimura, H.; Braun, R. D.; Ong, E. T.; Hsu, R.; Secomb, T. W.; Papahadjopoulos, D.; Hong, K.; Dewhirst, M. W. Fluctuations in Red Cell Flux in Tumor Microvessels Can Lead to Transient Hypoxia and Reoxygenation in Tumor Parenchyma. *Cancer Res* **1996**, *56* (23), 5522–5528.
- (40) Bennewith, K. L.; Durand, R. E. Quantifying Transient Hypoxia in Human Tumor Xenografts by Flow Cytometry. *Cancer Res* **2004**, *64* (17), 6183–6189. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0289>.
- (41) Homrich, M.; Gotthard, I.; Wobst, H.; Diestel, S. Cell Adhesion Molecules and Ubiquitination—Functions and Significance. *Biology (Basel)* **2015**, *5* (1), 1. <https://doi.org/10.3390/biology5010001>.
- (42) Wai Wong, C.; Dye, D. E.; Coombe, D. R. The Role of Immunoglobulin Superfamily Cell Adhesion Molecules in Cancer Metastasis. *Int J Cell Biol* **2012**, *2012*, 340296. <https://doi.org/10.1155/2012/340296>.
- (43) Kaszak, I.; Witkowska-Piłaszewicz, O.; Niewiadomska, Z.; Dworecka-Kaszak, B.; Ngosa Toka, F.; Jurka, P. Role of Cadherins in Cancer—A Review. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (20), 7624. <https://doi.org/10.3390/ijms21207624>.
- (44) Borsig, L. Selectins in Cancer Immunity. *Glycobiology* **2018**, *28* (9), 648–655. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx105>.
- (45) Paoli, P.; Giannoni, E.; Chiarugi, P. Anoikis Molecular Pathways and Its Role in Cancer Progression. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1833* (12), 3481–3498. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.026>.
- (46) Gilmore, A. P. Anoikis. *Cell Death & Differentiation* **2005**, *12* (2), 1473–1477. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401723>.
- (47) Zavyalova, M. V.; Denisov, E. V.; Tashireva, L. A.; Savelieva, O. E.; Kaigorodova, E. V.; Krakhmal, N. V.; Perelmuter, V. M. Intravasation as a Key Step in Cancer Metastasis. *Biochemistry Moscow* **2019**, *84* (7), 762–772. <https://doi.org/10.1134/S0006297919070071>.
- (48) Leclers, D.; Durand, K.; Dutour, A.; Barrière, G.; Monteil, J.; Rigaud, M.; Sturtz, F. Vaisseaux lymphatiques et cancer. *Med Sci (Paris)* **2005**, *21* (10), 839–848. <https://doi.org/10.1051/medsci/20052110839>.
- (49) Stoletov, K.; Montel, V.; Lester, R. D.; Gonias, S. L.; Klemke, R. High-Resolution Imaging of the Dynamic Tumor Cell Vascular Interface in Transparent Zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (44), 17406–17411. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703446104>.
- (50) Ahirwar, D. K.; Nasser, M. W.; Ouseph, M. M.; Elbaz, M.; Cuitiño, M. C.; Kladney, R. D.; Varikuti, S.; Kaul, K.; Satoskar, A. R.; Ramaswamy, B.; Zhang, X.; Ostrowski, M. C.; Leone, G.; Ganju, R. K. Fibroblast-Derived CXCL12 Promotes Breast Cancer Metastasis by Facilitating Tumor Cell Intravasation. *Oncogene* **2018**, *37* (32), 4428–4442. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0263-7>.
- (51) Arwert, E. N.; Harney, A. S.; Entenberg, D.; Wang, Y.; Sahai, E.; Pollard, J. W.; Condeelis, J. S. A Unidirectional Transition from Migratory to Perivascular Macrophage Is Required for Tumor Cell Intravasation. *Cell Rep* **2018**, *23* (5), 1239–1248. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.007>.
- (52) Gu, Y.; Forostyan, T.; Sabbadini, R.; Rosenblatt, J. Epithelial Cell Extrusion Requires the Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 Pathway. *J Cell Biol* **2011**, *193* (4), 667–676. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010075>.

- (53) Gudipaty, S. A.; Rosenblatt, J. Epithelial Cell Extrusion: Pathways and Pathologies. *Semin Cell Dev Biol* **2017**, *67*, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.05.010>.
- (54) Miles, F. L.; Pruitt, F. L.; van Golen, K. L.; Cooper, C. R. Stepping out of the Flow: Capillary Extravasation in Cancer Metastasis. *Clin Exp Metastasis* **2008**, *25* (4), 305–324. <https://doi.org/10.1007/s10585-007-9098-2>.
- (55) Yang, J.; Du, X.; Wang, G.; Sun, Y.; Chen, K.; Zhu, X.; Lazar, A. J. F.; Hunt, K. K.; Pollock, R. E.; Zhang, W. Mesenchymal to Epithelial Transition in Sarcomas. *European Journal of Cancer* **2014**, *50* (3), 593–601. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.11.006>.
- (56) Yates, C. C.; Shepard, C. R.; Stolz, D. B.; Wells, A. Co-Culturing Human Prostate Carcinoma Cells with Hepatocytes Leads to Increased Expression of E-Cadherin. *Br J Cancer* **2007**, *96* (8), 1246–1252. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603700>.
- (57) Bloushtain-Qimron, N.; Yao, J.; Snyder, E. L.; Shipitsin, M.; Campbell, L. L.; Mani, S. A.; Hu, M.; Chen, H.; Ustyansky, V.; Antosiewicz, J. E.; Argani, P.; Halushka, M. K.; Thomson, J. A.; Pharoah, P.; Porgador, A.; Sukumar, S.; Parsons, R.; Richardson, A. L.; Stampfer, M. R.; Gelman, R. S.; Nikolskaya, T.; Nikolsky, Y.; Polyak, K. Cell Type-Specific DNA Methylation Patterns in the Human Breast. *PNAS* **2008**, *105* (37), 14076–14081. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805206105>.
- (58) Shipitsin, M.; Campbell, L. L.; Argani, P.; Weremowicz, S.; Bloushtain-Qimron, N.; Yao, J.; Nikolskaya, T.; Serebryiskaya, T.; Beroukhim, R.; Hu, M.; Halushka, M. K.; Sukumar, S.; Parker, L. M.; Anderson, K. S.; Harris, L. N.; Garber, J. E.; Richardson, A. L.; Schnitt, S. J.; Nikolsky, Y.; Gelman, R. S.; Polyak, K. Molecular Definition of Breast Tumor Heterogeneity. *Cancer Cell* **2007**, *11* (3), 259–273. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.013>.
- (59) Yao, D.; Dai, C.; Peng, S. Mechanism of the Mesenchymal–Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation. *Mol Cancer Res* **2011**, *9* (12), 1608–1620. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0568>.
- (60) Stessels, F.; Van den Eynden, G.; Van der Auwera, I.; Salgado, R.; Van den Heuvel, E.; Harris, A. L.; Jackson, D. G.; Colpaert, C. G.; van Marck, E. A.; Dirix, L. Y.; Vermeulen, P. B. Breast Adenocarcinoma Liver Metastases, in Contrast to Colorectal Cancer Liver Metastases, Display a Non-Angiogenic Growth Pattern That Preserves the Stroma and Lacks Hypoxia. *Br J Cancer* **2004**, *90* (7), 1429–1436. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601727>.
- (61) Ribatti, D.; Mangialardi, G.; Vacca, A. Stephen Paget and the ‘Seed and Soil’ Theory of Metastatic Dissemination. *Clin. Exper. Med.* **2006**, *6* (4), 145–149. <https://doi.org/10.1007/s10238-006-0117-4>.
- (62) Chai, T. C.; Russo, A.; Yu, S.; Lu, M. Mucosal Signaling in the Bladder. *Auton Neurosci* **2016**, *200*, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.08.009>.
- (63) Sellers, D.; Chess-Williams, R.; Michel, M. C. Modulation of Lower Urinary Tract Smooth Muscle Contraction and Relaxation by the Urothelium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2018**, *391* (7), 675–694. <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1510-8>.
- (64) Shermadou, E. S.; Rahman, S.; Leslie, S. W. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Bladder. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2021.
- (65) Gray’s Atlas of Anatomy - 3rd Edition <https://www-elsevier-com.passerelle.univ-rennes1.fr/books/grays-atlas-of-anatomy/drake/978-0-323-63639-1> (accessed 2022 -04 -16).
- (66) Janssen, D. *Bladder Urothelium Involvement in Afferent Signaling and Barrier Function. PhD Thesis DAW Janssen 2016*; 2016.
- (67) Abelson, B.; Sun, D.; Que, L.; Nebel, R. A.; Baker, D.; Popiel, P.; Amundsen, C. L.; Chai, T.; Close, C.; DiSanto, M.; Fraser, M. O.; Kielb, S. J.; Kuchel, G.; Mueller, E. R.; Palmer, M. H.; Parker-Autry, C.; Wolfe, A. J.; Damaser, M. S. Sex Differences in Lower Urinary Tract Biology and Physiology. *Biol Sex Differ* **2018**, *9*, 45. <https://doi.org/10.1186/s13293-018-0204-8>.
- (68) Walz, T.; Häner, M.; Wu, X.-R.; Henn, C.; Engel, A.; Sun, T.-T.; Aebi, U. Towards the Molecular Architecture of the Asymmetric Unit Membrane of the Mammalian Urinary Bladder Epithelium: A Closed “Twisted Ribbon” Structure. *Journal of Molecular Biology* **1995**, *248* (5), 887–900. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0269>.

