

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

Année 2012

N°

**Etude prospective mono-centrique:  
Analyse et corrélation de la réaction  
immunologique locale et systémique induite par  
des instillations endo-vésicales de BCG  
(Bacille de Calmette et Guérin) dans le  
traitement du cancer de la vessie**

**THESE**

pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN SCIENCES**

Présentée par

**Jérôme RIGAUD**

Né le 05 Novembre 1972 à Guérande (44)

Soutenue publiquement le

Mardi 18 Septembre 2012 à 15h00

Président du jury : Marc BONNEVILLE

Directeur de thèse : Emmanuel SCOTET

Rapporteurs de thèse : Jacques IRANI  
Christian PFISTER

Membres du jury : Olivier BOUCHOT  
Daniel OLIVE

# **Etude prospective mono-centrique: Analyse et corrélation de la réaction immunologique locale et systémique induite par des instillations endo-vésicales de BCG (Bacille de Calmette et Guérin) dans le traitement du cancer de la vessie**

## **Résumé**

Le traitement des tumeurs de vessie non infiltrant le muscle (TVNIM) à haut risque est une résection endoscopique suivi d'un traitement par instillations endo-vésicales de Bacille de Calmette et Guérin (BCG) pour limiter le risque de récurrence ou de progression.

Le mécanisme d'action du BCG est multifactoriel mais reste toujours mal précisé. En effet on ne sait pas si la cytotoxicité induite par le BCG est une cytotoxicité spécifique dirigée contre des antigènes bactériens ou des antigènes tumoraux ou complètement aspécifique du fait d'une réponse immunitaire large. Il se produit dans un premier temps une réaction inflammatoire puis se développe une réaction immunitaire de type TH1 avec production de lymphocytes T CD4+ prédominante et une production de cytokines. L'efficacité du traitement dépend de la tumeur mais également de la capacité du patient à développer une réponse immunitaire au BCG.

L'objectif principal de notre étude a été de déterminer une corrélation entre la production des cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL 17, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) et la réponse au traitement par instillation de BCG. Nous avons mis en évidence qu'il existait une réaction locale suite aux instillations de BCG avec une production de cytokines urinaires qui a été variable durant le traitement. La production la plus importante a été lors de la 4<sup>ème</sup> heure après la 6<sup>ème</sup> instillation (J42H4), avec auparavant des productions qui ont été faibles. Il a existé une corrélation entre la production des cytokines à J21H4 et celle à J42H4 pour l'IL-2, IL-4, IL-6 et IL-10. De plus il semble exister des profils différents de production des cytokines durant le traitement que ce soit pour la combinaison IL-2/IL-6 en cours de traitement ou les profils à la fin du traitement (J42H4). Par contre l'analyse entre ces profils de sécrétion des cytokines et la réponse au traitement par BCG n'a pas mis en évidence de corrélation significative. Mais une tendance a été observée dans le groupe en échec ou récurrence après traitement avec : un taux élevé d'IL-6 avant le traitement évoluant vers une diminution des dosages réalisés avant les instillations à H0, un faible taux d'IL-2 évoluant peu sous traitement, une absence de sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL17, un pic faible de sécrétion des cytokines à J42H4

L'intérêt d'établir un tel profil à la fois de sécrétion des cytokines au cours du traitement par BCG et d'établir à la fin du traitement le type d'infiltration lympho-macrocytaire dans la paroi vésicale induit par ces instillations, peut permettre, pour l'avenir, de faire un traitement à la carte aux patients en fonction de cette réponse induite. Tout ceci amène donc à développer une approche thérapeutique individuelle au cas par cas.

**Mots-clés :** Vessie, Cancer, BCG (Bacille de Calmette et Guérin), Cytokine, Lymphocyte

## **Prospective mono-center study: analysis and correlation of local and systemic immune response induced by intravesical instillations of BCG (Bacille Calmette-Guerin) in the treatment of bladder cancer**

### **Summary**

The treatment of non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) at high-risk is endoscopic resection followed by intravesical instillations of bacillus Calmette-Guerin (BCG) to limit the risk of recurrence or progression.

The mechanism of action of BCG is multifactorial but remains poorly explained. Indeed it is unclear whether the BCG-induced cytotoxicity is a specific cytotoxicity directed against bacterial antigens or tumor antigens or completely due to a nonspecific immune response. It occurs initially an inflammatory reaction and then develops a predominant immune response TH1 with production of CD4 + T cells and cytokines. The effectiveness of treatment depends on the tumor but also the patient's ability to develop an immune response to BCG.

The main objective of our study was to determine a correlation between cytokine production (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL 17, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and response to BCG instillation. We have demonstrated that there was a local reaction following BCG instillation with a urinary cytokines production was variable during treatment. The largest production was in the fourth hour after the sixth instillation (D42H4), with earlier productions that have been low. There was a correlation between cytokines production at D21H4 and D42H4 for IL-2, IL-4, IL-6 and IL-10. Also there appear different profiles of cytokines production during treatment whether for the combination IL-2/IL-6 during treatment or profiles at the end of treatment (D42H4). Against by the analysis of these cytokine secretion profiles and response to treatment with BCG did not show significant correlation. But a trend was observed in the group failed or recurrence after treatment with: a high level of IL-6 before treatment moving towards a reduction assays performed before the instillations at H0, low levels of IL-2 evolving little during treatment, a lack of secretion of IFN- $\gamma$  and IL-17, a low peak of cytokine secretion at D42H4.

The value of establishing such profiles of cytokines secretion during treatment with BCG and the type of lymphocytic infiltration in the bladder wall induced by these instillations can help for the future, to give a specific treatment for each patient in terms of his induced response. These approaches could permit to develop an individual treatment case by case.

**Keys words :** Bladder, Cancer, BCG (Bacille de Calmette et Guérin), Cytokine, Lymphocyte

# SOMMAIRE

|          |                                                                    |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>PRE-REQUIS.....</b>                                             | <b>10</b> |
| 1.1      | DIPLOME D'ÉTUDES APPROFONDIES (DEA) .....                          | 10        |
| 1.2      | ENCADREMENT DE TRAVAUX SCIENTIFIQUES .....                         | 13        |
| 1.3      | PROTOCOLES DE RECHERCHE CLINIQUE .....                             | 15        |
| <b>2</b> | <b>INTRODUCTION.....</b>                                           | <b>17</b> |
| 2.1      | EPIDEMIOLOGIE .....                                                | 17        |
| 2.2      | TRAITEMENT DES TVNIM.....                                          | 18        |
| 2.3      | INSTILLATION ENDO-VESICALE DE BCG .....                            | 19        |
| 2.3.1    | <i>Modalités de traitement de BCG.....</i>                         | <i>19</i> |
| 2.3.2    | <i>Résultats du traitement par instillation de BCG.....</i>        | <i>20</i> |
| 2.3.3    | <i>Effets secondaires du traitement par BCG .....</i>              | <i>21</i> |
| 2.4      | MECANISME D'ACTION DU BCG.....                                     | 22        |
| 2.4.1    | <i>Souches de BCG.....</i>                                         | <i>23</i> |
| 2.4.2    | <i>Choix de la souche thérapeutique de BCG .....</i>               | <i>24</i> |
| 2.4.3    | <i>Adhésion et internalisation bactérienne .....</i>               | <i>24</i> |
| 2.4.4    | <i>Présentation antigénique.....</i>                               | <i>26</i> |
| 2.4.5    | <i>Cytotoxicité anti-tumorale : les cellules cytotoxiques.....</i> | <i>28</i> |
| 2.4.6    | <i>Cytotoxicité anti-tumorale : les cytokines.....</i>             | <i>33</i> |
| 2.4.7    | <i>Résumé du mécanisme d'action .....</i>                          | <i>41</i> |
| <b>3</b> | <b>OBJECTIFS .....</b>                                             | <b>43</b> |
| 3.1      | HYPOTHESE DE TRAVAIL.....                                          | 43        |
| 3.2      | OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....                                          | 44        |
| 3.2.1    | <i>Objectif principal.....</i>                                     | <i>44</i> |
| 3.2.2    | <i>Objectifs secondaires .....</i>                                 | <i>44</i> |
| <b>4</b> | <b>MATERIEL ET METHODES .....</b>                                  | <b>46</b> |
| 4.1      | DEROULEMENT DE L'ÉTUDE .....                                       | 46        |
| 4.2      | CRITERES D'INCLUSION ET D'EXCLUSION .....                          | 48        |
| 4.2.1    | <i>Critères d'inclusion.....</i>                                   | <i>48</i> |
| 4.2.2    | <i>Critères d'exclusion .....</i>                                  | <i>48</i> |
| 4.3      | POPULATION .....                                                   | 49        |
| 4.4      | ANTECEDENTS DE TUMEUR UROTHELIALE .....                            | 49        |
| 4.5      | TUMEUR DE VESSIE .....                                             | 50        |

|          |                                                                                             |            |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.5.1    | <i>1<sup>ère</sup> résection de tumeur de vessie</i>                                        | 50         |
| 4.5.2    | <i>Type histologique de la 1<sup>ère</sup> résection</i>                                    | 50         |
| 4.5.3    | <i>2<sup>ème</sup> résection de tumeur de vessie</i>                                        | 51         |
| 4.5.4    | <i>Type histologique de la 2<sup>ème</sup> résection</i>                                    | 51         |
| 4.6      | TRAITEMENT PAR INSTILLATIONS DE BCG                                                         | 51         |
| 4.7      | CONTROLE DES PATIENTS A LA FIN DU BCG                                                       | 52         |
| 4.8      | SUIVI DES PATIENTS APRES LE BCG                                                             | 53         |
| 4.8.1    | <i>Patients en échec d'emblée du BCG (réfractaire)</i>                                      | 54         |
| 4.8.2    | <i>Suivi à moyen terme</i>                                                                  | 54         |
| 4.9      | PRELEVEMENTS SANG ET URINE                                                                  | 55         |
| 4.10     | RECUPERATION ET CONGELATION DES PBMC                                                        | 56         |
| 4.11     | MARQUAGE DES PBMC ET ANALYSE AU FACS CANTO                                                  | 59         |
| 4.12     | MARQUAGE DES CYTOKINES ET ANALYSE AU FACS ARRAYS                                            | 63         |
| 4.13     | ANALYSES STATISTIQUES                                                                       | 67         |
| <b>5</b> | <b>RESULTATS</b>                                                                            | <b>69</b>  |
| 5.1      | ANALYSE DES CYTOKINES                                                                       | 69         |
| 5.1.1    | <i>Analyse des cytokines urinaires pour l'ensemble de la population</i>                     | 70         |
| 5.1.2    | <i>Analyse de corrélation de la production des cytokines</i>                                | 78         |
| 5.1.3    | <i>Analyse des cytokines urinaires en fonction de la réponse au BCG</i>                     | 80         |
| 5.1.4    | <i>Profils de sécrétion des cytokines urinaires par patient</i>                             | 86         |
| 5.1.5    | <i>Profils de sécrétion des cytokines urinaires à J42H4</i>                                 | 87         |
| 5.1.6    | <i>Profils de sécrétion des cytokines urinaires en fonction de la réponse au traitement</i> | 90         |
| 5.1.7    | <i>Résumé de l'analyse des cytokines urinaires</i>                                          | 91         |
| 5.2      | ANALYSE DES PBMC                                                                            | 92         |
| 5.2.1    | <i>Interprétation du marquage des PBMC</i>                                                  | 92         |
| 5.2.2    | <i>Analyse des PBMC pour l'ensemble de la population</i>                                    | 95         |
| 5.3      | PHENOTYPAGE DE L'INFILTRATION LYMPHO-MACROCYTAIRE DES TUMEURS DE VESSIE                     | 98         |
| 5.3.1    | <i>Objectif et population</i>                                                               | 98         |
| 5.3.2    | <i>Marquages</i>                                                                            | 98         |
| 5.3.3    | <i>Résultats de l'infiltration lympho-macrocytaire</i>                                      | 100        |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSION</b>                                                                           | <b>103</b> |
| 6.1      | AUTO-CRITIQUES                                                                              | 103        |
| 6.2      | PRODUCTION DES CYTOKINES                                                                    | 104        |
| 6.2.1    | <i>Interleukine-2 (IL-2)</i>                                                                | 105        |
| 6.2.2    | <i>Interleukine-6 (IL-6)</i>                                                                | 106        |
| 6.2.3    | <i>Interféron <math>\gamma</math> (IFN-<math>\gamma</math>)</i>                             | 107        |
| 6.2.4    | <i>Vision globale des cytokines urinaires</i>                                               | 107        |

|       |                                                                    |     |
|-------|--------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.3   | ANALYSE DES PBMC .....                                             | 110 |
| 6.3.1 | <i>Lymphocytes T <math>\alpha\beta</math> (CD4+ et CD8+)</i> ..... | 111 |
| 6.3.2 | <i>Lymphocytes T <math>\gamma\delta</math></i> .....               | 112 |
| 7     | <b>CONCLUSIONS</b> .....                                           | 116 |
| 8     | <b>PERSPECTIVES</b> .....                                          | 119 |
| 8.1   | PUBLICATIONS .....                                                 | 119 |
| 8.2   | AXES DE RECHERCHE .....                                            | 119 |
| 9     | <b>REFERENCES</b> .....                                            | 122 |

# PRE-REQUIS

# 1 PRE-REQUIS

## 1.1 DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES (DEA)

L'axe de recherche sur le cancer de la vessie a été initié lors de l'obtention d'un **Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) Sciences chirurgicales option Cancérologie** réalisé dans le laboratoire d'Uro-Oncologie Expérimentale du Pr Yves FRADET au Centre de recherche en Cancérologie de l'Université Laval, CHUQ-L'Hôtel-Dieu de Québec (Canada) de Novembre 2001 à Novembre 2002.

Cette année de recherche a été financée par des bourses : Bourse de l'Association Française d'Urologie (Lauréat de la bourse AFU-MSD, Novembre 2000) ; Bourse du Ministère des Affaires Etrangères (Lauréat de la bourse LAVOISIER du Ministère des Affaires Etrangères, Novembre 2001) ; Bourse du Conseil Régional des Pays de Loire (Lauréat du programme TOPINTERNATIONAL, Novembre 2001)

Durant cette année, plusieurs projets ont été menés :

- 1- **Une étude sur la validation de la technique de "Tissue-microarrays" dans le cancer infiltrant de la vessie.** Le but de cette étude a été d'évaluer la fiabilité de la technique du "tissue-microarrays" pour l'étude immunohistochimique des marqueurs tumoraux dans le cancer infiltrant de la vessie. A partir d'une banque de tumeurs infiltrantes de vessie (stade pT2 et plus) comprenant 267 échantillons, nous avons inclus la quasi totalité des blocs sous forme de "tissue-microarrays". Les marqueurs tumoraux associés au cycle cellulaire p53, p27<sup>kip1</sup>, p21<sup>WAF-1</sup> et Cycline E ont été analysés par immunohistochimie à la fois sur les lames de "tissue-microarrays" et sur les sections entières provenant des blocs originaux. L'expression positive ou négative de chacun des marqueurs a été comparée entre les lames de section standards et les lames de "tissue-microarrays". La corrélation de l'expression des marqueurs tumoraux entre les lames de section standards et les lames de "tissue-microarrays" a été évaluée à plus de 92% pour l'ensemble des 4

marqueurs. Les discordances ont été attribuées principalement à l'hétérogénéité des tumeurs.