- (69) Khandelwal, P.; Abraham, S. N.; Apodaca, G. Cell Biology and Physiology of the Uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* **2009**, *297* (6), F1477–F1501. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00327.2009>.
- (70) Truschel, S. T.; Wang, E.; Ruiz, W. G.; Leung, S.-M.; Rojas, R.; Lavelle, J.; Zeidel, M.; Stoffer, D.; Apodaca, G. Stretch-Regulated Exocytosis/Endocytosis in Bladder Umbrella Cells. *Mol Biol Cell* **2002**, *13* (3), 830–846. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-09-0435>.
- (71) Hicks, R. M. The Mammalian Urinary Bladder: An Accommodating Organ. *Biol Rev Camb Philos Soc* **1975**, *50* (2), 215–246. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1975.tb01057.x>.
- (72) Acharya, P.; Beckel, J.; Ruiz, W. G.; Wang, E.; Rojas, R.; Birder, L.; Apodaca, G. Distribution of the Tight Junction Proteins ZO-1, Occludin, and Claudin-4, -8, and -12 in Bladder Epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* **2004**, *287* (2), F305–318. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00341.2003>.
- (73) Varley, C. L.; Garthwaite, M. A. E.; Cross, W.; Hinley, J.; Trejdosiewicz, L. K.; Southgate, J. PPAR-gamma-Regulated Tight Junction Development during Human Urothelial Cytodifferentiation. *J Cell Physiol* **2006**, *208* (2), 407–417. <https://doi.org/10.1002/jcp.20676>.
- (74) Lewis, S. A.; Eaton, D. C.; Diamond, J. M. The Mechanism of Na⁺ Transport by Rabbit Urinary Bladder. *J Membr Biol* **1976**, *28* (1), 41–70. <https://doi.org/10.1007/BF01869690>.
- (75) Lee, G. Uroplakins in the Lower Urinary Tract. *Int Neurourol J* **2011**, *15* (1), 4. <https://doi.org/10.5213/inj.2011.15.1.4>.
- (76) Jost, S. P.; Gosling, J. A.; Dixon, J. S. The Morphology of Normal Human Bladder Urothelium. *J Anat* **1989**, *167*, 103–115.
- (77) Haefliger, J.-A.; Tissières, P.; Tawadros, T.; Formenton, A.; Bény, J.-L.; Nicod, P.; Frey, P.; Meda, P. Connexins 43 and 26 Are Differentially Increased after Rat Bladder Outlet Obstruction. *Exp Cell Res* **2002**, *274* (2), 216–225. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5465>.
- (78) Jones, J. C. R. Hemidesmosomes in Bladder Epithelial Cells. *Urology* **2001**, *57* (6, Supplement 1), 103. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(01\)01025-1](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(01)01025-1).
- (79) Bolla, S. R.; Odeluga, N.; Jetti, R. Histology, Bladder. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2021.
- (80) Sam, P.; Nassereddin, A.; LaGrange, C. A. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Bladder Detrusor Muscle. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2021.
- (81) Global Cancer Observatory <https://gco.iarc.fr/> (accessed 2021 -10 -14).
- (82) Leal, J.; Luengo-Fernandez, R.; Sullivan, R.; Witjes, J. A. Economic Burden of Bladder Cancer Across the European Union. *Eur Urol* **2016**, *69* (3), 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.10.024>.
- (83) SPF. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Tumeurs solides : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim <https://www.santepubliquefrance.fr/import/estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-metropolitaine-entre-1990-et-2018-tumeurs-solides-etude-a-partir> (accessed 2021 -10 -18).
- (84) Les facteurs de risque - Cancer de la vessie <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-de-la-vessie/Les-facteurs-de-risque> (accessed 2021 -10 -15).
- (85) Kogevinas, M.; 't Mannetje, A.; Cordier, S.; Ranft, U.; González, C. A.; Vineis, P.; Chang-Claude, J.; Lynge, E.; Wahrendorf, J.; Tzonou, A.; Jöckel, K.-H.; Serra, C.; Porru, S.; Hours, M.; Greiser, E.; Boffetta, P. Occupation and Bladder Cancer among Men in Western Europe. *Cancer Causes Control* **2003**, *14* (10), 907–914. <https://doi.org/10.1023/b:caco.0000007962.19066.9c>.
- (86) Hydrocarbures aromatiques polycycliques et risque de cancer | Cancer et environnement <https://www.cancer-environnement.fr/235-Hydrocarbures-aromatiques-polycycliques-HAP.ce.aspx> (accessed 2021 -10 -17).
- (87) Cartographie des expositions aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par secteur d'activité : focus sur la surveillance biologique des expositions professionnelles - Article de revue - INRS <https://www.inrs.fr/media.html?reflNRS=TC%20162> (accessed 2021 -10 -17).