Ce projet de recherche a abouti à plusieurs publications internationales et nationales:

- **Rigaud J**, Tiguert R, Fradet Y ; Marqueurs moléculaires du cancer infiltrant de la vessie, Progrès en Urologie (Rapport 2002), Novembre 2002, 12 (5), 1057-1083
- Margulis V, Lotan Y, Karakiewicz PI, Fradet Y, Ashfaq R, Capitanio U, Montorsi F, Bastian PJ, Nielsen ME, Muller SC, **Rigaud J**, Heukamp LC, Netto G, Lerner SP, Sagalowsky AI, Shariat SF ; Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer, Journal of the National Cancer Institute, January 2009, 101 (2), 114-119
- Shariat SF, Bolenz C, Godoy G, Fradet Y, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Isbarn H, Jeldres C, **Rigaud J**, Sagalowsky AI, Lotan Y; Predictive value of combined immunohistochemical markers in patients with pT1 urothelial carcinoma at radical cystectomy, Journal of Urology, July 2009, 182 (1), 78-84; discussion 84
- Shariat SF, Bolenz C, Karakiewicz PI, Fradet Y, Ashfaq R, Bastian PJ, Nielsen ME, Capitanio U, Jeldres C, **Rigaud J**, Müller SC, Lerner SP, Montorsi F, Sagalowsky AI, Cote RJ, Lotan Y; p53 expression in patients with advanced urothelial cancer of the urinary bladder, BJU International, February 2010, 105 (4), 489-495

**2- Une étude par PCR radioactive analysant les pertes d'hétérozygotie de marqueurs microsatellites de la région chromosomique 9q12 dans le cancer superficiel de la vessie.** Le but de cette étude a été de déterminer le pourcentage de perte d'hétérozygotie de 12 marqueurs microsatellites de la région 9q12-q22.31 chez 139 patients ayant une tumeur superficielle de la vessie (stade pTa ou pT1). Les conclusions ont été que le pourcentage élevé de perte d'hétérozygotie et les pertes uniques d'hétérozygotie pour des patients atteints d'un cancer superficiel de la vessie font suspecter la présence de gènes suppresseurs de tumeurs à proximité des marqueurs D9S1843 et D9S167. Ces deux derniers sont localisés en 9q22.1 et

compris entre 92426 et 92800 mégabases. Il existe dans cette région 2 gènes d'intérêt: C2GNT (ou GCNT1) et GAS1. Ce dernier est en particulier un gène suppresseur de tumeurs ayant déjà été évoqué dans le cancer de la vessie.

Ce projet de recherche n'a pas abouti à une publication.

**3- Une étude immunohistochimique des marqueurs p21, p27 et p53 chez des patients ayant reçu une radiothérapie de sauvetage après prostatectomie radicale dans le cancer de la prostate.** Le but de cette étude a été d'évaluer la valeur prédictive de l'expression des protéines p53, p21<sup>WAF1</sup> et p27<sup>kip1</sup> analysés par immunohistochimie sur les pièces de prostatectomie radicales chez 74 patients ayant échoué à cette prostatectomie radicale pour un cancer de la prostate sans métastases ganglionnaires. Suite à la récurrence biologique, ils ont tous eu une radiothérapie externe de rattrapage associée à une hormonothérapie néo-adjuvante d'une durée de 3 mois. Les résultats ont montré qu'une surexpression de p21<sup>WAF1</sup> a été un facteur prédictif de récurrence biologique précoce (p=0,03) défini par une élévation du taux de PSA. En étude multivariée seule la surexpression de p21<sup>WAF1</sup> et un taux de PSA > 1 ng/ml avant la RTE ont été des facteurs de mauvais pronostiques sur la survie sans récurrence biologique. Par conséquent la conclusion a été que l'expression de la protéine p21<sup>WAF1</sup> s'est avérée être un facteur pronostique important de la réponse à une radiothérapie de rattrapage après PR.

Ce projet de recherche a abouti à deux publications internationales :

- **Rigaud J**, Tiguert R, Decobert M, Hovington H, Latulippe E, Laverdiere J, Larue H, Lacombe L, Fradet Y; Expression of p21 cell-cycle protein is an independent predictor of response to salvage radiotherapy after radical prostatectomy, *The Prostate*, February 2004, 58 (3), 269-276
- Tiguert R, **Rigaud J**, Lacombe L, Laverdière J, Fradet Y; Neoadjuvant hormone therapy before salvage radiotherapy for an increasing post-radical prostatectomy serum prostate specific antigen level, *Journal of Urology*, August 2003, 170 (2), 447-450

## 1.2 ENCADREMENT DE TRAVAUX SCIENTIFIQUES

Depuis ces premiers travaux sur le cancer de la vessie, différents travaux axés sur les cancers urothéliaux ont été encadrés pour l'obtention d'une thèse de docteur en médecine associé à des publications :

### 1- Cystectomie totale pour cancer de vessie: mortalité, morbidité et résultats carcinologiques (Guillaume BRAUD, soutenue le 09 juin 2005)

- Braud G, Battisti S, Karam G, Bouchot O, **Rigaud J** ; Valeur pronostique du curage ganglionnaire lors des cystectomies totales pour cancer de la vessie, Progrès en Urologie, Juin 2008, 18 (6), 351-357
- Braud G, Battisti S, Maillet F, Bouchot O, **Rigaud J** ; Mortalité et morbidité des cystectomies totales pour cancer de la vessie chez les patients de plus de 75 ans, Progrès en Urologie, Décembre 2008, 18(13), 1062-1067
- Hitier M, Marconnet L, Luyckx F, Branchereau J, Braud G, Karam G, Bouchot O, **Rigaud J** ; Facteurs prédictifs et résultats carcinologiques à long terme des patients n'ayant plus de tumeur résiduelle (stade pT0) sur la pièce de cystectomie totale réalisée pour cancer de vessie, Progrès en Urologie, Février 2010, 20 (2), 130-137
- Roupret M, Drouin S, Larré S, Neuzillet Y, Botto H, Hitier M, **Rigaud J**, Crew J, Xylinas E, Salomon L, Cornu JN, Iborra F, Champetier D, Rozet F, Flamand V, Bastide C, Cormier L, Durand X, Lunardi P, Rischmann P, Nouhaud FX, Ferlicot S, Patard JJ, Paule Floch A, Irani J, Peyronnet B, Bensalah K, Poissonnier L, Grès P, Droupy S, Casenave J, Wallerand H, Soulie M, Pfister C ; Oncologic outcomes and survival in pT0 tumours after radical cystectomy in patients without neoadjuvant chemotherapy : results from a large multicenter collaborative study, Annals of Surgical Oncology, December 2011, 18 (13), 3833-3838

- 2- Tumeurs urothéliales des voies excrétrices supérieures: Résultats carcinologiques d'une série de 130 patients (Brice MULLER, soutenue le 30 juin 2006)
- Müller B, Braud G, Tillou X, Karam G, Bouchot O, **Rigaud J** ; Résultats carcinologiques de la néphro-uretèrectomie totale comparant les voies d'abord: laparoscopique et chirurgicale ouverte, Progrès en Urologie, Décembre 2007, 17 (7), 1328-1332
- 3- Les tumeurs urothéliales de vessie de stade pT1 de haut grade: Résultats oncologiques en fonction de la prise en charge (Julien BRANCHEREAU, soutenue le 22 octobre 2010)
- Branchereau J, Larue S, Fontaine-Poitrineau C, Vayleux B, Karam G, Bouchot O, **Rigaud J**; Prognostic value of the lymphovascular invasion in high-grade stage pT1 bladder cancer, Journal of Urology, *en cours de soumission*
  - Branchereau J, Larue S, Fontaine-Poitrineau C, Vayleux B, Karam G, Bouchot O, **Rigaud J** ; Les tumeurs de vessie de stade pT1 de haut grade en 2012 : BCG-thérapie ou cystectomie ? Progrès en Urologie, *en cours de soumission*
- 4- Evaluation de la Tomographie par Emission de Positrons au 18 Fluoro-Deoxy-Glucose couplée au scanner (TEP-TDM) dans le bilan d'extension des cancers de vessie avant réalisation d'une cystectomie (Maryam HITIER-BERTHAULT, soutenue le 14 février 2011)
- Hitier-Berthault M, Ansquer C, Branchereau J, Renaudin K, Bodéré F, Bouchot O, **Rigaud J**; Prospective study evaluating 18F-FDG PET-CT for preoperative lymph node staging of bladder cancer treated by radical cystectomy, World Journal of Urology, *en cours de soumission*
- 5- Evaluation d'un auto-questionnaire de dépistage des cancers de vessie d'origine professionnelle : Une étude au CHU de Nantes (Sébastien MICHAUD, soutenue le 04 mai 2012)

## 1.3 PROTOCOLES DE RECHERCHE CLINIQUE

Dans le même temps, nous avons participé en tant qu'investigateur à différents protocoles de recherche clinique locaux ou nationaux sur le cancer de la vessie :

- 1- Evaluation de la tomographie par émission de positons au 18 fluoro-déoxy-glucose (TEP au 18FDG) dans le bilan d'extension des cancers de la vessie avant réalisation d'une cystectomie. (Etude prospective monocentrique non randomisée évaluant une nouvelle approche diagnostique ; investigateur-coordonateur : Jérôme RIGAUD (Nantes))
- 2- Evaluation du traitement d'entretien par instillations endovésicales de BCG dans les tumeurs de vessie URO-BCG4. (Etude prospective de phase III, randomisée, multicentrique, avec bénéfice individuel direct ; PHRC Régional ; coordinateur le Pr Christian PFISTER (Rouen))
- 3- Evaluation prospective multicentrique d'une stratégie de préservation vésicale combinant chimiothérapie néo-adjuvante par MVAC (Méthotrexate, Vinblastine, Adriamicine, Cisplatine) et résection tumorale endovésicale optimale chez des patients présentant un cancer urothélial infiltrant de vessie de stade localisé. (Etude GETUG/AFU, protocole RECHIVE. Etude prospective ouverte, multicentrique, de phase II ; PHRC National ; Coordinateur les Dr Nicolas MOTTET (Saint Etienne) et Stéphane CULINE (Montpellier))

# INTRODUCTION

## 2 INTRODUCTION

### 2.1 EPIDEMIOLOGIE

Un carcinome vésical est diagnostiqué ou traité dans le monde chez 2,7 millions de personnes chaque année et dans la majorité des cas les tumeurs urothéliales apparaissent après 60 ans <sup>1</sup>. En France, cette pathologie occupe la 7<sup>ème</sup> place, tous cancers confondus (INVSS 2011) et constitue le second cancer urologique après celui de la prostate. L'incidence (nombre de nouveaux cas par an) estimée pour 2011 a été de 9081 cas chez l'homme et 1875 chez la femme, la mortalité a été de 3503 et 1171 respectivement. Le carcinome vésical est responsable de 3% des décès par cancer, son incidence est en augmentation d'environ 1% par an, mais sa mortalité spécifique semble diminuer chez l'homme.

Les facteurs de risque du cancer de la vessie sont essentiellement le tabac et des facteurs professionnels (amines aromatiques). Dans les pays occidentaux, le type histologique des cancers de la vessie est le plus souvent un carcinome urothélial. Le point de départ du cancer est situé au niveau de l'urothélium pour avoir ensuite une extension dans la paroi vésicale. Il est important de séparer deux types de tumeurs de vessie dont les pronostics et les traitements sont très différents: les tumeurs sans infiltration du muscle vésical (TVNIM) et les tumeurs avec infiltration du muscle vésical (TVIM).

Lors du diagnostic initial, 75 à 85% des tumeurs sont des TVNIM : 60 à 70 % des lésions récidiveront la première année et 10 à 20 % progresseront vers des tumeurs invasives et/ou métastatiques. La prévention des TVNIM repose sur la lutte contre les principaux facteurs de risque que sont le tabagisme et l'exposition professionnelle (carcinogènes chimiques).

## 2.2 TRAITEMENT DES TVNIM

Le traitement des TVNIM est le plus souvent conservateur avec une résection endoscopique trans-urétrale permettant une ablation complète de la lésion tumorale en conservant le réservoir vésical.

Parmi les TVNIM, le risque de récurrence et de progression est variable en fonction de certains groupes à risque établi par l'EORTC ([www.eortc.be/tools/bladdercalculator](http://www.eortc.be/tools/bladdercalculator)). Cette classification en trois groupes est basée sur les paramètres clinico-pathologiques suivant : grade, stade, taille de la tumeur, taux antérieur de récurrence, présence de CIS concomitant et nombre de tumeurs.<sup>2</sup> La classification à risque des TVNIM est représentée dans le tableau 1.

|                             |                                                                                                                    |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Risque faible</b>        | - Ta unique, bas grade ou LMP (grade 1) et diamètre < 3 cm et absence de récurrence tumorale                       |
| <b>Risque intermédiaire</b> | - Ta bas grade ou LMP (OMS 73) multifocal et/ou récurrente,<br>- T1 bas grade (grade 1-2)                          |
| <b>Risque élevé</b>         | - Ta haut grade (grade 2/3 et 3)<br>- T1 haut grade (grade 2/3 et 3) ou T1 récurrente<br>- CIS (carcinome in situ) |

Tableau 1 : Classification à risque des TVNIM (LMP : Low Malignancy Potential (tumeur à faible potentiel de malignité))

Pour diminuer le risque de récurrence ou de progression des TVNIM et en fonction de cette classification à risque, le geste de résection endoscopique peut être complété par des instillations endo-vésicale de mitomycine C (chimiothérapie) ou de Bacille de Calmette et Guérin (BCG) (immunothérapie).<sup>3</sup> Selon les recommandations de l'Association Française d'Urologie 2010 (AFU)<sup>4</sup>, les indications de prise en charge des TVNIM sont représentées dans le tableau 2.

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Risque faible</b>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Surveillance simple</li> <li>- Instillation post-opératoire précoce de mitomycine</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Risque intermédiaire</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Instillations hebdomadaires de mitomycine (MMC) sur 8 semaines consécutives après cicatrisation vésicale (4 à 6 semaines).</li> <li>- Le BCG peut être discuté en alternative aux instillations de MMC de première intention ou en cas d'échec du traitement par la mitomycine.</li> </ul>                                                                                                                                                                             |
| <b>Risque élevé</b>         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Instillations endovésicales de BCG (sauf contre-indications) après cicatrisation vésicale (4 à 6 semaines). Si les instillations de BCG sont bien supportées, intérêt d'un traitement d'entretien.</li> <li>- En cas d'échec du traitement par BCG, la cystectomie totale demeure le traitement de choix.</li> <li>- Après la RTUV, une cystectomie d'emblée peut être discutée en RCP dans certaines formes de mauvais pronostic chez des patients jeunes.</li> </ul> |

Tableau 2 : Indication de prise en charge des TVNIM en fonction de la classification à risque

## 2.3 INSTILLATION ENDO-VESICALE DE BCG

### 2.3.1 Modalités de traitement de BCG

Les instillations endo-vésicales de BCG sont donc indiquées essentiellement en cas de TVNIM à risque élevé. Ce traitement est débuté au moins 4 à 6 semaines après la dernière résection endoscopique et en cas d'absence d'hématurie macroscopique ou d'infection urinaire.

Il est recommandé avant de débiter un traitement par BCG:

- Eliminer les contre-indications
- Examen clinique
- ECBU stérile de moins de 4 jours
- Bilan sanguin
  - Numération sanguine
  - Ionogramme sanguin, urémie et créatininémie

- Bilan hépatique (ASAT, ALAT, Bilirubine libre et conjuguée,  $\gamma$ GT, Phosphatase alcalines)
- Dosage du PSA chez l'homme
- Radiographie de thorax de face
- Intra dermo-réaction (IDR) avec 10 unités de tuberculine (optionnel)

Le traitement d'attaque est de 6 instillations hebdomadaires (suivi d'un contrôle cytologique et endoscopique), complété par 3 instillations hebdomadaires après 6 semaines d'arrêt. La dose standard recommandée par la société Aventis Pasteur® qui commercialise le BCG est de 81mg (ImmuCyst®). Un traitement d'entretien par 3 instillations hebdomadaires complémentaires peut être proposé, en fonction de la réponse et de la tolérance, en diminuant éventuellement la dose de BCG (1/2 ou 1/3 de dose) pour une meilleure tolérance, à 6, 12, 18, 24, 30 et 36 mois. De nombreux protocoles ont été proposés mais le schéma thérapeutique optimum d'entretien des instillations de BCG demeure à définir.

### **2.3.2 Résultats du traitement par instillation de BCG**

Les deux problèmes majeurs des TVNIM sont la récurrence et la progression. D'une manière générale, plus le stade et le grade sont élevés plus le risque de récurrence et de progression est grand, mais pour chaque stade histologique (pTa ou pT1) le risque de récurrence et de progression dépend du grade. L'histoire naturelle de ces tumeurs montre que la progression à 5 ans varie en fonction du risque évolutif: elle est de 7,1% pour les faibles risques, 17,4% pour les risques intermédiaires et de 41,6% pour les hauts risques. De même le risque de décès par la tumeur à 10 ans est de 4,3% pour les risques faibles, 12,8% pour les risques intermédiaires et de 36% pour les hauts risques.<sup>5, 6</sup>

En ce qui concerne le risque de récurrence, il est estimé pour les tumeurs de stade pTa, tous grades confondus entre 65 et 85%. Cependant le grade, le nombre et la taille de la tumeur, le délai d'apparition de la récurrence ont une influence sur le taux de récurrence. Pour les tumeurs de stade pT1, il est plus difficile d'apprécier le risque de récurrence car le risque majeur qui domine pour ce type de tumeur est essentiellement la progression (près de 40%) plus que la récurrence. De plus dans ce type de tumeur, les différentes études rapportent des traitements

différents associant la résection endoscopique, des instillations de BCG avec plus ou moins un traitement d'entretien, des instillations de mitomycine C.