- (88) Griffiths, T. R. L.; Cancer, on behalf of A. on B. Current Perspectives in Bladder Cancer Management. *International Journal of Clinical Practice* **2013**, *67* (5), 435–448. <https://doi.org/10.1111/ijcp.12075>.
- (89) Johansson, S. L.; Cohen, S. M. Epidemiology and Etiology of Bladder Cancer. *Semin Surg Oncol* **1997**, *13* (5), 291–298. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2388\(199709/10\)13:5<291::aid-ssu2>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2388(199709/10)13:5<291::aid-ssu2>3.0.co;2-8).
- (90) WHO Regional Office for Europe. *Review of Evidence on Health Aspects of Air Pollution – REVI-HAAP Project: Technical Report*; WHO Regional Office for Europe: Copenhagen, 2013.
- (91) Gu, J.; Wu, X. Genetic Susceptibility to Bladder Cancer Risk and Outcome. *Personalized Medicine* **2011**, *8* (3), 365–374. <https://doi.org/10.2217/pme.11.15>.
- (92) Bladder Cancer Epidemiology and Genetic Susceptibility. *J Biomed Res* **2013**. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20130026>.
- (93) van der Post, R. S.; Kiemeneij, L. A.; Ligtenberg, M. J. L.; Witjes, J. A.; Hulsbergen-van de Kaa, C. A.; Bodmer, D.; Schaap, L.; Kets, C. M.; van Krieken, J. H. J. M.; Hoogerbrugge, N. Risk of Urothelial Bladder Cancer in Lynch Syndrome Is Increased, in Particular among MSH2 Mutation Carriers. *J Med Genet* **2010**, *47* (7), 464–470. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.076992>.
- (94) Paner, G. P.; Stadler, W. M.; Hansel, D. E.; Montironi, R.; Lin, D. W.; Amin, M. B. Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers. *European Urology* **2018**, *73* (4), 560–569. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.12.018>.
- (95) Rouprêt, M.; Pignot, G.; Masson-Lecomte, A.; Compérat, E.; Audenet, F.; Roumiguié, M.; Houédé, N.; Larré, S.; Brunelle, S.; Xylinas, E.; Neuzillet, Y.; Méjean, A. Recommandations françaises du Comité de cancérologie de l’AFU – actualisation 2020–2022 : tumeurs de la vessie. *Progrès en Urologie* **2020**, *30* (12), S78–S135. [https://doi.org/10.1016/S1166-7087\(20\)30751-X](https://doi.org/10.1016/S1166-7087(20)30751-X).
- (96) Charpentier, M.; Gutierrez, C.; Guillaudeux, T.; Verhoest, G.; Pedoux, R. Noninvasive Urine-Based Tests to Diagnose or Detect Recurrence of Bladder Cancer. *Cancers (Basel)* **2021**, *13* (7), 1650. <https://doi.org/10.3390/cancers13071650>.
- (97) Farling, K. B. Bladder Cancer: Risk Factors, Diagnosis, and Management. *The Nurse Practitioner* **2017**, *42* (3), 26–33. <https://doi.org/10.1097/01.NPR.0000512251.61454.5c>.
- (98) Matulay, J. T.; Kamat, A. M. Advances in Risk Stratification of Bladder Cancer to Guide Personalized Medicine. *F1000Research* July 25, 2018. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14903.1>.
- (99) Alfred Witjes, J.; Le Bret, T.; Compérat, E. M.; Cowan, N. C.; De Santis, M.; Bruins, H. M.; Hernández, V.; Espinós, E. L.; Dunn, J.; Rouanne, M.; Neuzillet, Y.; Veskimäe, E.; van der Heijden, A. G.; Gakis, G.; Ribal, M. J. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-Invasive and Metastatic Bladder Cancer. *European Urology* **2017**, *71* (3), 462–475. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.06.020>.
- (100) Queremel Milani, D. A.; Jialal, I. Urinalysis. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2021.
- (101) Diamandopoulos, A.; Goudas, P.; Oreopoulos, D. Thirty-Six Hippocratic Aphorisms of Nephrologic Interest. *Am J Kidney Dis* **2009**, *54* (1), 143–153. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2009.01.275>.
- (102) Androustos, G. Théophile Protospatharios: un précurseur byzantin de l’urologie. *Androl.* **2005**, *15* (3), 316–323. <https://doi.org/10.1007/BF03034781>.
- (103) Kouzis, A. *Sauvegard~ Es de Medecins Byzantins 12 A et B, Theophile:{{Des Urines et Des Excretions}}*; Athenes, 1910.
- (104) L’urine, si utile dans l’histoire https://plus.lapresse.ca/screens/690fb6b3-79e3-4e48-bfce-92c8f91609f5__7C__0.html (accessed 2021 -11 -18).
- (105) Echeverry, G.; Hortin, G. L.; Rai, A. J. Introduction to Urinalysis: Historical Perspectives and Clinical Application. *Methods Mol Biol* **2010**, *641*, 1–12. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-711-2_1.

- (106) Comment faire une aspiration sus-pubienne de la vessie chez un enfant - Pédiatrie <https://www.msmanuals.com/fr/professional/p%C3%A9diatrie/comment-effectuer-des-proc%C3%A9dures-urologiques-p%C3%A9diatriques/comment-faire-une-aspiration-sus-pubienne-de-la-vessie-chez-un-enfant> (accessed 2021 -11 -19).
- (107) Moulin, B.; Peraldi, M.-N. *Néphrologie*, 8e éd.; Réussir l'IECN; Ellipses: Paris, 2018.
- (108) Simerville, J. A.; Maxted, W. C.; Pahira, J. J. Urinalysis: A Comprehensive Review. *Am Fam Physician* **2005**, *71* (6), 1153–1162.
- (109) Urine Is Not Sterile: Use of Enhanced Urine Culture Techniques To Detect Resident Bacterial Flora in the Adult Female Bladder <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/JCM.02876-13> (accessed 2021 -11 -23). <https://doi.org/10.1128/JCM.02876-13>.
- (110) Isnard, C. Infections du tractus urinaire à pathogènes émergents. *Journal des Anti-infectieux* **2015**, *17* (4), 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2015.10.002>.
- (111) MACHEREY-NAGEL <https://www.mn-net.com/fr/nitrite> (accessed 2021 -11 -23).
- (112) Infections urinaires fongiques - Troubles génito-urinaires <https://www.msmanuals.com/fr/professional/troubles-g%C3%A9nito-urinaires/infections-urinaires/infections-urinaires-fongiques> (accessed 2021 -11 -23).
- (113) Fraisse, T.; Lachaud, L.; Sotto, A.; Lavigne, J.-P.; Cariou, G.; Boiteux, J.-P.; Escaravage, L.; Coloby, P.; Bruyère, F. Recommandations du comité d'infectiologie de l'AFU. Diagnostic, traitement et suivi des candiduries. *Progrès en Urologie* **2011**, *21* (5), 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2011.02.004>.
- (114) Bourée, P.; Kanner, A. Diagnostic des parasitoses urinaires. *Revue Francophone des Laboratoires* **2006**, *2006* (385), 69–78. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(06\)80539-3](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(06)80539-3).
- (115) Eiras, J.; Zhu, X.-Q.; Yurlova, N.; Pedrassani, D.; Yoshikawa, M.; Nawa, Y. Diocetophyme Renale (Goeze, 1782) (Nematoda, Diocetophymidae) Parasitic in Mammals Other than Humans: A Comprehensive Review. *Parasitology International* **2021**, *81*, 102269. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102269>.
- (116) cellules tubulaires http://urine.optmq.connexence.com/docfr/doc_036.html (accessed 2021 -11 -29).
- (117) cellules pavimenteuses http://urine.optmq.connexence.com/docfr/doc_035.html (accessed 2021 -11 -29).
- (118) Sharp, V. J.; Barnes, K. T.; Erickson, B. A. Assessment of Asymptomatic Microscopic Hematuria in Adults. *AFP* **2013**, *88* (11), 747–754.
- (119) Rosenthal, D. L.; Wojcik, E. M.; Kurtycz, D. F. I. *The Paris System for Reporting Urinary Cytology*; 2016.
- (120) Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear. *Journal of the American Medical Association* **1943**, *123* (3), 178. <https://doi.org/10.1001/jama.1943.02840380054035>.
- (121) Keebler, C. M.; Facik, M. Cytopreparatory Techniques. In *Comprehensive Cytopathology*; Elsevier, 2008; pp 977–1003. <https://doi.org/10.1016/B978-141604208-2.10031-4>.
- (122) Papanicolaou Stain (Pap Stain) Protocol http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/papanicolaou_stain.htm (accessed 2021 -12 -14).
- (123) Rosenthal, D. L.; Cohen, M. B.; Guan, H.; Owens, C. L.; Tokuda, Y.; Wojcik, E. M. Negative for High-Grade Urothelial Carcinoma (Negative). In *The Paris System for Reporting Urinary Cytology*; Rosenthal, D. L., Wojcik, E. M., Kurtycz, D. F. I., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 13–38. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22864-8_3.
- (124) Brimo, F.; Vollmer, R. T.; Case, B.; Aprikian, A.; Kassouf, W.; Auger, M. Accuracy of Urine Cytology and the Significance of an Atypical Category. *Am J Clin Pathol* **2009**, *132* (5), 785–793. <https://doi.org/10.1309/AJCPPRZLG9KT9AXL>.
- (125) Raab, S. S.; Grzybicki, D. M.; Vrbin, C. M.; Geisinger, K. R. Urine Cytology Discrepancies: Frequency, Causes, and Outcomes. *Am J Clin Pathol* **2007**, *127* (6), 946–953. <https://doi.org/10.1309/XUVXFXMFPL7TELCE>.
- (126) VandenBussche, C. J.; Sathiyamoorthy, S.; Owens, C. L.; Burroughs, F. H.; Rosenthal, D. L.; Guan, H. The Johns Hopkins Hospital Template for Urologic Cytology Samples: Parts II and III:

- Improving the Predictability of Indeterminate Results in Urinary Cytologic Samples: An Outcomes and Cytomorphologic Study. *Cancer Cytopathol* **2013**, *121* (1), 21–28. <https://doi.org/10.1002/cncy.21254>.
- (127) Pambuccian, S. E. What Is Atypia? Use, Misuse and Overuse of the Term Atypia in Diagnostic Cytopathology. *J Am Soc Cytopathol* **2015**, *4* (1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.jasc.2014.10.004>.
- (128) Barkan, G. A.; Elsheikh, T. M.; Kurtycz, D. F. I.; Minamiguchi, S.; Ohtani, H.; Piaton, E.; Prince, S. S.; Tabatabai, Z. L.; VandenBussche, C. J. Atypical Urothelial Cells (AUC). In *The Paris System for Reporting Urinary Cytology*; Rosenthal, D. L., Wojcik, E. M., Kurtycz, D. F. I., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 39–48. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22864-8_4.
- (129) McCroskey, Z.; Bahar, B.; Hu, Z.; Wojcik, E. M.; Barkan, G. A. Subclassifying Atypia in Urine Cytology: What Are the Helpful Features? *J Am Soc Cytopathol* **2015**, *4* (4), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.jasc.2014.11.002>.
- (130) Brimo, F.; Auger, M.; Elsheikh, T. M.; Guan, H.; Kinjo, M.; Piaton, E.; Rosenthal, D. L.; Shimokama, T.; Tambouret, R. H. Suspicious for High-Grade Urothelial Carcinoma (Suspicious). In *The Paris System for Reporting Urinary Cytology*; Rosenthal, D. L., Wojcik, E. M., Kurtycz, D. F. I., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 49–60. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22864-8_5.
- (131) Piaton, E.; Daniel, L.; Verrielle, V.; Dalifard, I.; Zimmermann, U.; Renaudin, K.; Gobet, F.; Caratero, A.; Desvaux, D.; Pouille, Y.; Seigneurin, D.; French Prospective Multicenter Study. Improved Detection of Urothelial Carcinomas with Fluorescence Immunocytochemistry (UCyt+ Assay) and Urinary Cytology: Results of a French Prospective Multicenter Study. *Lab Invest* **2003**, *83* (6), 845–852. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000074893.70675.2e>.
- (132) Ton Nu, T. N.; Kassouf, W.; Ahmadi-Kaliji, B.; Charbonneau, M.; Auger, M.; Brimo, F. The Value of the “Suspicious for Urothelial Carcinoma” Cytology Category: A Correlative Study of 4 Years Including 337 Patients. *Cancer Cytopathol* **2014**, *122* (11), 796–803. <https://doi.org/10.1002/cncy.21449>.
- (133) Papanicolaou, G. N. The Cell Smear Method of Diagnosing Cancer. *Am J Public Health Nations Health* **1948**, *38* (2), 202–205. <https://doi.org/10.2105/AJPH.38.2.202>.
- (134) Papanicolaou, G. N.; Marshall, V. F. URINE SEDIMENT SMEARS AS A DIAGNOSTIC PROCEDURE IN CANCERS OF THE URINARY TRACT. *Science* **1945**, *101* (2629), 519–520. <https://doi.org/10.1126/science.101.2629.519>.
- (135) Siddiqui, M. T.; Fadda, G.; Han, J.-Y.; Owens, C. L.; Tabatabai, Z. L.; Tsuzuki, T. High-Grade Urothelial Carcinoma (HGUC). In *The Paris System for Reporting Urinary Cytology*; Rosenthal, D. L., Wojcik, E. M., Kurtycz, D. F. I., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 61–74. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22864-8_6.
- (136) Barkan, G. A.; Wojcik, E. M.; Nayar, R.; Savic-Prince, S.; Quek, M. L.; Kurtycz, D. F. I.; Rosenthal, D. L. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology. *ACY* **2016**, *60* (3), 185–197. <https://doi.org/10.1159/000446270>.
- (137) Reid, M. D.; Osunkoya, A. O.; Siddiqui, M. T.; Looney, S. W. Accuracy of Grading of Urothelial Carcinoma on Urine Cytology: An Analysis of Interobserver and Intraobserver Agreement. *Int J Clin Exp Pathol* **2012**, *5* (9), 882–891.
- (138) Lopez-Beltran, A.; Montironi, R. Non-Invasive Urothelial Neoplasms: According to the Most Recent WHO Classification. *European Urology* **2004**, *46* (2), 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2004.03.017>.
- (139) Wojcik, E. M.; Antic, T.; Chandra, A.; Cohen, M. B.; McCroskey, Z.; Ro, J. Y.; Shiraish, T. Low-Grade Urothelial Neoplasia (LGUN). In *The Paris System for Reporting Urinary Cytology*; Rosenthal, D. L., Wojcik, E. M., Kurtycz, D. F. I., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 75–86. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22864-8_7.
- (140) Hoda, R. S.; Pambuccian, S. E.; Ro, J. Y.; Sung, S. H. Other Malignancies Primary and Metastatic and Miscellaneous Lesions. In *The Paris System for Reporting Urinary Cytology*; Rosenthal, D.

- L., Wojcik, E. M., Kurtycz, D. F. I., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 87–114. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22864-8_8.
- (141) Owens, C. L.; Vandenbussche, C. J.; Burroughs, F. H.; Rosenthal, D. L. A Review of Reporting Systems and Terminology for Urine Cytology. *Cancer Cytopathol* **2013**, *121* (1), 9–14. <https://doi.org/10.1002/cncy.21253>.
- (142) Zhu, C.-Z.; Ting, H.-N.; Ng, K.-H.; Ong, T.-A. A Review on the Accuracy of Bladder Cancer Detection Methods. *J Cancer* **2019**, *10* (17), 4038–4044. <https://doi.org/10.7150/jca.28989>.
- (143) Oeyen, E.; Hoekx, L.; De Wachter, S.; Baldewijns, M.; Ameye, F.; Mertens, I. Bladder Cancer Diagnosis and Follow-Up: The Current Status and Possible Role of Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (4), E821. <https://doi.org/10.3390/ijms20040821>.
- (144) Malmström, P.-U.; Agrawal, S.; Bläckberg, M.; Boström, P. J.; Malavaud, B.; Zaak, D.; Hermann, G. G. Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Vision for the Future. *Scand J Urol* **2017**, *51* (2), 87–94. <https://doi.org/10.1080/21681805.2017.1283359>.
- (145) Sloan, F. A.; Yashkin, A. P.; Akushevich, I.; Inman, B. A. The Cost to Medicare of Bladder Cancer Care. *Eur Urol Oncol* **2020**, *3* (4), 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.euo.2019.01.015>.
- (146) Kinders, R.; Jones, T.; Root, R.; Bruce, C.; Murchison, H.; Corey, M.; Williams, L.; Enfield, D.; Hass, G. M. Complement Factor H or a Related Protein Is a Marker for Transitional Cell Cancer of the Bladder. *Clin Cancer Res* **1998**, *4* (10), 2511–2520.
- (147) Raitanen, M.-P.; Kaasinen, E.; Rintala, E.; Hansson, E.; Nieminen, P.; Aine, R.; Tammela, T. L. J. Prognostic Utility of Human Complement Factor H Related Protein Test (the BTA Stat[®]Test). *Br J Cancer* **2001**, *85* (4), 552–556. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1938>.
- (148) Gutiérrez Baños, J. L.; del Henar Rebollo Rodrigo, M.; Antolín Juárez, F. M.; García, B. M. Usefulness of the BTA Stat Test for the Diagnosis of Bladder Cancer. *Urology* **2001**, *57* (4), 685–689. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(00\)01090-6](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(00)01090-6).
- (149) Thomas, L.; Leyh, H.; Marberger, M.; Bombardieri, E.; Bassi, P.; Pagano, F.; Pansadoro, V.; Sternberg, C. N.; Boccon-Gibod, L.; Ravery, V.; Le Guludec, D.; Meulemans, A.; Conort, P.; Ishak, L. Multicenter Trial of the Quantitative BTA TRAK Assay in the Detection of Bladder Cancer. *Clin Chem* **1999**, *45* (4), 472–477.
- (150) Shariat, S. F.; Karam, J. A.; Lotan, Y.; Karakiewicz, P. I. Critical Evaluation of Urinary Markers for Bladder Cancer Detection and Monitoring. *Rev Urol* **2008**, *10* (2), 120–135.
- (151) Budman, L. I.; Kassouf, W.; Steinberg, J. R. Biomarkers for Detection and Surveillance of Bladder Cancer. *Can Urol Assoc J* **2008**, *2* (3), 212–221. <https://doi.org/10.5489/cuaj.600>.
- (152) Campos-fernandes, J.-L.; Descotes, F.; Andre, J.; Perrin, P.; Devonec, M.; Ruffion, A. Intérêt des marqueurs urinaires dans le diagnostic et le suivi des tumeurs urothéliales de vessie. *Progrès en Urologie* **2007**, *17* (1), 23–34. [https://doi.org/10.1016/S1166-7087\(07\)92221-6](https://doi.org/10.1016/S1166-7087(07)92221-6).
- (153) Bibbo, M.; Kern, W. H. CHAPTER 15 - Urinary Tract. In *Comprehensive Cytopathology (Third Edition)*; Bibbo, M., Wilbur, D., Eds.; W.B. Saunders: Edinburgh, 2008; pp 409–437. <https://doi.org/10.1016/B978-141604208-2.10015-6>.
- (154) Miyanaga, N.; Akaza, H.; Tsukamoto, T.; Ishikawa, S.; Noguchi, R.; Ohtani, M.; Kawabe, K.; Kubota, Y.; Fujita, K.; Obata, K.; Hirao, Y.; Kotake, T.; Ohmori, H.; Kumazawa, J.; Koiso, K. Urinary Nuclear Matrix Protein 22 as a New Marker for the Screening of Urothelial Cancer in Patients with Microscopic Hematuria. *International Journal of Urology* **1999**, *6* (4), 173–177. <https://doi.org/10.1046/j.1442-2042.1999.06437.x>.
- (155) Balci, M.; Tuncel, A.; Guzel, O.; Aslan, Y.; Sezgin, T.; Bilgin, O.; Senel, C.; Atan, A. Use of the Nuclear Matrix Protein 22 Bladder Chek Test[™] in the Diagnosis of Residual Urothelial Cancer before a Second Transurethral Resection of Bladder Cancer. *Int Urol Nephrol* **2015**, *47* (3), 473–477. <https://doi.org/10.1007/s11255-015-0921-4>.
- (156) Mowatt, G.; Zhu, S.; Kilonzo, M.; Boachie, C.; Fraser, C.; Griffiths, T. R. L.; N'Dow, J.; Nabi, G.; Cook, J.; Vale, L. Systematic Review of the Clinical Effectiveness and Cost-Effectiveness of Photodynamic Diagnosis and Urine Biomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and Cytology for the Detection and Follow-up of Bladder Cancer. *Health Technology Assessment* **2010**, *14* (4), 1–356. <https://doi.org/10.3310/hta14040>.