De même il est difficile d'analyser précisément l'efficacité des instillations de BCG en fonction des groupes à risque et d'un traitement d'entretien ou non. Globalement les résultats des instillations de BCG sont de l'ordre de 70% de patients sans récurrence à 5 ans et de 45% de patients sans récurrence à 15 ans. Les échecs de la BCG-thérapie sont constitués par 47% de non réponse au traitement initial, 38% de rechute après réponse complète de 2 à 3 ans et 15% de rechute tardive après 5 ans. <sup>7</sup> Une méta-analyse de l'EORTC regroupant 24 essais incluant un total de 4 863 patients a montré que le traitement d'entretien de BCG est associé à une réduction de 37% du risque de progression en comparaison aux groupes contrôles. <sup>8</sup>. Ceci a été reconfirmé dans une récente méta-analyse comparant la mitomycine seul versus le BCG avec ou sans entretien. <sup>3</sup>

La présence de carcinome in situ (Cis) associée ou non à une lésion papillaire représente moins de 10% des tumeurs vésicales. Le Cis isolé est plus rare et représente 1,5% des tumeurs vésicales. Son caractère particulier est sa multifocalité et une atteinte sur l'ensemble de l'urothélium. Le diagnostic de ce carcinome est fait suite à une biopsie et un examen histologique. Par contre son traitement repose uniquement sur les instillations de BCG, la résection endoscopique n'a aucun but thérapeutique. Globalement le risque de progression de ce type de tumeur est estimé à 54% mais varie en fonction de l'atteinte multifocale ou non. <sup>9</sup> Différents traitements ont été essayés en particulier des chimiothérapies intra-vésicales. Cependant, à l'heure actuelle le traitement conservateur de référence est l'instillation de BCG donnant en moyenne une réponse complète dans 70% des cas. <sup>3, 5, 6</sup>

### **2.3.3 Effets secondaires du traitement par BCG**

L'efficacité du traitement par instillation endo-vésicale de BCG est souvent contrebalancée par les effets secondaires indésirables qu'il entraîne. Une classification basée sur les recommandations de l'OMS a été établie et est régulièrement utilisée pour la prise en charge de ces complications. Elle comprend 4 groupes en fonction de l'importance des symptômes généraux ou locaux. Sur le plan général, les symptômes sont: syndrome grippal (fièvre, douleurs musculaires et asthénie), arthralgies, rash cutané, réaction allergiques (allant

de l'œdème au choc anaphylactique), hépatite,... Sur le plan local, les symptômes sont essentiellement des phénomènes irritatifs à type de pollakiurie, impériosités, brûlures, incontinence, hématurie,... On peut également observer des tableaux infectieux avec des prostatites, cystites, orchi-épididymite,... A l'extrême, on peut observer de véritable BCGite imposant un traitement antituberculeux voire des décès.<sup>10</sup>

Lors des schémas classiques de 6 instillations de BCG, la plupart des patients (95 %) présente des effets indésirables mineurs ou modérés.<sup>11</sup> Ces effets secondaires sont principalement locaux et cessent à la fin du traitement.

Il est difficile d'avoir une idée précise de la fréquence des effets secondaires induits par le BCG car les définitions ne sont pas consensuelles et varient d'une étude à l'autre. Cependant, il est certain que ce traitement est plus ou moins bien toléré par les patients sur le plan local et que l'on est parfois obligé de l'arrêter du fait des effets secondaires a fortiori en cas de complication générales. De même, avec les protocoles de traitement d'entretien, on observe une augmentation des effets secondaires lors de ces instillations complémentaires imposant d'arrêter ce traitement.

## **2.4 MECANISME D'ACTION DU BCG**

L'activité anti-tumorale du BCG, due à la stimulation de l'immunité à médiation cellulaire, a été découverte par Mathe<sup>12</sup> en 1969 qui l'utilisa en scarifications dans le traitement de la leucémie aigüe de l'enfant. Cette thérapeutique fut ensuite mise en œuvre dans le traitement du mélanome malin. En 1976, Morales<sup>13</sup> fut le premier à proposer la BCG-thérapie intra-vésicale pour le traitement des tumeurs superficielles de la vessie. Depuis ces applications cliniques, le mécanisme d'action du BCG dans le cancer de la vessie reste toujours non précisé. De nombreuses études ont été faites afin d'élucider les mécanismes d'action anti-tumorale du BCG. Elles ont concerné essentiellement: la présence d'infiltrats inflammatoires vésicaux après traitement, la production de cytokines urinaires, l'activation de cellules cytotoxiques et les mécanismes de cytotoxicité induits in vitro par le BCG. Cependant, on ne peut toujours pas dire si la cytotoxicité induite par le BCG est une cytotoxicité spécifique dirigée contre des antigènes bactériens ou des antigènes tumoraux ou

complètement aspécifique du fait d'une réponse immunitaire large. Il existe schématiquement trois phases à la mise en action des mécanismes anti-tumoraux du BCG: une phase d'adhésion et d'internalisation, une phase de présentation antigénique, et enfin une phase de cytotoxicité. Il semble également exister un rôle de l'hôte et de la tumeur pouvant conditionner la réponse au BCG.

#### **2.4.1 Souches de BCG**

Le BCG est une souche atténuée de *Mycobacterium bovis*, une des trois mycobactéries responsables de la tuberculose avec *M. tuberculosis* et *M. africanum*. Le BCG provient d'une souche de *M. bovis* qui avait été isolée par NOCARD en 1904, à partir d'une mastite tuberculeuse de génisse. Cette souche très virulente, était utilisée à l'Institut Pasteur de Lille par Calmette et Guérin pour leurs travaux de laboratoire. Après culture, pour homogénéiser la suspension de bacilles, ils utilisaient de la bile de bœuf. En 1908, ils eurent l'idée d'ajouter cette bile de bœuf dans le milieu de culture. Après une exacerbation passagère de la virulence de la souche, ils eurent la surprise d'observer son atténuation au fur et à mesure des passages. En 1920, après 12 ans d'observation et 232 passages en milieu enrichi de bile de bœuf, la souche était devenue totalement avirulente. Le bacille bilié de Calmette et Guérin était né. La première vaccination humaine visant à protéger contre la tuberculose fut pratiquée en 1921.

La souche originelle de BCG fut alors distribuée à travers le monde mais ne pouvait être utilisée qu'à partir de cultures fraîches de mycobactéries. Partout, les souches furent maintenues pendant de très nombreuses années par passages toutes les 3 semaines sur des milieux de culture qui le plus souvent, étaient légèrement modifiés par rapport au milieu d'origine. Il en est résulté quelques variations entre les souches, tant sur le plan de leur immunogénicité que sur celui de leur réactogénécité. Seule la souche lilloise transférée à l'Institut Pasteur de Paris en 1961 (souche 1173P2) a gardé tous ses caractères originaux. Aussi, en 1965, l'Organisation Mondiale de la Santé a recommandé que toutes les souches soient stabilisées par constitution de lots de semence lyophilisés, conservés à très basse température, afin d'éviter le risque de sélection de mutants moins immunogènes après passages successifs sur milieu de culture.

### 2.4.2 Choix de la souche thérapeutique de BCG

Dès que les premiers bons résultats de l'instillation intra-vésicale de BCG furent connus au début des années 1980, le traitement des tumeurs superficielles et des carcinomes in situ de la vessie fut adopté en France en utilisant *l'Immun BCG F Pasteur*®. Ce produit ne possédait pas l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans cette indication. En 1988, une étude clinique prospective devait être mise en place par la Société Pasteurs Vaccins. Cependant, en 1990, le rapprochement *Pasteur Mérieux Connaught* obligea à un choix stratégique. La société canadienne *Connaught* possédait un BCG à usage thérapeutique (*ImmuCyst*®) dont l'indication en administration intra-vésicale dans les tumeurs de vessie était enregistrée en Amérique du Nord (Etats-Unis et Canada) à la suite de 2 études cliniques démonstrative menées par le "Southwest Oncology Study Group", l'une portant sur 262 cas (SWOG 8216) et l'autre sur 660 cas (SWOG 8507). Or compte tenu de la non identité totale entre les deux souches, les résultats acquis avec le produit canadien *Connaught* ne pouvaient être appliqués au produit français *Immun BCG F Pasteur*®. Par ailleurs, *ImmuCyst*® est un produit lyophilisé, donc stable, permettant un délai de conservation de 2 ans, alors que *l'Immun BCG F Pasteur*® frais devait être utilisé dans les 4 mois après sa fabrication. Le nombre de bacilles vivants obtenus à partir d'une préparation lyophilisée peut varier en fonction de sa date de fabrication et du respect de la chaîne du froid. Cette variabilité est toutefois nettement inférieure à celle de *l'Immun BCG F Pasteur*®.

Toutes ces raisons ont justifié le choix du laboratoire de la mise aux normes européennes du dossier nord américain de *ImmuCyst*® pour demander son enregistrement dans les différents pays européens et à l'abandon de *l'Immun BCG F Pasteur*®. La France délivra l'AMM en 1994.

### 2.4.3 Adhésion et internalisation bactérienne

Le BCG adhère aux cellules urothéliales et la fibronectine semble être le principal agent liquant du BCG sur les cellules épithéliales (Figure 1 et 2). Dans un travail expérimental chez la souris, Ratliff <sup>14</sup> a démontré l'importance de l'adhésion du BCG aux cellules urothéliales grâce à certaines molécules d'adhésions (CD40, ICAM-1, B7) et en particulier la fibronectine. De plus l'augmentation de la liaison à la fibronectine pouvait également augmenter l'effet anti-tumoral du BCG <sup>15</sup>. A partir de ce contact, les bacilles peuvent être phagocytés par les

macrophages. La couche de glyco-amino-glycane (GAG) qui recouvre la surface de l'urothélium vésical joue un rôle dans l'adhésion bactérienne à la paroi vésicale <sup>16</sup>. En effet le BCG adhère d'avantage au GAG que les bactéries uro-pathogènes. L'adhérence du BCG au GAG a été corrélée à une réaction immunitaire supérieure <sup>17</sup>. Le rôle de TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) semble également joué un rôle important dans l'adhésion du BCG et son action anti-tumorale. <sup>18</sup>

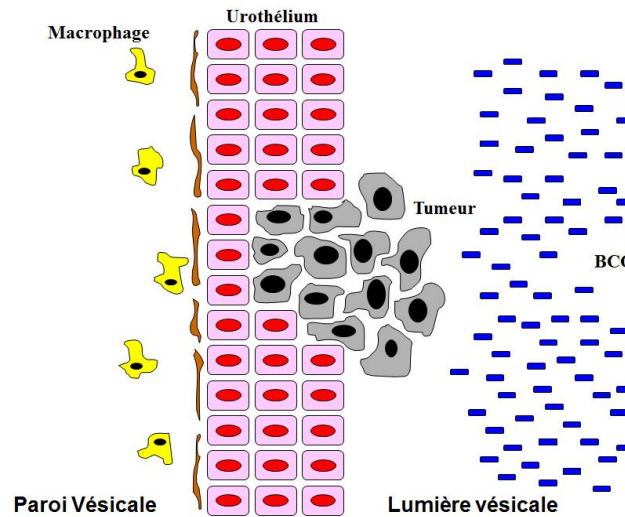


Figure 1 : Instillation de BCG dans la vessie

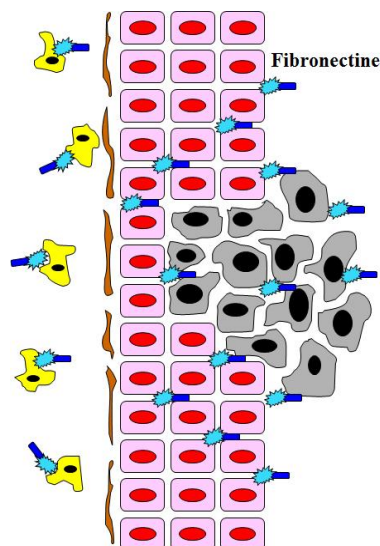


Figure 2 : Phase d'attache du BCG dans la paroi vésicale avec la fibronectine

#### 2.4.4 Présentation antigénique

Les mécanismes de présentation antigéniques sont différents en fonction de la nature de l'antigène et de la cellule présentatrice:

- Les antigènes endogènes sont présentés aux cellules T par des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces molécules de CMH de classe I sont exprimées par toutes les cellules de l'organisme. Ces antigènes endogènes sont apprêtés dans le cytoplasme où ils sont clivés en peptides et transportés dans le réticulum endoplasmique avant d'être lié aux molécules d'histocompatibilité de classe I. Le complexe CMH de classe I et peptide arrive à la surface de la cellule où il est reconnu par les lymphocytes T cytotoxiques CD8.
- Les antigènes exogènes sont présentés aux cellules T par des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces molécules de CMH de classe II sont exprimées uniquement par des cellules présentatrices d'antigènes (APC) spécialisées: macrophages, lymphocytes B, cellules dendritiques et cellules de Langerhans. Les cellules présentatrices d'antigènes appréhendent et présentent ces antigènes exogènes qui sont dégradés en petits fragments dans les lysosomes qui se lient ensuite aux molécules de classe II, avant de migrer à la surface de la cellule. Le complexe CMH de classe II et peptide est alors reconnu par les lymphocytes CD4 T Helper.

##### 2.4.4.1 Antigènes mycobactériens

La phase effectrice est caractérisée par la présentation par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) aux lymphocytes T auxiliaires, de certaines des protéines de constitution du BCG ou produites par sa dégradation puis par l'activation de cellules cytotoxiques. Le rôle des macrophages dans la présentation antigénique aux cellules CD4<sup>+</sup> est important dans l'activité anti-tumorale induite par le BCG (Figure 3). Les antigènes de *Mycobacterium tuberculosis* qui induisent une réponse immunitaire protectrice ne sont pas parfaitement caractérisés.

Thanhauser a montré que la cytotoxicité médiée par le BCG était quasiment nulle en cas de déplétion du sang périphérique en cellules mononuclées ou en cellules CD4<sup>+</sup> <sup>19</sup>.

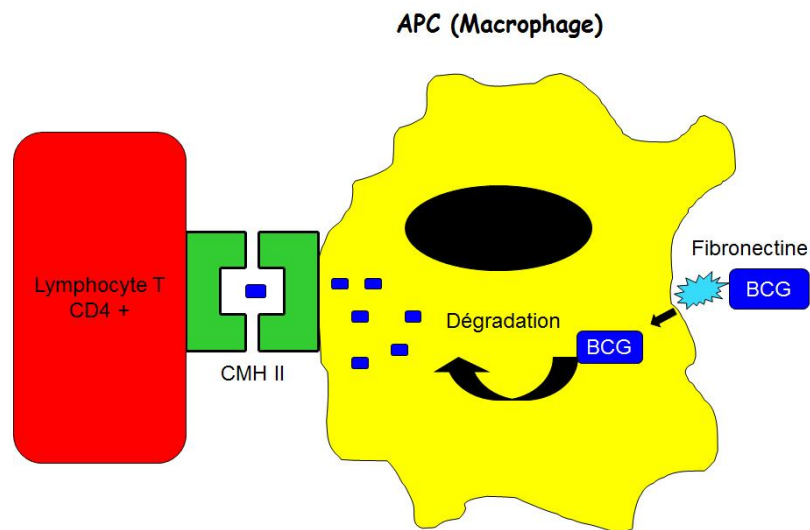


Figure 3 : Présentation antigénique des APC après internalisation du BCG aux lymphocytes T CD4+

#### 2.4.4.2 Antigènes tumoraux

Il a été montré que des cellules autres que les macrophages et les cellules présentatrices pouvaient présenter des antigènes aux cellules lymphocytaires T. Lattime a démontré dans un modèle de tumeur de vessie murin que les cellules urothéliales tumorales étaient capables de présenter des antigènes mycobactériens du BCG à des cellules T CD4+ spécifiques dans le cadre d'une restriction du CMH de classe II afin de les activer<sup>20</sup>.

Aucun argument définitif expérimental n'a été mis en évidence pour penser que le BCG induit une reconnaissance spécifique d'antigènes tumoraux. La théorie d'une réponse non spécifique est liée à la présence de nombreux macrophages, polynucléaires neutrophiles et à la présence d'IL-2 et d'IFN gamma après BCG. Classiquement les antigènes de rejet des tumeurs sont présentés à la surface de la cellule tumorale par les antigènes du CMH de classe I et sont reconnus par des lymphocytes T cytotoxiques CD8 (Figure 4). Les travaux de Zlotta suggèrent la théorie d'antigènes croisés entre le BCG et les tumeurs vésicales.<sup>21</sup>

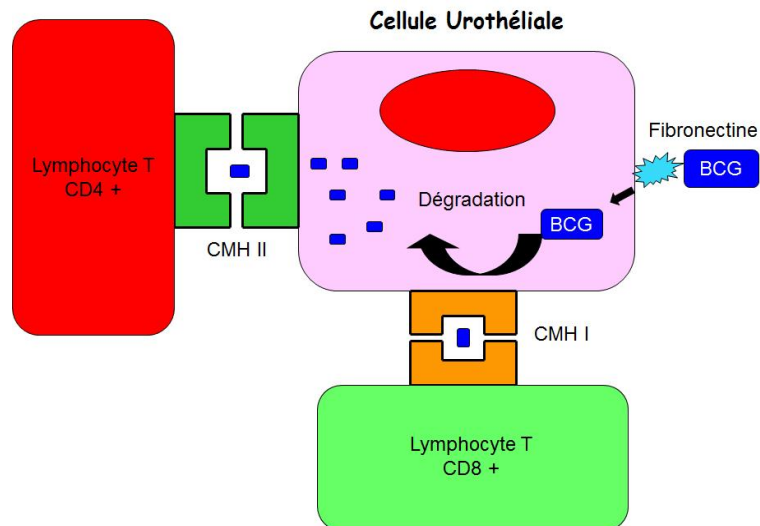


Figure 4 : Présentation antigénique des cellules urothéliales aux lymphocytes T CD4+ et CD8+

### 2.4.5 Cytotoxicité anti-tumorale : les cellules cytotoxiques

Les différentes cellules pouvant avoir un effet cytotoxique sur les cellules tumorales après activation par le BCG sont les lymphocytes T  $\alpha\beta$  (CD4+ ou CD8+), les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , les cellules Natural Killer (NK), les lymphokine Activated Killer (LAK), les BCG Activated Killer (BAK), et les macrophages (MAK)<sup>22-24</sup>.

#### 2.4.5.1 Les lymphocytes de type CD4+

Les lymphocytes de type CD4+ sont dit lymphocytes «T Helper» et sont composés de deux sous-groupes en fonction de leur réponse et de leur profil de libération des cytokines (Figure 5):

- Lymphocytes TH1 qui sont principalement recrutés dans la réponse cellulaire et qui libèrent de l'IL-2, IL-12, TNF- $\beta$  et IFN- $\gamma$ .
- Lymphocytes TH2 qui oriente vers une réponse de type humorale avec production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10

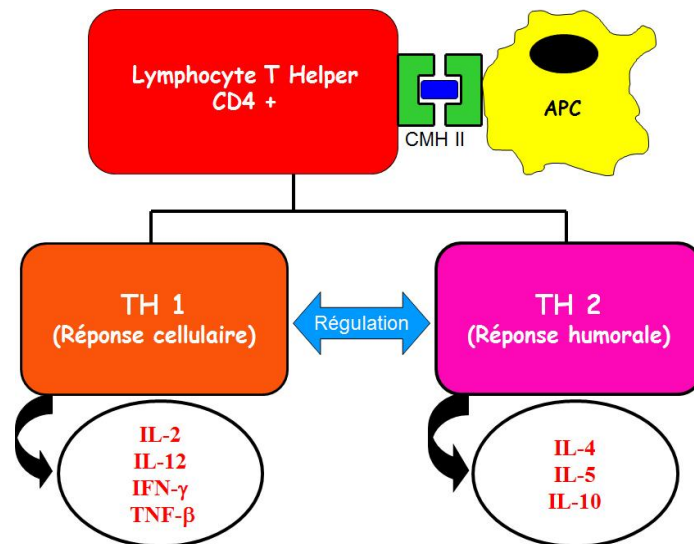


Figure 5 : Types de réponses standard TH1 ou TH2 des lymphocytes T CD4+

La phase anti-tumorale cytotoxique du BCG est médiée principalement par une réponse lymphocytaire T. Ratliff a démontré que la souris athymique n'était pas capable d'éliminer une tumeur après traitement par BCG et que la déplétion en cellule CD4+ ou en cellule CD8+ chez la souris supprimait l'effet antitumoral du BCG <sup>25, 26</sup>. Les infections mycobactériennes induisent préférentiellement une réponse immunitaire cellulaire de type T Helper 1 (TH1) avec une augmentation des lymphocytes CD4 + et une libération d'IL-2 et IFN- $\gamma$  <sup>27</sup> (Figure 6). McAveney a étudié sur un modèle expérimental de tumeur urothéliale murin (MB49) la modulation des cytokines par le BCG avec une augmentation significative de l'IFN- $\gamma$  et réduction de l'expression de l'IL-4 <sup>28</sup>.

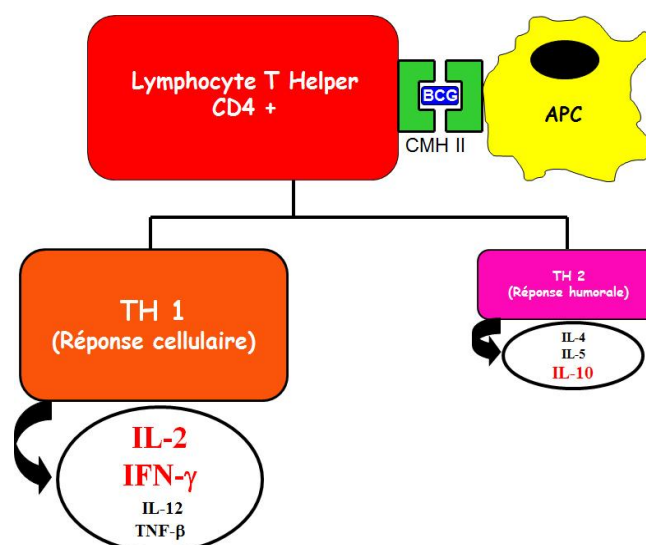


Figure 6 : Types de réponses TH1 ou TH2 en cas d'infection par BCG

### 2.4.5.2 Les lymphocytes T CD8+

Les lymphocytes T CD8+ spécifiques peuvent reconnaître des antigènes mycobactériens ou tumoraux. Leur présence dans la vessie après BCGthérapie n'a pas été parfaitement caractérisée et on ne sait pas s'ils reconnaissent plus spécifiquement des antigènes bactériens plutôt que des antigènes tumoraux. Ces lymphocytes T cytotoxiques sont capables de lyser des cellules infectées par la mycobactérie et produisent de l'IFN- $\gamma$ <sup>23</sup>.

A l'état basal le phénotype de type CD8+ est prédominant dans la vessie normale (Figure 7). De nombreux auteurs ont démontré que les lymphocytes CD4+ et CD8+ étaient présents dans la paroi vésicale après BCG et que le phénotype de type CD4+ était prédominant<sup>29-32</sup> (Figure 8).

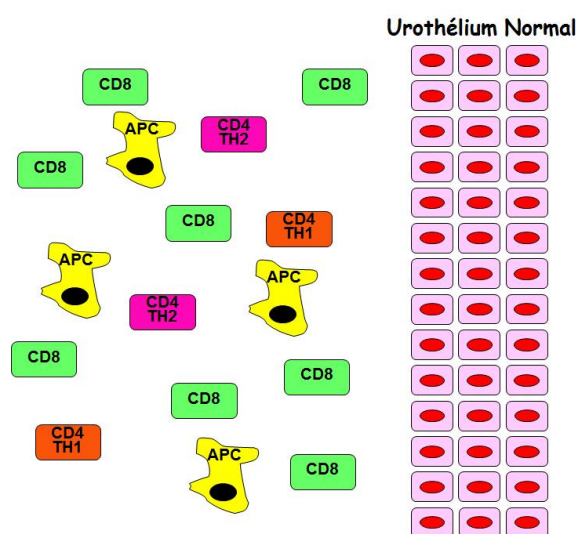


Figure 7 : Types de réponses CD4+ / CD8+ dans une paroi vésicale à l'état de base

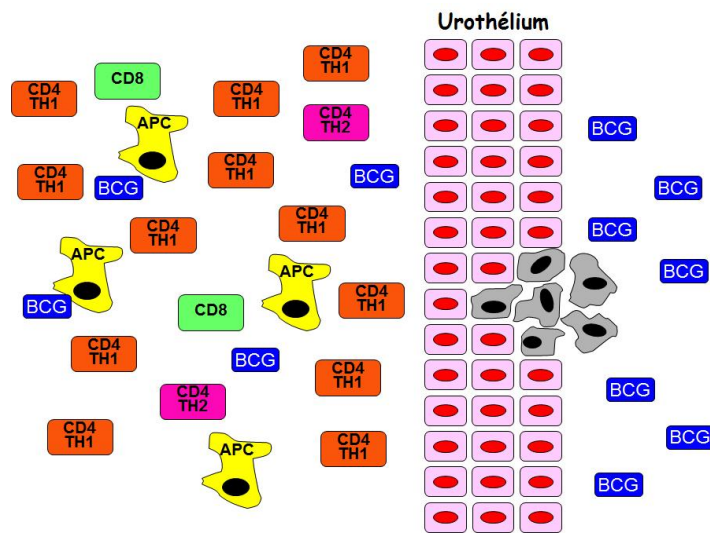


Figure 8 : Types de réponses CD4+ / CD8+ dans une paroi vésicale après instillation de BCG

#### 2.4.5.3 Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont des lymphocytes cytotoxiques. Ils n'expriment pas habituellement le phénotype CD4+ ni le phénotype CD8+ et leur reconnaissance de l'antigène n'est pas restreinte par le système d'histocompatibilité. Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent reconnaître les antigènes mycobactériens, des protéines virales, des «heat-shock» protéines et des super antigènes <sup>22, 33</sup>.

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  produisent des cytokines comme l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  (Figure 9). Ils sont activés par les mycobactéries et ont une activité cytolytique sans restriction du CMH contre les cellules tumorales urothéliales in vitro. <sup>34</sup> Leur activité cytolytique semble pouvoir être réactivée lors d'un deuxième contact avec le BCG et pourrait être impliquée dans la qualité de la réponse au BCG par un phénomène de mémoire associée. <sup>35</sup>. De plus, ces lymphocytes ont la capacité de stimuler les autres populations lymphocytaires (CD4+, CD8+) en réponse à la stimulation antigénique

Il a été démontré, lors d'une étude in-vitro sur des cultures cellulaires de tumeurs de vessie, que les antigènes mycobactériens pouvaient spécifiquement activer les lymphocytes T  $\gamma\delta$  en particulier en associant avec du TNF. De même le profil des cellules tumorales détruites par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  est différent de celui des cellules NK ou des LAK. <sup>34</sup>

Honda a rapporté le premier, en 1997, une étude sur le phénotype de l'infiltration lymphocytaire avant et après le traitement endo-vésicale par BCG chez 16 patients. Le nombre de cellules CD3+, CD4+, CD8+ et CD19+ a significativement augmenté après traitement. De même il n'existait pas d'infiltration de lymphocyte T  $\gamma\delta$  avant le traitement. Ils apparaissaient après le traitement chez 6 patients. Pour ces 6 patients, il a été noté une disparition ou une réduction de la tumeur de plus de 50% et aucun n'a récidivé. Les auteurs ont conclu que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  jouaient un rôle important dans la réponse immune au BCG même si non statistiquement significative.<sup>36</sup> Une autre étude par immunohistochimie, a montré que l'expression des lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans la paroi vésicale, comme la plupart des autres communautés cellulaires, 3 semaines après BCG, était majorée comparativement à la situation pré-BCG. Le maximum d'infiltration vésicale par ces lymphocytes T  $\gamma\delta$  étant observé 3 mois après BCG.<sup>37</sup>

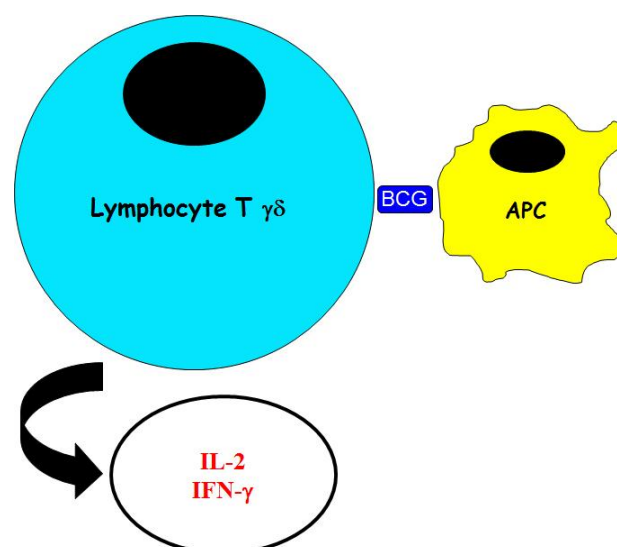


Figure 9 : Type de réponse des lymphocytes T  $\gamma\delta$

#### 2.4.5.4 Les cellules Natural Killer (NK), Lymphokine Activated Killer (LAK), BCG Activated Killer (BAK)

Trois groupes de lymphocytes cytotoxiques peuvent être impliqués dans l'immunité anti-tumorale induite par le BCG et ce de manière non spécifique : les cellules NK, LAK et BAK. Les cellules NK représentent un groupe particulier de lymphocytes et constituent le principal précurseur des cellules LAK. Ces cellules co-expriment les marqueurs CD8+ et CD56+ à leur surface sans exprimer l'antigène CD3+ ou les chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$  du récepteur

T. Elles ont la possibilité de produire de l'IL-12 et d'initier une réponse anti-tumorale efficace.  
38

Les cellules NK, les cellules LAK et les cellules BAK possèdent un rôle cytotoxique direct contre les cellules tumorales urothéliales et sont capables de lyser ces cellules après stimulation par BCG in vitro.<sup>39-41</sup> A l'inverse, la BCG-thérapie a été totalement inefficace chez des souris sans cellules NK et chez des souris traitées par des anti-corps monoclonaux anti-NK1.1.<sup>42</sup>

#### **2.4.5.5 Les macrophages**

Le rôle des macrophages dans la cytotoxicité induite par le BCG est suggéré mais non prouvé. Plusieurs études ont montré l'activité cytotoxique des monocytes et des macrophages contre les tumeurs de vessie après stimulation in-vitro par le BCG<sup>43-45</sup>.

#### **2.4.6 Cytotoxicité anti-tumorale : les cytokines**

Les cellules immunocompétentes communiquent entre elles par des cytokines qui ont des fonctions de croissance, d'immunomodulation et également un rôle cytotoxique. Cependant l'origine de ces cytokines est multiple (Tableau 3).<sup>46 47, 48</sup>

Durant une infection mycobactérienne les cellules présentatrice d'antigènes apprennent ainsi les antigènes mycobactériens et libèrent des cytokines: Toutes ces cytokines sont indispensables au recrutement des cellules immunocompétentes (lymphocyte T, macrophage et des polynucléaires neutrophiles) qui infiltrent la paroi vésicale au cours des instillations. De nombreux travaux ont montré que les cytokines étaient présentes dans les urines des patients traités par le BCG.<sup>49-55</sup> Ces cytokines peuvent être liées à l'inflammation induite par le BCG : IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  et GM-CSF. Elles peuvent être liées à la réaction TH1 prédominantes : IL-2 et INF $\gamma$  ou la réponse TH2 : IL-4 et IL-10. Il semble en plus que la production de certaines de ces cytokines ait une valeur pronostique sur la réponse au traitement.