- (157) Moonen, P. M. J.; Kiemeny, L. A. L. M.; Witjes, J. A. Urinary NMP22® BladderChek® Test in the Diagnosis of Superficial Bladder Cancer. *European Urology* **2005**, *48* (6), 951–956. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.09.002>.
- (158) Doğan, C.; Pelit, E. S.; Yildirim, A.; Zemheri, I. E.; Çanakçı, C.; Başok, E. K.; Çaşkurlu, T. The Value of the NMP22 Test for Superficial Bladder Cancer Diagnosis and Follow-Up. *Turk J Urol* **2013**, *39* (3), 137–142. <https://doi.org/10.5152/tud.2013.029>.
- (159) Kumar, A.; Kumar, R.; Gupta, N. P. Comparison of NMP22 BladderChek Test and Urine Cytology for the Detection of Recurrent Bladder Cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology* **2006**, *36* (3), 172–175. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyi244>.
- (160) Fradet, Y.; Larue, H.; Parent-Vaugeois, C.; Bergeron, A.; Dufour, C.; Boucher, L.; Bernier, L. Monoclonal Antibody against a Tumor-Associated Sialoglycoprotein of Superficial Papillary Bladder Tumors and Cervical Condylomas. *International Journal of Cancer* **1990**, *46* (6), 990–997. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910460607>.
- (161) Bergeron, A.; LaRue, H.; Fradet, Y. Identification of a Superficial Bladder Tumor-Associated Glycoform of the Carcinoembryonic Antigen by Monoclonal Antibody 19A211. *Cancer Res* **1996**, *56* (4), 908–915.
- (162) Têtu, B.; Tiguert, R.; Harel, F.; Fradet, Y. ImmunoCyt/UCyt+ Improves the Sensitivity of Urine Cytology in Patients Followed for Urothelial Carcinoma. *Mod Pathol* **2005**, *18* (1), 83–89. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800262>.
- (163) Bergeron, A.; Champetier, S.; LaRue, H.; Fradet, Y. MAUB Is a New Mucin Antigen Associated with Bladder Cancer (*). *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271* (12), 6933–6940. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.12.6933>.
- (164) BERGERON, A.; LaRUE, H.; FRADET, Y. Biochemical Analysis of a Bladder-Cancer-Associated Mucin: Structural Features and Epitope Characterization. *Biochemical Journal* **1997**, *321* (3), 889–896. <https://doi.org/10.1042/bj3210889>.
- (165) Allard, P.; Fradet, Y.; Têtu, B.; Bernard, P. Tumor-Associated Antigens as Prognostic Factors for Recurrence in 382 Patients with Primary Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Clin Cancer Res* **1995**, *1* (10), 1195–1202.
- (166) Greene, K. L.; Berry, A.; Konety, B. R. Diagnostic Utility of the ImmunoCyt/UCyt+ Test in Bladder Cancer. *Rev Urol* **2006**, *8* (4), 190–197.
- (167) Schmitz-Dräger, C.; Bonberg, N.; Pesch, B.; Todenhöfer, T.; Sahin, S.; Behrens, T.; Brüning, T.; Schmitz-Dräger, B. J. Replacing Cystoscopy by Urine Markers in the Follow-up of Patients with Low-Risk Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer?—An International Bladder Cancer Network Project. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* **2016**, *34* (10), 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2016.06.001>.
- (168) Kassouf, W.; Traboulsi, S. L.; Schmitz-Dräger, B.; Palou, J.; Witjes, J. A.; van Rhijn, B. W. G.; Grossman, H. B.; Kiemeny, L. A.; Goebell, P. J.; Kamat, A. M. Follow-up in Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer—International Bladder Cancer Network Recommendations. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* **2016**, *34* (10), 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2016.05.028>.
- (169) Sokolova, I. A.; Halling, K. C.; Jenkins, R. B.; Burkhardt, H. M.; Meyer, R. G.; Seelig, S. A.; King, W. The Development of a Multitarget, Multicolor Fluorescence in Situ Hybridization Assay for the Detection of Urothelial Carcinoma in Urine. *The Journal of Molecular Diagnostics* **2000**, *2* (3), 116–123. [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60625-3](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60625-3).
- (170) Yoder, B. J.; Skacel, M.; Hedgepeth, R.; Babineau, D.; Ulchaker, J. C.; Liou, L. S.; Brainard, J. A.; Biscotti, C. V.; Jones, J. S.; Tubbs, R. R. Reflex UroVysion Testing of Bladder Cancer Surveillance Patients with Equivocal or Negative Urine Cytology: A Prospective Study with Focus on the Natural History of Anticipatory Positive Findings. *Am J Clin Pathol* **2007**, *127* (2), 295–301. <https://doi.org/10.1309/ADJL7E810U1H42BJ>.
- (171) Kojima, T.; Nishiyama, H.; Ozono, S.; Hinotsu, S.; Keino, N.; Yamaguchi, A.; Sakai, H.; Enomoto, Y.; Horie, S.; Fujimoto, K.; Matsuyama, H.; Okamura, T.; Kanimoto, Y.; Oya, M.; Nonomura, N.; Naito, S.; Akaza, H. Clinical Evaluation of Two Consecutive UroVysion Fluorescence in Situ

- Hybridization Tests to Detect Intravesical Recurrence of Bladder Cancer: A Prospective Blinded Comparative Study in Japan. *Int J Clin Oncol* **2018**, *23* (6), 1140–1147. <https://doi.org/10.1007/s10147-018-1311-6>.
- (172) Pichler, R.; Tulchiner, G.; Fritz, J.; Schaefer, G.; Horninger, W.; Heidegger, I. Urinary UBC Rapid and NMP22 Test for Bladder Cancer Surveillance in Comparison to Urinary Cytology: Results from a Prospective Single-Center Study. *Int J Med Sci* **2017**, *14* (9), 811–819. <https://doi.org/10.7150/ijms.19929>.
- (173) van Valenberg, F. J. P.; Strauss-Ayali, D.; Agmon-Gerstein, Y.; Friedman, A.; Arentsen, H. C.; Schaafsma, H. E.; Witjes, J. A.; Oosterwijk, E. Assessment of the Efficacy of Repeated Instillations of Mitomycin C Mixed with a Thermosensitive Hydrogel in an Orthotopic Rat Bladder Cancer Model. *Ther Adv Urol* **2018**, *10* (7), 213–221. <https://doi.org/10.1177/1756287218762064>.
- (174) Greuber, E. K.; Smith-Pearson, P.; Wang, J.; Pendergast, A. M. Role of ABL Family Kinases in Cancer: From Leukemia to Solid Tumors. *Nat Rev Cancer* **2013**, *13* (8), 559–571. <https://doi.org/10.1038/nrc3563>.
- (175) Boucher, W.; Kempuraj, D.; Michaelian, M.; Theoharides, T. C. Corticotropin-Releasing Hormone-Receptor 2 Is Required for Acute Stress-Induced Bladder Vascular Permeability and Release of Vascular Endothelial Growth Factor. *BJU International* **2010**, *106* (9), 1394–1399. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2010.09237.x>.
- (176) Cui, H.; Onyango, P.; Brandenburg, S.; Wu, Y.; Hsieh, C.-L.; Feinberg, A. P. Loss of Imprinting in Colorectal Cancer Linked to Hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer Res* **2002**, *62* (22), 6442–6446.
- (177) Wang, F.-H.; Ma, X.-J.; Xu, D.; Luo, J. UPK1B Promotes the Invasion and Metastasis of Bladder Cancer via Regulating the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2018**, *22* (17), 5471–5480. https://doi.org/10.26355/eurrev_201809_15807.
- (178) Holyoake, A.; O’Sullivan, P.; Pollock, R.; Best, T.; Watanabe, J.; Kajita, Y.; Matsui, Y.; Ito, M.; Nishiyama, H.; Kerr, N.; da Silva Tatley, F.; Cambridge, L.; Toro, T.; Ogawa, O.; Guilford, P. Development of a Multiplex RNA Urine Test for the Detection and Stratification of Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Clin Cancer Res* **2008**, *14* (3), 742–749. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1672>.
- (179) O’Sullivan Paul; Sharples, K.; Dalphin, M.; Davidson, P.; Gilling, P.; Cambridge, L.; Harvey, J.; Toro, T.; Giles, N.; Luxmanan, C.; Alves, C. F.; Yoon, H.-S.; Hinder, V.; Masters, J.; Kennedy, -Smith Andrew; Beaven, T.; Guilford, P. J. A Multigene Urine Test for the Detection and Stratification of Bladder Cancer in Patients Presenting with Hematuria. *Journal of Urology* **2012**, *188* (3), 741–747. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.05.003>.
- (180) Miyake, M.; Owari, T.; Hori, S.; Nakai, Y.; Fujimoto, K. Emerging Biomarkers for the Diagnosis and Monitoring of Urothelial Carcinoma. *Res Rep Urol* **2018**, *10*, 251–261. <https://doi.org/10.2147/RRU.S173027>.
- (181) Darling, D.; Luxmanan, C.; O’Sullivan, P.; Lough, T.; Suttie, J. Clinical Utility of Cxbladder for the Diagnosis of Urothelial Carcinoma. *Adv Ther* **2017**, *34* (5), 1087–1096. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0518-7>.
- (182) McClintock, G.; Wong, E.; Mancuso, P.; Lalak, N.; Gassner, P.; Haghighi, K.; Rathore, P.; McAulay, L.; Jeffery, N. Music during Flexible Cystoscopy for Pain and Anxiety - a Patient-Blinded Randomised Control Trial. *BJU Int* **2021**, *128* Suppl 1, 27–32. <https://doi.org/10.1111/bju.15527>.
- (183) Schrag, D.; Hsieh, L. J.; Rabbani, F.; Bach, P. B.; Herr, H.; Begg, C. B. Adherence to Surveillance among Patients with Superficial Bladder Cancer. *J Natl Cancer Inst* **2003**, *95* (8), 588–597. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.8.588>.
- (184) Steenkeste, K.; Lécart, S.; Deniset, A.; Pernot, P.; Eschwège, P.; Ferlicot, S.; Lévêque-Fort, S.; Briandet, R.; Fontaine-Aupart, M.-P. Ex Vivo Fluorescence Imaging of Normal and Malignant Urothelial Cells to Enhance Early Diagnosis. *Photochem Photobiol* **2007**, *83* (5), 1157–1166. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00079.x>.

- (185) Olivo, M.; Lau, W.; Manivasager, V.; Bhuvanewari, R.; Wei, Z.; Soo, K. C.; Cheng, C.; Tan, P. H. Novel Photodynamic Diagnosis of Bladder Cancer: Ex Vivo Fluorescence Cytology Using Hypericin. *Int J Oncol* **2003**, *23* (6), 1501–1504.
- (186) Tauber, S.; Schneede, P.; Liedl, B.; Liesmann, F.; Zaak, D.; Hofstetter, A. Fluorescence Cytology of the Urinary Bladder. *Urology* **2003**, *61* (5), 1067–1071. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(02\)02554-2](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(02)02554-2).
- (187) Fabre, M.; Ferlicot, S.; Fontaine Aupart, M.-P.; Steenkeste, K.; Eschwege, P. Method of Detecting Tumour Cells by Fluorescence Signals, January 6, 2011.
- (188) Alsibai, K. D.; Daste, G.; Ferlicot, S.; Fabre, M.; Steenkeste, K.; Salleron, J.; Hammoudi, Y.; Fontaine-Aupart, M.-P.; Eschwege, P. Fluorescence Emitted by Papanicolaou-Stained Urothelial Cells Improves Sensitivity of Urinary Conventional Cytology for Detection of Urothelial Tumors. *World J Oncol* **2020**, *11* (5), 204–215. <https://doi.org/10.14740/wjon1305>.
- (189) Southgate, J.; Harnden, P.; Trejdosiewicz, L. K. Cytokeratin Expression Patterns in Normal and Malignant Urothelium: A Review of the Biological and Diagnostic Implications. *Histol Histopathol* **1999**, *14* (2), 657–664. <https://doi.org/10.14670/HH-14.657>.
- (190) Mujyambere, B.; Jayaraj, R.; Ramalingam, S. Cytokeratin 19 (CK19) as a Marker for Epithelial Differentiation and Malignant Transformation: Its Clinical Relevance in Diagnosis, Prognosis and Treatment Response Monitoring. **2018**.
- (191) Wu, X.-R.; Kong, X.-P.; Pellicer, A.; Kreibich, G.; Sun, T.-T. Uroplakins in Urothelial Biology, Function, and Disease. *Kidney International* **2009**, *75* (11), 1153–1165. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.73>.
- (192) Szymańska, B.; Matuszewski, M.; Dembowski, J.; Piwowar, A. Initial Evaluation of Uroplakins UPIIIa and UPII in Selected Benign Urological Diseases. *Biomolecules* **2021**, *11* (12), 1816. <https://doi.org/10.3390/biom11121816>.
- (193) Georgopoulos, N. T.; Kirkwood, L. A.; Varley, C. L.; MacLaine, N. J.; Aziz, N.; Southgate, J. Immortalisation of Normal Human Urothelial Cells Compromises Differentiation Capacity. *European Urology* **2011**, *60* (1), 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.02.022>.
- (194) Richters, A.; Aben, K. K. H.; Kiemeny, L. A. L. M. The Global Burden of Urinary Bladder Cancer: An Update. *World J Urol* **2020**, *38* (8), 1895–1904. <https://doi.org/10.1007/s00345-019-02984-4>.
- (195) Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Fuchs, H. E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2021**, *71* (1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>.
- (196) Birkó, Z.; Nagy, B.; Klekner, Á.; Virga, J. Novel Molecular Markers in Glioblastoma-Benefits of Liquid Biopsy. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (20), E7522. <https://doi.org/10.3390/ijms21207522>.
- (197) Pisapia, P.; Malapelle, U.; Troncione, G. Liquid Biopsy and Lung Cancer. *Acta Cytol* **2019**, *63* (6), 489–496. <https://doi.org/10.1159/000492710>.
- (198) Alimirzaie, S.; Bagherzadeh, M.; Akbari, M. R. Liquid Biopsy in Breast Cancer: A Comprehensive Review. *Clin Genet* **2019**, *95* (6), 643–660. <https://doi.org/10.1111/cge.13514>.
- (199) Ng, K.; Stenzl, A.; Sharma, A.; Vasdev, N. Urinary Biomarkers in Bladder Cancer: A Review of the Current Landscape and Future Directions. *Urol Oncol* **2021**, *39* (1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2020.08.016>.
- (200) Poropatich, K.; Yang, J. C.; Goyal, R.; Parini, V.; Yang, X. J. Nuclear Size Measurement for Distinguishing Urothelial Carcinomas from Reactive Urothelium on Tissue Sections. *Diagn Pathol* **2016**, *11*, 57. <https://doi.org/10.1186/s13000-016-0501-7>.
- (201) McCart, E. A.; Thangapazham, R. L.; Lombardini, E. D.; Mog, S. R.; Panganiban, R. A. M.; Dickson, K. M.; Mansur, R. A.; Nagy, V.; Kim, S.-Y.; Selwyn, R.; Landauer, M. R.; Darling, T. N.; Day, R. M. Accelerated Senescence in Skin in a Murine Model of Radiation-Induced Multi-Organ Injury. *J Radiat Res* **2017**, *58* (5), 636–646. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrx008>.
- (202) Veranič, P.; Jezernik, K. Succession of Events in Desquamation of Superficial Urothelial Cells as a Response to Stress Induced by Prolonged Constant Illumination. *Tissue and Cell* **2001**, *33* (3), 280–285. <https://doi.org/10.1054/tice.2001.0175>.