Jackson a étudié la cinétique de certaines cytokines après traitement par le BCG.<sup>53</sup> L'IL-1, l'IL-6, IL-8, IL-10 sont détectées tôt dès la première instillation après BCGthérapie. Les autres cytokines comme l'IL-2, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  sont détectés plus tard à partir de la

troisième instillation. Il semble donc que les macrophages et les cellules urothéliales soient responsables de la production initiale de cytokines de type inflammatoire; ces cytokines pourraient d'ailleurs être responsables des effets indésirables précoces du BCG.<sup>56</sup>

La réponse immunitaire induite par les instillations de BCG est une réponse majoritairement TH1 avec une libération de l'IL-2, IL-12, TNF- $\beta$  et IFN- $\gamma$ . La sécrétion urinaire de ces cytokines a été étudiée chez les patients traités par instillation de BCG. Globalement il a été mis en évidence une cinétique similaire de ces cytokines avec un pic maximum 4 à 6 heures après une instillation de BCG et essentiellement entre la 4<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> instillation.<sup>50, 57, 58</sup>

| <b>Cellules</b>                 | <b>Cytokines</b>                                                              |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Macrophages                     | IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ |
| Cellules urothéliales saines    | IL-6                                                                          |
| Cellules urothéliales tumorales | IL-1, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$                                              |
| Lymphocytes T CD4 + (TH1)       | IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ et TNF $\beta$                                     |
| Lymphocytes T CD4 + (TH2)       | IL-4, IL-5, IL-10                                                             |
| Lymphocytes T CD8 +             | IL-2, IFN- $\gamma$                                                           |
| Lymphocytes T $\gamma\delta$    | IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GMCSF                             |
| Cellules NK et LAK              | TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ .                                               |

Tableau 3 : Production de cytokines en fonction du type cellulaire

#### 2.4.6.1 Interleukine-2 (IL-2)

L'IL-2 est une cytokine sécrétée principalement par les lymphocytes T CD4+ et témoin d'une réponse cellulaire TH1 prédominante. Elle est aussi sécrétée par les lymphocytes T  $\gamma\delta$ . Il s'agit de la cytokine qui a été le plus étudiée lors de la réaction au BCG dans le cancer de la vessie.

Différentes études ont analysées la cinétique de sécrétion de l'IL-2, dans les urines, en cours de traitement par instillation de BCG. Il en ressort qu'il n'existe pas d'IL-2 dans les urines à l'état de base. Suite à une instillation de BCG, un pic de sécrétion d'IL-2 est

délectable entre la 2<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> heure (en moyenne à la 6<sup>ème</sup> heure) avec un retour à l'état de base à la 24<sup>ème</sup> heure. Cette sécrétion d'IL-2 est significative à partir de la 2<sup>ème</sup> à 4<sup>ème</sup> instillation de BCG alors qu'elle ne l'est pas juste après la première instillation. Cette sécrétion maximale atteint des valeurs de 2000 à 3000 pg/ml.<sup>50, 51, 59-62</sup>

La sécrétion d'IL-2 détectée dans le sérum est par contre plus discutable. En effet, Ratliff *et al* ont étudié la production d'IL-2 dans les urines et dans le sang de patients traités par instillation endo-vésical de BCG. Il n'a pas mis en évidence de sécrétion d'IL-2 dans le sang alors qu'elle était détectée dans les urines.<sup>55</sup> Taniguchi *et al*<sup>57</sup> et Magno *et al*<sup>63</sup> ont mis en évidence une production systémique d'IL-2 après instillation de BCG. Cette production est plus faible que dans les urines avec des valeurs entre 20 et 200 pg/ml mais ayant une cinétique équivalente à celle dans les urines avec un pic de sécrétion à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine de traitement. Magno *et al*<sup>63</sup> ont même mis en évidence une valeur pronostique de la sécrétion systémique de l'IL-2 sur la réponse au BCG avec pour les non-répondeurs un taux moyen de 10pg/ml et pour les répondeurs un taux moyen de 20pg/ml.

Cette production urinaire et sanguine d'IL-2 a une valeur pronostique de la réponse au traitement par instillation de BCG. En effet plusieurs études ont mis en évidence une diminution du risque de récurrence vésicale chez les patients dont la sécrétion d'IL-2 dans les urines ou dans le sang a été importante.<sup>52, 63-68</sup> De plus, dans ces études ayant analysées plusieurs profils de cytokines comme facteurs pronostiques, seul l'IL-2 a été mise en évidence comme le seul facteur indépendant en analyse multivariée sur la survie sans récurrence comparativement aux autres cytokines évaluées.

Plusieurs essais thérapeutiques associant de l'IL-2 au BCG ou par instillation seule d'IL-2 en intra-vésical ont été réalisés pour augmenter l'effet du traitement.<sup>69-72</sup> Ces résultats même si encourageants initialement n'ont pas été confirmés par la suite et n'ont pas mis en évidence une supériorité de l'IL-2 par rapport au traitement par BCG seul. Récemment Xiao *et al*<sup>73</sup> ont étudié dans un modèle animal de tumeur de vessie chez le rat, l'effet du BCG en fonction d'un traitement combiné par cytokines. Ils ont comparé l'évolution des tumeurs et des rats en fonction d'une escalade de dose du BCG associé ou non à de l'Interféron- $\alpha$  ou de l'interleukine-2 ou de la gemcitabine. Ils ont mis en évidence que seules les doses élevées de BCG ont amélioré la survie de l'animal sans bénéfice supérieur d'une association avec de l'Interféron- $\alpha$  ou de la gemcitabine. Par contre la diminution de la dose du BCG associé à de l'interleukine-2 a permis en effet similaire. Cette étude fait discuter, dans un modèle animal,

l'intérêt de diminuer la dose de BCG, pour diminuer la toxicité et les effets secondaires, en espérant ne pas diminuer l'efficacité si on y associe de l'Interleukine-2.

Globalement l'IL-2 est donc le témoin d'une réponse TH1 prédominante qui est produite par le BCG. Sa sécrétion apparaît surtout en 2<sup>ème</sup> partie du traitement d'attaque du BCG et elle semble corrélée à la réponse au BCG.

#### **2.4.6.2 Interleukine-4 (IL-4)**

L'IL-4 est une cytokine sécrétée principalement par les lymphocytes T CD4+ et témoin d'une réponse humorale TH2 prédominante.

Peu d'études dans la littérature ont analysé la production d'IL-4 au cours des traitements de BCG dans le cancer de la vessie et elles ont été réalisées que sur des lignées cellulaires. Li *et al*<sup>74</sup> ont fait une étude sur des lignées cellulaires T24 de cancer de la vessie humaine. Ils n'ont pas mis en évidence de sécrétion d'IL-4 dans le surnageant de ces lignées cellulaires 12 heures après une stimulation par le BCG. McAveney *et al*<sup>28</sup> ont analysé la production d'IL-4 sur une lignée cellulaire MB49 de cancer de vessie de souris injecter dans une vessie de souris syngénique pour analyser la réponse TH1/TH2. Ils ont observés une diminution de la sécrétion d'IL-4 lors des instillations de BCG.

#### **2.4.6.3 Interleukine-6 (IL-6)**

L'IL-6 est une cytokine sécrétée principalement par les cellules urothéliales normales mais aussi par les cellules urothéliales tumorales et les macrophages.

Plusieurs études ont mis en évidence une sur-régulation de l'IL-6 avec le BCG sur des lignées cellulaires de cancer de vessie mais avec des modes d'action différents et toujours en quantité faible.<sup>47, 51, 75-79</sup>

Leibovici *et al*<sup>80</sup> ont étudié le polymorphisme des gènes de l'inflammation (IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  et Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARG)) comme facteur pronostique pour le cancer de la vessie. Ils ont mis en évidence qu'un variant génotypique

(C/C) de l'IL-6 a été associé à un risque plus important de cancer la vessie comparativement à un groupe contrôle sans cancer. De même, en stratifiant en fonction du type de traitement reçu, ils ont mis en évidence un risque de récurrence plus important, en étude multivariée, chez les patients ayant ce variant génotypique de l'IL-6 et traitée par traitement d'entretien de BCG. Enfin ce variant génotypique de l'IL-6 a été associé à un risque plus élevé de progression chez les patients ayant une TVNIM, et à la survie globale et spécifique chez les patients ayant une TVIM. Ces données ont été confirmées dans une 2<sup>ème</sup> étude similaire.<sup>81</sup>

Taniguchi *et al*<sup>57</sup> ont analysé la production systémique d'IL-6 lors des instillations de BCG. Cette production a été en fait non détectée dans le sang pour l'IL-6, elle a été présente que pour l'IL-2 et à moindre importance pour l'IFN- $\gamma$ .

Sanchez-Carbayo *et al*<sup>66</sup> ont étudié les taux urinaire de plusieurs cytokines (IL-2, IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$ ) avant les instillations de BCG. Pour les patients non-répondeurs au BCG, ils n'ont pas mis en évidence de pic urinaire de cytokines (IL-2, IL-6 et TNF- $\alpha$ ) avant les instillations. A l'inverse chez les patients répondeur au BCG, les taux de cytokines ont été hétérogènes mais avec un faible taux d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  et un pic d'IL-2 et d'IL-8.

#### 2.4.6.4 Interleukine-10 (IL-10)

L'IL-10 est une cytokine sécrétée principalement par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ayant une réponse TH2 (qui n'est pas la réponse induite par le BCG) mais également par les macrophages et les cellules urothéliales tumorales.

Watanabe *et al*<sup>65</sup> ont mis en évidence une augmentation du taux d'IL-10 lors du traitement par BCG. Par contre même si le taux élevé d'IL-10 urinaire a été corrélé à une réponse au BCG en univarié, il ne l'a pas été en multivarié.

Luo *et al*<sup>82</sup> ont démontré, sur un modèle animal, que les macrophages activés par le BCG produisaient de l'IL-10 associé à une réduction de la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6. Mais en cas de supplémentation exogène d'IL-10, ils ont observé une diminution de l'activité macrophagique contre le BCG de manière dose dépendante. Par conséquent l'IL-10 en dose trop importante peut inhiber l'activité macrophagique en cas de traitement par BCG. Ou en d'autre terme, en cas de blocage de l'IL-10, l'effet du BCG pourrait être potentialisé.

Dans le même sens Nadler et al <sup>83</sup> ont étudié sur un modèle animal l'hypersensibilité de type retardé induite par le BCG avec l'analyse de la production d'IL-10, TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  (l'IL-10 est considéré comme un inhibiteur de l'hypersensibilité de type retardé). Ils ont mis en évidence que la réaction Th1 (IFN- $\gamma$ ) a précédé la réaction Th2 (IL-10). Une tendance à un taux plus élevé de l'IFN- $\gamma$  par rapport à l'IL-10 a été observée chez les répondeurs au BCG. Les souris déficiente en IL-10 ou en cas d'absence l'IL10, ont eu une hypersensibilité de type retardé plus importante. Ces résultats ont mis en évidence le fait qu'une diminution de l'IL-10 pourrait avoir un effet thérapeutique.

#### **2.4.6.5 Interleukine-17 (IL-17)**

L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire dérivée des cellules T. Elle induit une mobilisation indirecte des polynucléaires neutrophiles. Elle est produite principalement par certains lymphocytes T CD4+ <sup>100</sup> mais également par certains lymphocytes T  $\gamma\delta$ .

Saban *et al* <sup>101</sup> ont été les premiers à démontré, sur un modèle de souris, la production d'IL-17 avec une production première d'une infiltration par les polynucléaires neutrophiles induite par le BCG

Takeuchi *et al* <sup>102</sup> ont rapporté récemment une étude sur la souris démontrant la production urinaire d'IL-17 précédant l'infiltration de neutrophile en cas de traitement vésical par BCG. De même, le taux de production d'IL-17 et le nombre de polynucléaire neutrophile ont été diminué en cas de souris déficiente en lymphocyte T  $\gamma\delta$ . Ils ont conclu que l'IL-17 produit par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  joue un rôle dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles en cas de traitement vésical par BCG avec une activité anti-tumorale contre le cancer de vessie.

#### **2.4.6.6 Interféron $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )**

L'IFN- $\gamma$  est une cytokine sécrétée principalement par les lymphocytes T CD4+ et témoin d'une réponse cellulaire TH1 prédominante. Elle est aussi sécrétée par les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , les cellules NK et les macrophages.

La production de l'IFN- $\gamma$ , comme celle de l'IL-2, sont nécessaire à la production et l'activation de cellules lymphocytaires induite par les instillations de BCG. La production d'IFN- $\gamma$  dans les urines a été rapportée dans les années 1990 alors qu'initialement elle n'était pas retrouvée. Ceci du fait d'une grande instabilité de l'IFN- $\gamma$  sensibles aux protéases dans les urines contrairement aux autres cytokines imposant une dialyse immédiate des urines et de les conserver à -80°C. <sup>54</sup> La cinétique de l'IFN- $\gamma$  suit celle de l'IL-2 <sup>57, 90, 91</sup>. En effet elle est absente lors de la 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> puis apparaît à la 3<sup>ème</sup> instillation pour atteindre un maximum à la 5<sup>ème</sup> ou la 6<sup>ème</sup> instillation. Les taux maximums d'IFN- $\gamma$  sont mis en évidence entre la 4<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> heure après chaque instillation avec des valeurs en moyenne entre 8 et 67 U/ml. <sup>10, 54, 92</sup>

L'IFN- $\gamma$  a un rôle important et peut potentialiser l'IL-12 dans la réponse immunologique TH1 induite par le BCG. <sup>93, 94</sup> Cependant la sécrétion urinaire de l'IFN- $\gamma$ , contrairement en particulier à l'IL-2, n'a pas été influencé le risque de récurrence. <sup>85</sup>

Différentes études ont analysé l'intérêt d'associer de l'IFN- $\alpha$  (et non IFN- $\gamma$ ) au BCG afin d'espérer un meilleur résultat en stimulant en plus du BCG les cellules immuno-compétente pour favoriser cette réponse TH1. Les premiers résultats ont été encourageants avec une diminution du risque de récurrence en cas d'association BCG/IFN- $\alpha$  pour les patients ayant une résistance à un premier traitement par BCG seul, avec une réponse complète supérieure à 50%. <sup>95, 96</sup> L'intérêt de cette association a été également de diminuer les doses de BCG pour diminuer le risque de toxicité sans diminuer l'efficacité. <sup>97</sup> Une étude de phase II multicentrique à chercher à évaluer l'intérêt d'associer de l'IFN- $\alpha$  au BCG. Les résultats préliminaires ont été rapportés en 2004 sur 490 patients. <sup>98</sup> Dans le 1<sup>er</sup> groupe, 259 patient naïf de BCG ont reçu un traitement standard d'attaque de BCG + 50 M d'unité d'IFN- $\alpha$  suivi d'un traitement d'entretien avec une réduction de dose du BCG de 1/3 à 1/10 + 50 M d'unité d'IFN- $\alpha$ . Dans le 2<sup>ème</sup> groupe, 231 patient en échec de BCG ont reçu un traitement standard d'attaque de BCG sans IFN- $\alpha$  mais ayant un traitement d'entretien selon le même protocole. Ils ont mis en évidence un taux de récurrence tumoral de 40% dans le groupe BCG naïf et de 52% dans le groupe échec de BCG avec une survie sans récurrence à 24 mois de 57% et 42% et un risque de progression tumoral de 5% et 4.3% respectivement. En 2006, ils ont publiés les résultats définitifs sur 1007. <sup>99</sup> Les conclusions ont été que l'IFN- $\alpha$  même si efficace n'a pas amélioré la survie sans récurrence qui a été plus influencée par la taille tumorale >5cm, le stade T1, la multifocalité, l'échec du BCG lors du traitement d'attaque.

#### 2.4.6.7 Tumor Necrosis Factor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine sécrétée principalement par les macrophages, les cellules NK et LAK, les lymphocytes T $\gamma\delta$ .

Jackson *et al*<sup>84</sup> ont mis en évidence une sécrétion de TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  et du récepteur soluble au TNF (I et II) dans les urines des patients traités par BCG. Ils ont observé une sécrétion variable d'un patient à l'autre. La sécrétion du TNF- $\alpha$  a été plus importante que celle du TNF- $\beta$ . Ils n'ont pas mis en évidence d'augmentation du récepteur soluble au TNF au cours des instillations de BCG.

En ce qui concerne le profil de sécrétion du TNF- $\alpha$  lors des instillations de BCG, Shintani *et al*<sup>85</sup> ont observé une absence de sécrétion après la 1<sup>ère</sup> instillation de BCG et un pic de sécrétion à la 4<sup>ème</sup> heure de la 6<sup>ème</sup> instillation mais avec une décroissance observée à la 8<sup>ème</sup> heure après cette dernière instillation pour avoir des valeurs quasi nulle à la 24<sup>ème</sup> heure. Par contre ils ont mis en évidence une tendance ( $p=0.07$ ) entre le taux de TNF- $\alpha$  4<sup>ème</sup> heure de la 6<sup>ème</sup> instillation et le risque de récurrence tumorale après BCG avec des taux plus faibles de TNF- $\alpha$  en cas de récurrence. De même d'autres auteurs ont mis en évidence des résultats similaires sur le profil de sécrétion du TNF- $\alpha$  mais sans relation avec la réponse au BCG.<sup>51, 57, 65, 66, 86, 87</sup>

D'autres études se sont intéressées plus récemment au polymorphisme du gène du TNF- $\alpha$ . Lima *et al*<sup>88</sup> ont analysé le polymorphisme génotypique du TNF- $\alpha$  et de l'IL-4 de 125 ADN extraits de tumeurs de vessie traitées par BCG. Ils ont mis en évidence qu'un type de polymorphisme (TNF-308A) du TNF- $\alpha$  était lié à une augmentation du risque de développer des tumeurs multiples mais sans association à la réponse au BCG. D'autres études<sup>89</sup> ont étudié sur 220 tumeurs de vessie un autre polymorphisme du gène du TNF- $\alpha$  (T-1031C) et ont mis en évidence une relation significative entre la présence de ce polymorphisme et la diminution du risque de récurrence après BCG.

Le TNF- $\alpha$  a donc un rôle pour l'activation non spécifique des macrophages au niveau vésical lors du traitement initial mais sa sécrétion semble de courte durée pour faire place à

une réponse plus spécifique de type TH1. De plus son action semble variable en fonction de son polymorphisme génotypique ce qui peut expliquer les variations.

#### 2.4.7 Résumé du mécanisme d'action

Le mécanisme d'action du BCG dans le traitement du cancer de la vessie est multifactoriel. En effet l'efficacité du traitement dépend de la tumeur mais également de la capacité du patient à développer une réponse immunitaire au BCG. Dans un premier temps il se produit une réaction inflammatoire puis se développe une réaction immunitaire de type TH1 avec production de lymphocytes T CD4+ prédominante. Cette réaction immunologique amène également une grande production de cytokines (inflammatoire et TH1) au niveau urinaire mais également plasmatique pour permettre le recrutement de ces cellules immunocompétentes (Figure 10). Tout ceci amène à développer une approche thérapeutique individuelle en fonction de la réponse immunitaire induite chez le patient après les instillations de BCG.

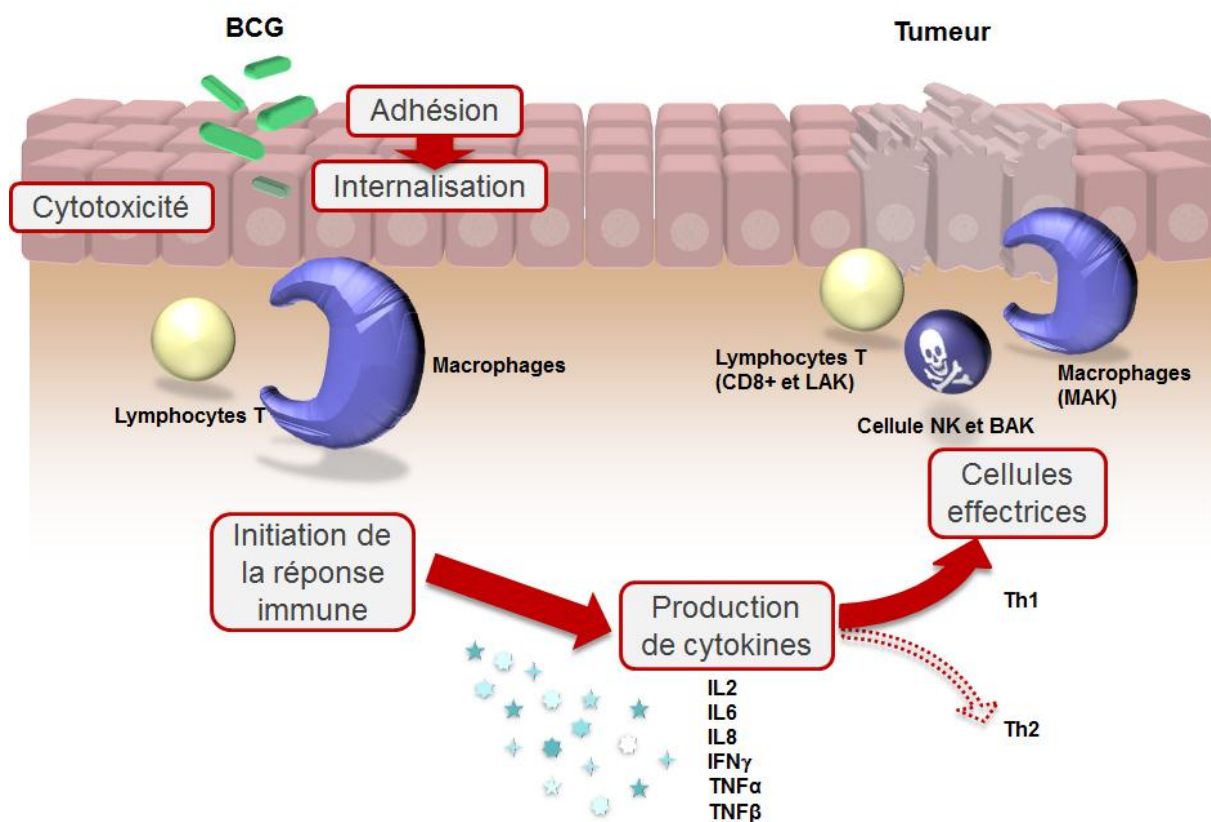


Figure 10 : Schéma global du mode d'action du BCG

# OBJECTIFS

## **3 OBJECTIFS**

### **3.1 HYPOTHESE DE TRAVAIL**

Le problème posé est que nous ne connaissons pas encore précisément le mécanisme d'action du BCG lors des instillations endo-vésicales chez les patients atteints d'un cancer de la vessie. Ce qui est par contre bien connu, c'est que ce traitement est efficace avec une diminution du risque de récurrence ou de progression de la maladie. Cependant ce traitement n'est pas dénué d'effets secondaires et certains patients ne répondent pas à ce traitement.

De nombreuses études ont étudié l'implication des cytokines et de la réponse immunitaire locale, et parfois générale, des instillations de BCG. Par contre, il n'est quasiment pas rapporté de corrélation entre la réaction locale (vésicale) et la réaction systémique (sanguine) lors des instillations.

L'hypothèse de travail de notre étude a été de déterminer une corrélation entre la réponse systémique et la réponse locale induite par l'instillation de BCG par la production de cytokines. Ainsi on peut espérer identifier de nouveaux marqueurs permettant de sélectionner les patients répondeurs ou de prédire la réponse au traitement par instillation endo-vésicale de BCG pour un cancer de la vessie. On peut supposer que les patients n'ayant pas ou peu d'activation du système immunitaire systémique (générale) ou local (vésical) suite à une instillation de BCG, auront peut-être pas ou peu d'effet local sur la tumeur de vessie.

De même nous avons voulu étudier les cellules effectrices cytotoxiques qui sont stimulées et produites lors des instillations de BCG afin d'analyser le type de réponse immunitaire et de corréler cette réponse avec la réponse tumorale.

## **3.2 OBJECTIFS DE L'ETUDE**

Les objectifs initiaux de l'étude ont été :

### **3.2.1 Objectif principal**

L'objectif principal de notre étude a été de déterminer une corrélation entre la production locale (vessie) et systémique (sang) des cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL 17, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) durant un traitement par BCG pour un cancer de la vessie.

### **3.2.2 Objectifs secondaires**

Les objectifs secondaires de notre étude ont été:

- Etudier la réponse PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) induite par les instillations de BCG.
- Etablir une corrélation entre la réponse PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) induite par les instillations de BCG et la réponse locale tumorale

# **MATERIEL ET METHODES**

## 4 MATERIEL ET METHODES

### 4.1 DEROULEMENT DE L'ETUDE

Le travail de cette thèse a consisté en l'écriture du protocole de recherche, la recherche d'un financement, la dépose du dossier auprès des instances, l'inclusion des patients dans l'étude avec la collecte prospective des échantillons, l'analyse des échantillons et l'analyse des résultats.

L'écriture du protocole d'étude a été initiée courant du premier trimestre 2007. La première inclusion a été réalisée en décembre 2008, le temps d'obtenir les autorisations administratives et le financement.

Un financement de 13 200 Euros a été obtenu pour la réalisation de cette étude avec une subvention de Ligue Nationale contre le cancer, comités départementaux des régions Bretagne, Pays de Loire, Centre, Poitou/Charente dans le cadre de l'appel d'offre 2008 (7 200 Euros) et de la société INNATE PHARMA, (6 000 Euros). Le tableau 4 montre le budget de l'étude du point de vue des frais administratifs (4 242 Euros). Le supplément (8 958 Euros) du budget a été utilisé pour le règlement des réactifs pour le dosage des cytokines et des PBMC.

|                                                      | <b>Tarif unitaire</b> | <b>Quantité</b> | <b>Total</b>   |
|------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| Temps ARC promotion mise en place de l'étude-gestion | 203 €                 | 6               | 1 218 €        |
| Temps ARC promotion monitoring                       | 203 €                 | 3               | 609 €          |
| Pharmacovigilance                                    | 175 €                 | 5               | 875 €          |
| Assurance                                            | 1 090 €               | 1               | 1 090 €        |
| Taxe Afssaps                                         | 450 €                 | 1               | 450 €          |
| <b>TOTAL</b>                                         |                       |                 | <b>4 242 €</b> |
| <b>Réactifs INSERM</b>                               |                       |                 | <b>8 958 €</b> |

Tableau 4 : Tableau récapitulatif du budget de l'étude

Le protocole d'étude a eu la référence Eudract : n° 2008-004677-18 ; BRD 07/11-U. Il a débuté avec la première inclusion en décembre 2008. Il a été clos en mai 2011.

En résumant, l'étude consistait pour les patients inclus dans l'étude à la réalisation d'une prise de sang et d'un prélèvement d'urine avant et 4h après l'instillation de BCG lors de la 1<sup>ère</sup>, 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> instillation. Il n'y avait pas d'autre examen supplémentaire pour les patients.

Les échantillons de sang et d'urine, pour l'analyse des cytokines, ont été prélevés dans le service d'urologie avant et 4 heures après les 1<sup>ère</sup>, 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> instillations de BCG. Ils ont été ensuite mis en congélation et stocké à -80°C à l'INSERM U892.

En ce qui concerne l'analyse des cellules effectrices (PBMC), le prélèvement de sang a été réalisé avant l'instillation lors des 1<sup>ère</sup>, 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> instillations de BCG. Un premier traitement du sang par un Ficoll était réalisé juste après le prélèvement avant d'être mis en congélation et stocké à -80°C à l'INSERM U892.

Après avoir prélevé et stocké tous les échantillons de l'étude, l'analyse des cytokines et le marquage des cellules effectrices (PBMC) a été réalisée à l'INSERM U892 d'avril 2011 à novembre 2011.

Durant l'étude 3 visites de monitoring ont été réalisées : 25/11/2009 ; 20/09/2010 et 25/05/2011, la dernière correspondant à la visite de clôture.

Un Evènement Grave Indésirable Attendu (EIG-A) a été déclaré au promoteur durant l'étude. Il s'agissait d'une épididymite fistulisée à la peau survenue après la 3<sup>ème</sup> instillation de BCG (09/02/2009) et nécessitant un geste de chirurgie locale (19/05/2009). Cet EIG était lié au traitement par BCG et non au protocole. Cet évènement a abouti à diminuer la dose de BCG de 1/3 à partie de la 4<sup>ème</sup> instillation sans interrompre le traitement.

## **4.2 CRITERES D'INCLUSION ET D'EXCLUSION**

### **4.2.1 Critères d'inclusion**

Les critères d'inclusion ont été

- Tous les patients ayant une indication de traitement par instillation endo-vésicale de BCG pour un cancer de la vessie.
- Patient assuré social ou bénéficiaire d'une telle assurance

### **4.2.2 Critères d'exclusion**

Les critères d'exclusion ont été :

- Personne mineure ou protégée par la loi
- Personne qui n'est pas affiliée à un régime de sécurité sociale ou bénéficiaire d'un tel régime
- Personne enceinte
- Patient ayant un traitement par corticothérapie
- Contre-indication au traitement par instillation endo-vésical de BCG (annexe 3)
  - Patients recevant un traitement immunosuppresseur (chimiothérapie ou radiothérapie ou tout autre traitement immunosuppresseur) ou souffrant d'un déficit immunitaire, du fait du risque de réaction systémique au BCG.
  - Patients présentant une tuberculose active, à cause du risque d'exacerbation ou de réaction systémique concomitante au BCG.
  - Patients présentant des symptômes ou des antécédents de réaction systémique au BCG.
  - Patients présentant une fièvre, sauf si la cause et les conséquences de celle-ci sont déterminées.
  - Patients présentant une infection bactérienne des voies urinaires, jusqu'à résolution de cette infection.

- Patients ayant subi une résection transurétrale ou chez qui le cathétérisme vésical a provoqué un traumatisme (avec hématurie) au cours des semaines précédentes.
- Antécédent de radiothérapie de l'aire vésicale.

## **4.3 POPULATION**

Notre étude a été réalisée dans le cadre d'une étude de recherche clinique prospective auprès de patients traités dans le service d'urologie du CHU de Nantes par des instillations endo-vésicale de BCG pour un cancer de la vessie.

Nous avons inclus 23 patients consécutivement de décembre 2008 à février 2011.

La population a été constituée de 4 femmes et 19 hommes dont la moyenne d'âge a été de  $68,3 \pm 8,3$  ans.

## **4.4 ANTECEDENTS DE TUMEUR UROTHELIALE**

Un antécédent de tumeur de vessie a été noté chez 6 patients avant l'inclusion dans l'étude.

Tous les patients ont été pris en charge par des résections endoscopiques de la tumeur de vessie.

Dans tous les cas il s'agissait de carcinome urothélial non infiltrant le muscle vésical (TVNIM) de stade pTa ou pT1. Dans 50% des cas la tumeur a été de haut grade et dans 50% des cas de bas grade.

Un traitement par instillations endo-vésicales a été réalisé dans 3 de ces 6 cas avec 1 cas d'instillation post-opératoire précoce d'amétycine et 2 cas d'instillation de BCG réalisées près de 10 ans avant l'inclusion dans l'étude.

Aucun patient n'a eu d'antécédent de tumeur urothéliale du haut appareil urinaire.

## 4.5 TUMEUR DE VESSIE

Tous les patients ont eu avant l'inclusion dans l'étude au moins une résection endoscopique d'une tumeur de vessie confirmant le diagnostic

### 4.5.1 1<sup>ère</sup> résection de tumeur de vessie

La première résection de tumeur de vessie a été réalisée de novembre 2008 à juin 2010. Elle a été réalisée sous HEXVIX\* dans 10 cas (43,5%) qui est un produit qui permet une meilleure détection des tumeurs de vessie par fluorescence.

### 4.5.2 Type histologique de la 1<sup>ère</sup> résection

Dans tous les cas il s'agissait d'un carcinome urothélial.

Le type histologique et le grade tumoral de cette 1<sup>ère</sup> tumeur sont représentés dans le tableau 5.

|                                               | n  | %                      |
|-----------------------------------------------|----|------------------------|
| <b>Stade histologique</b>                     |    |                        |
| Cis isolé                                     | 4  | 17,4 %                 |
| pTa                                           | 4  | 17,4 %                 |
| pT1                                           | 15 | 65,2 %                 |
| <b>Carcinome in situ associé (pTa ou pT1)</b> |    |                        |
| pTa + Cis                                     | 4  | 17,4 % (100% des pTa)  |
| pT1 + Cis                                     | 7  | 30,7 % (46,7% des pT1) |
| <b>Grade histologique</b>                     |    |                        |
| Bas grade                                     | 3  | 13,1 %                 |
| Haut grade                                    | 20 | 86,9 %                 |

Tableau 5 : Données histologique de la 1<sup>ère</sup> résection de tumeur de vessie

#### **4.5.3 2<sup>ème</sup> résection de tumeur de vessie**

Une deuxième résection endoscopique a été réalisée dans 15 cas de novembre 2008 à octobre 2010. Le délai moyen entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> résection a été de  $54,5 \pm 22,4$  jours.