- (203) Malagobadan, S.; Nagoor, N. H. Anoikis. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2017; p B9780128012383650000. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65021-3>.
- (204) Bailey, R. W.; Nguyen, T.; Robertson, L.; Gibbons, E.; Nelson, J.; Christensen, R. E.; Bell, J. P.; Judd, A. M.; Bell, J. D. Sequence of Physical Changes to the Cell Membrane During Glucocorticoid-Induced Apoptosis in S49 Lymphoma Cells. *Biophys J* **2009**, *96* (7), 2709–2718. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3925>.
- (205) Simpson, C. D.; Anyiwe, K.; Schimmer, A. D. Anoikis Resistance and Tumor Metastasis. *Cancer Lett* **2008**, *272* (2), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.029>.
- (206) Terasaki, M.; Maeda, H.; Miyashita, K.; Mutoh, M. Induction of Anoikis in Human Colorectal Cancer Cells by Fucoxanthinol. *Nutrition and Cancer* **2017**, *69* (7), 1043–1052. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1339814>.
- (207) Furse, S.; de Kroon, A. I. P. M. Phosphatidylcholine's Functions beyond That of a Membrane Brick. *Molecular Membrane Biology* **2015**, *32* (4), 117–119. <https://doi.org/10.3109/09687688.2015.1066894>.
- (208) Timson, J. Hydroxyurea. *Mutat Res* **1975**, *32* (2), 115–132. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(75\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0165-1110(75)90002-0).
- (209) Cohen, P. T. W.; Cohen, P. Discovery of a Protein Phosphatase Activity Encoded in the Genome of Bacteriophage λ . Probable Identity with Open Reading Frame 221. *Biochemical Journal* **1989**, *260* (3), 931–934. <https://doi.org/10.1042/bj2600931>.
- (210) Bridges, J. W.; Creaven, P. J.; Williams, R. T. The Fluorescence of Some Biphenyl Derivatives. *Biochem J* **1965**, *96* (3), 872–878. <https://doi.org/10.1042/bj0960872>.
- (211) Kang, J.-W.; Lee, D.-S.; Park, H.-D.; Park, Y.-S.; Kim, J. W.; Jeong, W.-I.; Yoo, K.-M.; Go, K.; Kim, S.-H.; Kim, J.-J. Silane- and Triazine-Containing Hole and Exciton Blocking Material for High-Efficiency Phosphorescent Organic Light Emitting Diodes. *Journal of Materials Chemistry* **2007**, *17*, 3714. <https://doi.org/10.1039/b705741e>.
- (212) Li, S.-Y.; Hui, Y.-J.; Sun, Z.-B.; Zhao, C.-H. A Triarylborane-Based Biphenyl Exhibiting Abrupt Fluorescence Enhancement at a Specific High Temperature. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (24), 3446–3449. <https://doi.org/10.1039/C6CC10088K>.
- (213) Hannon, G. J. RNA Interference. *Nature* **2002**, *418* (6894), 244–251. <https://doi.org/10.1038/418244a>.
- (214) Colletier, J. P.; Chaize, B.; Winterhalter, M.; Fournier, D. Protein Encapsulation in Liposomes: Efficiency Depends on Interactions between Protein and Phospholipid Bilayer. *BMC Biotechnology* **2002**, *2*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-2-9>.
- (215) Shariat, S.; Badiiee, A.; Jaafari, M. R.; Mortazavi, S. A. Optimization of a Method to Prepare Liposomes Containing HER2/Neu- Derived Peptide as a Vaccine Delivery System for Breast Cancer. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR* **2014**, *13* (November 2013), 15–25.

Titre : Caractérisation du phénomène de fluorescence périmembranaire permettant la mise en évidence des cellules urothéliales tumorales dans les urines dans la méthode exploitée par VitaDX

Mots clés : Cancer de la vessie ; Fluorescence ; urine ; cytologie urinaire ; fluorescence périmembranaire ; biopsie liquide

Résumé : Pour détecter le cancer de la vessie (CV), la cytologie urinaire et la cystoscopie sont les premiers tests diagnostiques utilisés. La cytologie urinaire est non invasive, facile à collecter, avec une sensibilité moyenne et une spécificité élevée. C'est un moyen efficace de détecter les CV de haut grade, mais elle est moins efficace sur ceux de bas grade. Récemment, les propriétés fluorescentes des membranes plasmiques des cellules tumorales urothéliales, appelées fluorescence périmembranaire (FPM), trouvées dans la cytologie urinaire, se sont avérées être d'une utilité potentielle pour améliorer la détection précoce du CV. L'objectif principal de cette thèse a été de caractériser la FPM permettant la détection des cellules tumorales urothéliales dans l'urine.

Durant ces travaux nous nous sommes intéressés au rôle que joue la caractéristique morphologique de la cellule urothéliale tumorale dans la FPM. Nous avons ensuite essayé de trouver un modèle de lignées cellulaire qui ne présentait pas de FPM dans l'objectif de cribler sa composition protéique et lipidique avec notre modèle du CV. Pour analyser de façon précise la moindre fluctuation de fluorescence, un logiciel de quantification de la FPM a été mis en place. Ne parvenant pas à trouver de lignées sans FPM, nous avons analysé la FPM des cellules urothéliales récupérées dans les urines de rat avec celles récupérées directement dans l'urothélium de rat. En constatant une différence de FPM en fonction d'où les cellules ont été récupérées, nous avons voulu déterminer quel phénomène cellulaire pouvait intervenir dans la modification de la FPM quand la cellule urothéliale passe de l'urothélium aux urines.

Les résultats obtenus ont donc permis de mieux comprendre et caractériser le phénomène de FPM. En vue de nos résultats, nous suggérons que la forte résistance des cellules tumorales aux agressions extérieures leur permet de mieux survivre dans les urines, contrairement aux cellules saines qui, une fois en suspension, sont plus sensibles à ces agressions responsables de la perte de leur FPM

Title: Characterization of the perimembrane fluorescence phenomenon allowing the detection of urothelial tumor cells in urine in the method performed by VitaDX

Keywords: Bladder cancer; Fluorescence; urine; urine cytology; perimembrane fluorescence; liquid biopsy

Abstract: To detect bladder cancer (BC), urine cytology and cystoscopy are the primary diagnostic tests used. Urine cytology is noninvasive, easy to collect, with moderate sensitivity and high specificity. It is an effective way to detect high-grade BCs, but it is less effective on low-grade ones. Recently, the fluorescent properties of plasma membranes of urothelial tumor cells, called perimembrane fluorescence (PMF), found in urine cytology, have been shown to be of potential use in improving early detection of BC. The main objective of this thesis was to characterize PMF for the detection of urothelial tumor cells in urine.

During this work we were interested in the role that the morphological characteristic of the urothelial tumor cell plays in the PMF. We then tried to find a cell line model that did not show PMF in order to screen its protein and lipid composition with our BC model. To accurately analyze the slightest fluctuation in fluorescence, a PMF quantification software was implemented. Failing to find lines without PMF, we analyzed the PMF of urothelial cells recovered from rat urine with those recovered directly from rat urothelium. Noting a difference in PMF depending on where the cells were recovered, we wanted to determine what cellular phenomenon might be involved in the change in PMF when the urothelial cell moves from urothelium to urine.

The results obtained thus allowed us to better understand and characterize the PMF phenomenon. In view of our results, we suggest that the strong resistance of tumor cells to external aggression allow them to survive better in urine, contrary to healthy cells which, once in suspension, are more sensitive to these aggressions responsible for the loss of their PMF.