Cette deuxième résection a été réalisée sous HEXVIX\* dans 12 cas (80%). Elle a été réalisée chez 14 des 15 patients (93,3%) ayant une tumeur de stade pT1 ; et dans 1 cas (25%) de patients ayant une tumeur pTa + Cis.

#### **4.5.4 Type histologique de la 2<sup>ème</sup> résection**

Dans 10 cas (66,7%), il n'y avait plus de tumeur résiduelle. Une persistance de Cis isolé a été observée dans 4 cas (26,7%). Une persistance tumorale a été notée dans 1 cas (6,6%) sous la forme d'une tumeur de stade pT1a + Cis. Initialement ce patient avait une tumeur de stade pT1 avec du Cis. Il n'a pas été réalisé de 3<sup>ème</sup> résection avant de débiter les instillations de BCG, jugeant cette 2<sup>ème</sup> résection complète.

Au final, tous les patients avaient une TVNIM à haut risque de récurrence ou de progression car de stade soit pT1 soit avec la présence de Cis.

### **4.6 TRAITEMENT PAR INSTILLATIONS DE BCG**

Tous les patients ont eu des instillations de BCG (Bacille de Calmette et Guérin) (ImmuCyst\*) pour la prise en charge de la TVNIM à haut risque.

Le délai moyen entre la dernière résection de vessie et le début des instillations de BCG a été de  $58,7 \pm 27,2$  jours.

La première instillation de BCG a été réalisée, dans le cadre du protocole, en décembre 2008 et la dernière en mars 2011.

Avant chaque instillation, les patients ont réalisé un Examen Cyto-Bactériologique des Urines (ECBU) pour s'assurer de la stérilité des urines. En cas d'infection, un traitement antibiotique était administré et le traitement de BCG décalé d'une semaine.

Le mode d'administration du BCG a été réalisé par instillation endo-vésicale après avoir mis en place une sonde vésicale de manière non traumatique et dans des conditions stériles d'asepsie. Le produit d'instillation était conservé 2 heures dans la vessie puis éliminé lors d'une miction volontaire.

Tous les patients sauf 1 ont eu un schéma classique de 6 instillations de BCG à la dose de 81mg, 1 fois/semaine pendant 6 semaines. Dans un cas, la dose a été diminuée à 27mg pour un problème de tolérance (orchite) à partir de la 4<sup>ème</sup> instillation.

Le traitement a été réalisé avec la fréquence 1 fois/semaine pendant 6 semaines dans 19 cas (82,3%). Dans 4 cas (17,7%), le traitement a été décalé d'une semaine supplémentaire entre deux instillations du fait d'une infection urinaire.

## **4.7 CONTROLE DES PATIENTS A LA FIN DU BCG**

Après le cycle de 6 instillations de BCG, tous les patients ont eu un contrôle de l'efficacité du traitement par un examen endoscopique (cystoscopie) ± cytologique.

Le délai moyen entre la dernière instillation de BCG et le contrôle endoscopique a été de  $42,9 \pm 15,5$  jours.

Une cytologie urinaire a été réalisée dans 13 cas et était systématiquement normale sans cellules dysplasiques.

L'aspect endoscopique de la vessie a été interprété comme normal dans 10 cas (43,4%). Dans les 13 autres cas (56,6%), il était vu des plaques rouges suspectes soit de Cis soit de réactions inflammatoires post-BCG. Dans aucun cas il n'a été vu de tumeur papillaire.

Des biopsies de vessie ont été réalisées au bloc opératoire pour le contrôle post-BCG dans 17 cas (73,9%). Dans 14 cas, il n'y avait pas de tumeur résiduelle ni de Cis. Dans 2 cas, il y avait du Cis isolé. Dans 1 cas, il a été mis en évidence une tumeur de stade pT1 + Cis alors que l'aspect endoscopique était interprété comme normal.

Au final, à l'issue des 6 instillations de BCG et du contrôle endoscopique ± biopsique, un échec du traitement d'attaque a été observé dans 3 cas (13%) soit par la persistance de Cis (2 cas) ou d'une tumeur pT1 + Cis (1 cas).

## 4.8 SUIVI DES PATIENTS APRES LE BCG

A l'issue du traitement d'attaque, 3 (13%) patients ont été en échec d'emblée du fait d'une persistance d'une tumeur à l'issue des 6 instillations d'attaque (patient réfractaire au BCG), 7 (30,4%) ont été surveillés et 13 (56,6%) ont eu un traitement d'entretien de BCG soit dans le cadre du protocole d'entretien URO-BCG 4 (PHRC national) soit hors protocole (fin des inclusions) à raison de 3 instillations à 1/3 de dose tous les 6 mois. (Figure 11)

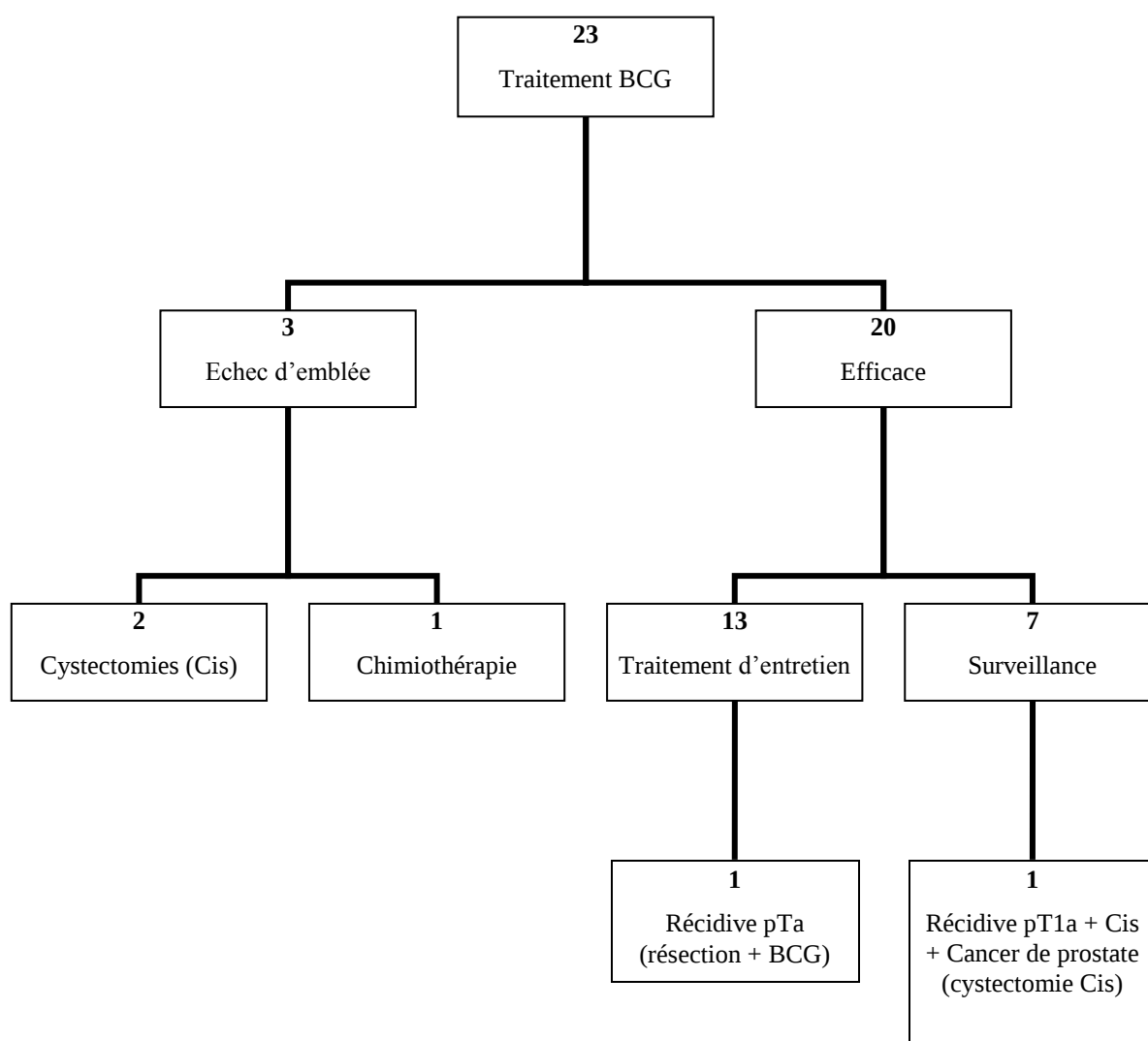


Figure 11 : Suivi des patients après instillation de BCG

#### **4.8.1 Patients en échec d'emblée du BCG (réfractaire)**

Parmi les 3 patients en échec du traitement d'attaque de BCG (réfractaire au BCG), les 2 patients qui avaient une persistance de Cis ont eu une cystectomie dans les 3 mois qui ont suivi. Le contrôle histologique final de la pièce opératoire a mis en évidence une persistance du Cis sans tumeur associée. Il n'y avait pas non plus d'atteinte ganglionnaire.

Le patient ayant une tumeur persistante après le BCG de stade pT1 + Cis, a eu une 2<sup>ème</sup> résection à distance du contrôle (6 mois) qui a mis en évidence une tumeur infiltrant le muscle de stade pT2 + Cis (TVIM). Un nouveau bilan d'extension a mis en évidence une maladie métastatique, le patient a été traité par chimiothérapie systémique sans cystectomie.

#### **4.8.2 Suivi à moyen terme**

Le recul moyen de la population a été de  $16,9 \pm 8,4$  mois après le contrôle cystoscopique post-BCG. Aucun patient n'est décédé durant ce suivi.

Les patients ont tous eu une surveillance régulière tous les 3 mois puis tous les 6 mois avec une cytologie urinaire et un examen endoscopique.

Lors de ce suivi, en plus des 3 patients en échec d'emblée du BCG, 2 autres ont eu une récurrence de tumeur vésicale. Dans 1 cas la récurrence a été précoce à 3 mois après le contrôle post-BCG, la récurrence tumorale était de stade pTa de haut grade et le patient a été traité par une nouvelle résection endoscopique avec un traitement d'entretien de BCG. Il n'a pas eu d'autre récurrence par la suite. Il est à noter que ce patient avait eu un contrôle post-BCG seulement par un examen cystoscopique et cytologie mais sans biopsie de vessie. Ce patient était dans le groupe de traitement d'entretien de BCG.

Dans l'autre cas, le patient a eu une récurrence à 9 mois après le contrôle post-BCG. La récurrence tumorale a été de stade pT1a + Cis et il a été découvert associé un cancer de la prostate. Le patient a été alors traité par une cysto-prostatectomie avec comme examen histologique final la présence de Cis isolé sans atteinte ganglionnaire. Il est à noter que ce patient avait eu un contrôle post-BCG par un examen cystoscopique et cytologie et également des biopsies de vessie qui étaient normales. Ce patient n'avait pas eu de traitement d'entretien de BCG.

## 4.9 PRELEVEMENTS SANG ET URINE

Les patients ont eu lors de leur traitement par instillations de BCG, des prélèvements de sang et d'urine pour réaliser l'analyse des cytokines et des PBMC. Les prélèvements ont été réalisés par l'infirmière avant et 4 heures après les 1<sup>ère</sup>, 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> instillations de BCG. (Tableau 6)

Les prélèvements de sang ont été veineux:

- 5 ml de sang sur tube sec prélevé avant et 4 heures après l'instillation de BCG puis mis en congélation à -80°C, pour l'analyse des cytokines sanguines
- 30 ml de sang sur tube hépariné avant l'instillation de BCG, pour l'analyse de la réponse PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell).

Les prélèvements d'urine ont été faits comme pour un examen cytologique des urines, sans asepsie particulière et lors d'une miction volontaire. Les urines ont été conservées dans un tube non stérile mis en congélation à -80°C pour l'analyse des cytokines urinaires. Le volume des prélèvements étaient variable en fonction du volume uriné.

| Jour                                | Heure         | Sang                                   | Urine                 |
|-------------------------------------|---------------|----------------------------------------|-----------------------|
| 1 <sup>ère</sup> instillation (J1)  | H0 (avant)    | - Tube Hépariné 30ml<br>- Tube sec 5ml | - Tube pour Cytologie |
|                                     | H4 (4h après) | - Tube sec 5ml                         | - Tube pour Cytologie |
| 3 <sup>ème</sup> instillation (J21) | H0 (avant)    | - Tube Hépariné 30ml<br>- Tube sec 5ml | - Tube pour Cytologie |
|                                     | H4 (4h après) | - Tube sec 5ml                         | - Tube pour Cytologie |
| 6 <sup>ème</sup> instillation (J42) | H0 (avant)    | - Tube Hépariné 30ml<br>- Tube sec 5ml | - Tube pour Cytologie |
|                                     | H4 (4h après) | - Tube sec 5ml                         | - Tube pour Cytologie |

Tableau 6 : Fréquence et type de prélèvement de sang et d'urines

Tous les prélèvements pour congélation à -80°C (urine et tube sec de sang) ont été réalisés par une infirmière dans le service d'urologie puis acheminés à l'unité INSERM dans les plus brefs délais à l'état frais pour être stockés. En cas de délai pour l'acheminement, ils étaient stockés dans un congélateur dans le service d'urologie à -10°C avant d'être emmenés à l'INSERM pour une congélation à -80°C.

Les prélèvements de sang sur tube hépariné pour l'analyse des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) n'étaient pas mis en congélation mais gardés à l'état frais puis acheminés rapidement à l'INSERM pour l'extraction des PBMC qui ont été ensuite mis en congélation (cf ci-dessous)

## **4.10 RECUPERATION ET CONGELATION DES PBMC**

La technique de Ficoll pour la récupération des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) a été réalisée sur les tubes de sang hépariné (30ml) à l'état frais, prélevés juste avant les instillations de BCG.

Les principes de la technique ont été les suivants :

### **1- Ficoll (à température ambiante)**

- Sous la hotte pour condition d'asepsie (pas de contamination)
- Prélèvement des 30ml de sang total sur tube hépariné
- Diluer à 1/2 avec du RPMI seul soit 30 ml de sang et 30ml de RPMI
- Prendre un tube sec de 50ml
  - Déposer 15ml de Ficoll au fond
  - Déposer dessus 30ml de sang dilué à 1/2 avec le RPMI en inclinant le tube (Rapport de 1/3 de Ficoll pour 2/3 de sang + RPMI)
- Centrifuger 20-25 minutes pour séparer les PBMC
  - 2000 tours/min sans frein (Vitesse 4, Frein 1, 2000 tours/min)

## 2- Récupération de PBMC

- Sortir le tube de la centrifugeuse sans le mélanger (Figure 12)
- Extraire à l'aide de la pipette le surnageant de sérum pour faciliter la prise des PBMC
- Récupérer à l'aide de la pipette l'anneau des PBMC (environ 10ml)
- Mettre les PBMC dans un nouveau tube sec de 50ml

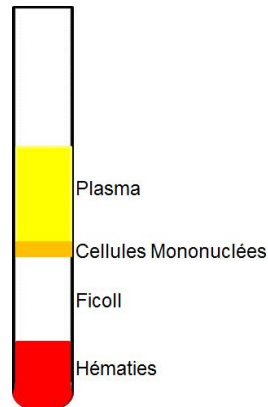


Figure 12 : Aspect du tube avant la récupération des PBMC

## 3- Rinçage du Ficoll

- Prendre le tube sec de 50ml avec les ~10ml de PBMC
- Ajouter 25 ml de PBS-EDTA 2mM
- Centrifuger 10 minutes pour éliminer le Ficoll  
2000 tours/min (Vitesse 9, frein 9, 2000 tours/min)

## 4- Récupération du culot cellulaire

- Après la centrifugation le culot cellulaire reste au fond du tube et le surnageant correspond au Ficoll + PBS-EDTA
- Vidange du surnageant Ficoll + PBS-EDTA pour ne garder que le culot cellulaire dans le tube
- Ajouter 25ml de RPMI en commençant par libérer le culot cellulaire doucement avec une pipette de 500µl sans faire de bulle pour ne pas traumatiser les cellules puis ensuite ajouter le reste de RPMI jusqu'à 25ml

- Centrifugation 10 minutes (pour éliminer les plaquettes)  
1200 tours/min (Vitesse 9, frein 9, 1200 tours/min)
- Refaire une centrifugation avec du RPMI durant la numération des cellules (cf infra). Reprendre le culot cellulaire avec 25ml de RPMI en commençant par libérer le culot cellulaire doucement avec une pipette de 500µl puis ensuite ajouter le reste de RPMI jusqu'à 25ml.
- Centrifugation 10 minutes  
1200 tours/min (Vitesse 9, frein 9, 1200 tours/min)

## **5- Numération des cellules**

- Pour la numération, prendre 50 µl du culot cellulaire dilué avec les 25ml de RPMI que l'on place sur une plaque
- Dilution au 1/2 avec le tampon de lyse des hématies (soit ajouter 50 µl du tampon de lyse des hématies) Attendre 5 mn pour la lyse.
- Dilution avec de l'éosine pour la coloration.
- Prendre une goutte de la dilution et la poser entre la lame et la lamelle (Malassez), le volume correspondant alors sous la lamelle est de 1µl
- Compter avec le microscope le nombre de cellule par colonne ou ligne.  
Le mieux étant de compter les 100 cases au total, sinon compter 1 ligne ou 2 et multiplier alors par 10 ou 5. Pour que le comptage soit juste compter un minimum de 100 cellules.
- La concentration cellulaire / ml = nb de cellules X 1000 X dilution d'éosine (2 ou 4) X rapport de ligne.

## **6- Congélation des cellules**

- Pour la congélation des PBMC, il faut au maximum 30 millions de cellules par tube
- Pour l'étude, prévoir 3 tubes de PBMC congelé.
- Récupérer le culot cellulaire avec une pipette de 500µl de SVF bien froid après avoir éliminé le RPMI
- Ajouter 1.75 ml de SVF (total de 2.25 ml de SVF + culot cellulaire)

- Ajouter au goutte à goutte en mélangeant 2.25 ml de SVF + DMSO 20% (soit concentration finale de DMSO à 10%)
- Répartir le tout dans 3 tubes pour congélation (1,5ml par tube)
- Transférer rapidement à -80°C dans les boîtes pour congélation.
- Transférer après au moins 24h à -80°C dans de l'azote liquide pour le stockage.

## **4.11 MARQUAGE DES PBMC ET ANALYSE AU FACS CANTO**

Les PBMC ont été marqués pour être analysé au FACS Canto. Les principes de la technique de marquage des PBMC ont été les suivants :

### **1- Décongélation des tubes**

- Sortir le tube du congélateur (-80°C) ou de l'azote liquide
- Le mettre sur de la glace pilée
- Sous la hotte pour condition d'asepsie (pas de contamination)
- Décongeler le tube de PBMC soit à température ambiante, soit dans un bain marie

### **2- Récupérer les PBMC**

- Prendre tube de 15 ml  
Mettre 5 ml de RPMI + 5 ml de SVF
- Une fois les parois du tube de PBMC décongelées, il existe un glaçon au milieu
- Mettre le glaçon directement dans le tube de 15ml (RPMI + SVF) et récupérer avec une pipette le fond du tube.
- Centrifuger le tube: 1500 T/min, frein 9, vitesse 9, 5 minutes
- Vider le tube pour garder le culot cellulaire
- Ajouter 10 ml de RPMI + SVF 10% + glutamine + Pénicilline-Streptomycine
- Centrifuger le tube: 1500 T/min, frein 9, vitesse 9, 5 minutes

- Vider le tube pour garder le culot cellulaire
- Ajouter 2 ml de RPMI + SVF 10% + glutamine + Pénicilline-Streptomycine

### **3- Numération des PBMC**

- Sur une plaque pour le compte cellulaire
  - Prendre 40 µl de PBMC (dans le mélange de 2ml précédent)
  - Ajouter 40 µl d'éosine (ce qui fait une dilution à ½)
- Compter les cellules avec la lame de Malassez
- Nombre de cellules / ml = nb de cellule X 2 (dilution) X rapport de ligne X 1000  
(Attention le nombre de cellules est à X2 car 2 ml dans le tube)

### **4- Mettre sur plaque**

- Prévoir 1 puits/patient + 1 puits témoin négatif (plaque 8 x 12 puits)
- Pour la technique de marquage, il faut au moins 200 000 cellules/puits sachant qu'un puits contient maximum 200µl
- Mettre ~ 100 µl/puits (pris dans les 2ml de PBMC + RPPMI + SVF 10% + glutamine + Pénicilline-Streptomycine) en fonction de la numération cellulaire.
- Centrifugation de la plaque: 1 minute, 1500 Tours/min
- Flicker la plaque pour éliminer le surnageant et ne garder que le culot cellulaire
- Essuyer le dessus de la plaque avec du papier absorbant

### **5- Lavage du culot cellulaire avant marquage**

- Ajouter dans chaque puits 150 µl de PBS + BSA 0.1% (ou du PBS + SVF à 2%)
- Centrifugation de la plaque: 1 minute, 1500 Tours/min
- Flicker la plaque pour éliminer le surnageant et ne garder que le culot cellulaire
- Essuyer le dessus de la plaque avec du papier absorbant

## 6- Solution mère des Anti-corps

- Préparation de la solution mère des anti-corps qui est diluée avec du PBS + BSA 0.1%
- La dilution des Anti-corps avec leur fluoro-chrome est représentée dans le tableau ci-dessous
- Pour la solution mère faire un mélange des anticorps (27.25 µl/puits) + PBS + BSA 0.1% (22.75 µl/puits). En fonction du nombre de puits à analyser, on multiplie les volumes.

| Anti-corps   | Fluoro-Chrome     | Dilution | Volume (µL)  |
|--------------|-------------------|----------|--------------|
| CD3          | APC H7            | 1/50     | 1            |
| CD4          | Chrome Orange     | 1/5      | 10           |
| CD8          | Pacific Blue (PB) | 1/10     | 5            |
| CD56         | PC7               | 1/20     | 2.5          |
| CD14         | APC               | 1/50     | 1            |
| CD19         | PER-CP-Cy 5.5     | 1/10     | 5            |
| Vδ2          | FiTC              | 1/20     | 2.5          |
| TCRαβ        | PE                | 1/40     | 1.25         |
| <b>TOTAL</b> |                   |          | <b>27.25</b> |

## 7- Marquage avec les Anticorps

- Mettre 50µl de solution mère/puits
- Prévoir 1 puits témoin (que du PBS + BSA 0.1% sans culot cellulaire et sans Ac)
- Laisser incuber dans le noir (papier aluminium) 15 - 20 minutes à température ambiante (*ou 20 – 30 minutes dans le frigo à 0°C*)

## 8-Lavage du surnageant des Anti-corps

- Après l'incubation, faire un 1<sup>er</sup> lavage avec du PBS + BSA 0.1%
- Ajouter 150µl de PBS + BSA 0.1% / puits
- Centrifugation de la plaque : 1 minute, 1500 Tours/min
- Flicker la plaque pour éliminer le surnageant et ne garder que le culot cellulaire
- Essuyer le dessus de la plaque avec du papier absorbant

- Faire un 2<sup>ème</sup> lavage
- Ajouter 150µl de PBS + BSA 0.1% / puits
- Centrifugation de la plaque : 1 minute, 1500 Tours/min
- Flicker la plaque pour éliminer le surnageant et ne garder que le culot cellulaire
- Essuyer le dessus de la plaque avec du papier absorbant

## 9- Préparation à la lecture par FACS

- Ajouter 150µl de PBS + BSA 0.1% / puits
- Mettre le tout (PBS + BSA 0.1% et Culot cellulaire) dans des tubes pour FACS

## 10- Lecture au FACS Canto

- Une fois les PBMC marqués et prêts pour la lecture, chaque tube étaient analysés de manière automatique par le FACS Canto avec le logiciel BD FACS Diva Software\* après avoir fait les réglages initiaux.
- L'aspect au FACS pour chaque tube est représenté dans la figure 13. Les concentrations pour chaque marquage ont été obtenues de manière automatique.

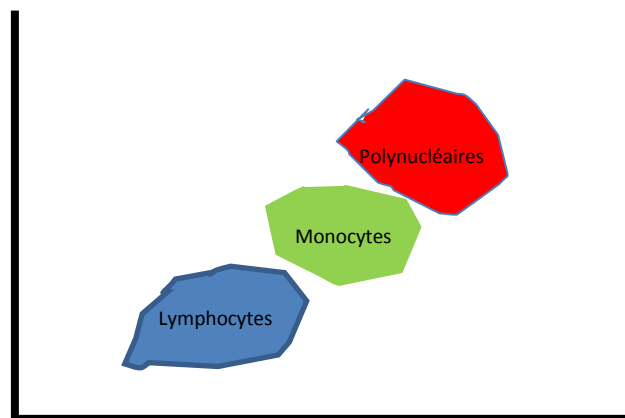


Figure 13 : Aspect au FACS de l'analyse des PBMC

- Les résultats ont été enregistrés dans une base de données Excel\* pour l'analyse statistique.

## 4.12 MARQUAGE DES CYTOKINES ET ANALYSE AU FACS ARRAYS

Les dosages des cytokines urinaires et sanguines ont été réalisés à l'aide du Kit CBA Flex (BD<sup>®</sup>) pour être analysé au FACS arrays sur plaque. Les principes de la technique de dosage des cytokines ont été les suivants :

### 1- Décongélation des tubes

- Les échantillons étaient stockés dans le congélateur à -80°C
- Sortir les prélèvements du congélateur (-80°C)
- Décongélation à température ambiante ou dans le bain marie

### 2- Création de la gamme de Standards

- Prendre le standard lyophilisé de TH1/Th2/Th17 (petite bille)
- Les mettre dans un tube de 15ml
- Reconstituer le standard en y ajoutant 2 ml de « Diluent Assay »
  - Laisser la reconstitution pendant 15 minutes à température ambiante
  - Ne pas vortexer
  - Ce tube correspond au « Top Standard »
- Prendre 8 tubes de FACS de 5ml
- Les identifier pour la dilution
  - 1/2    1/4    1/8    1/16    1/32    1/64    1/128    1/256
- Mettre 300µl du « Diluent Assay » dans chaque tube (Figure 14)

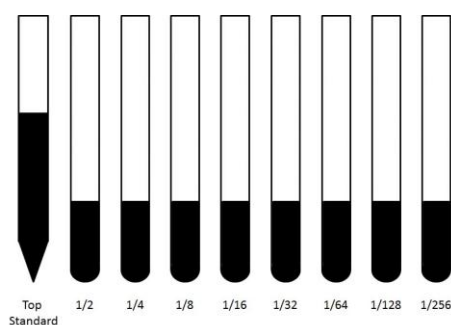


Figure 14 : Gamme de dilution des standards

- Faire la dilution en prenant 300µl dans le tube « Top Standard » pour le mettre dans le tube 1/2 avec la pipette en mélangeant et rinçant avec la pipette
- Ensuite prendre 300µl de ce mélange du tube 1/2 pour le mettre dans le tube 1/4 avec la pipette en mélangeant et rinçant avec la pipette
- Puis on répète cette manipulation ainsi de suite jusqu'au tube 1/256 (Figure 15)

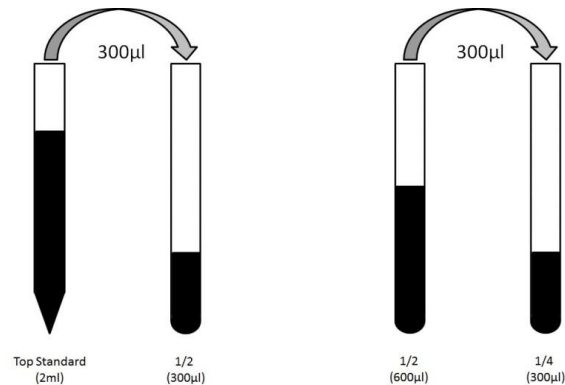


Figure 15 : Création de la gamme de standard

- Ajouter à la fin un tube 0 qui ne contient que du « Diluent Assay » (contrôle négatif)
- Au final il y a donc 10 tubes pour la gamme (Figure 16)

Top Standard    1/2    1/4    1/8    1/16    1/32    1/64    1/128    1/256    0

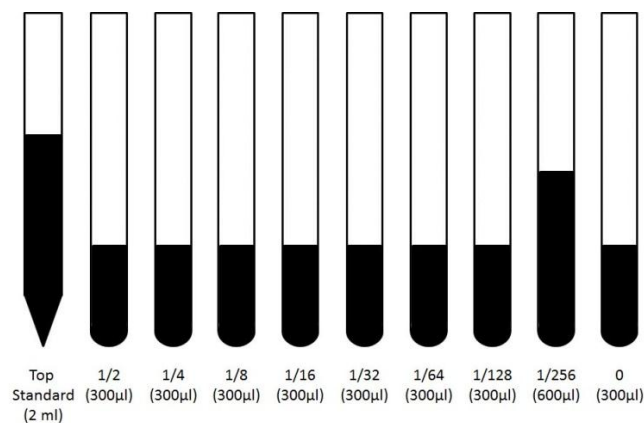


Figure 16 : Aspect final de la gamme de standard

### 3- Création de la solution mère

- Utilisation du Kit CBA Flex (BD<sup>®</sup>) Th1/Th2/Th17 permettant le dosage des cytokines suivantes : IL 2, IL 4, IL 6, IL 10, IL 17, IFN  $\gamma$  et TNF  $\alpha$ .
- Déterminer le nombre d'échantillon + ajouter la gamme de Standards (10 tubes)
- Prendre les flacons de « Capture Beads » de cytokine et les vortexer
- Prendre 10 $\mu$ l pour chaque tube à analyser de « Capture Beads » de chaque cytokine
- Mettre le tout dans un tube de 15ml intitulé « Mixte de Capture Beads »

*Par exemple : 15 tubes d'échantillons + 10 tubes de gamme = 25 tubes au total*

*Donc prendre 25x10 $\mu$ l de chaque « Capture Beads » de cytokine (7 au total)*

*PS : Nécessité de 50 $\mu$ l minimum de « Mixte de Capture Beads » par tubes*

- Le vortexer car les « beads » se mettent en suspension

### 4- Marquage et incubation

- Prendre une plaque de cytomètre avec des puits coniques
- Mettre dans chaque puits (200 $\mu$ l maximum) dans l'ordre suivant
  - 50 $\mu$ l de « Mixte de Capture Beads » après l'avoir bien vortexer
  - 50 $\mu$ l de la gamme (Figure 17) puis des échantillons
  - 50 $\mu$ l de « Detection Reagent »

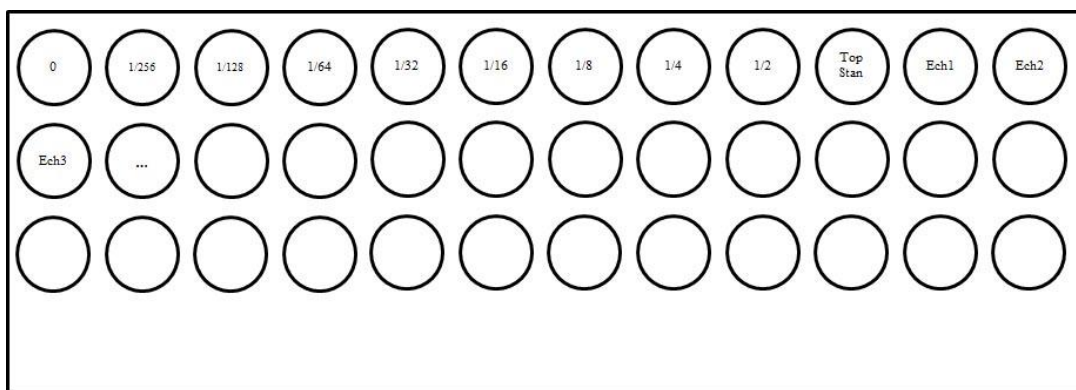


Figure 17 : Orientation d'une plaque de cytométrie pour FACS Arrays

- Laisser incuber 3 heures à l'abri de la lumière (papier aluminium) à température ambiante

## **5- Préparation de la plaque pour lecture par le cytomètre**

- Après les 3 heures d'incubation
- Faire un 1<sup>er</sup> lavage
  - Laisser le mélange initial
  - Ajouter dans chaque puits 50µl de « Wash Buffer »
  - Centrifugation de la plaque : 5 minutes, 2000 Tours/minute, Vitesse 9, Frein 9
- Faire un 2<sup>ème</sup> lavage
  - Aspirer les puits avec une pipette (ne pas cliquer la plaque car perte des « Beads »)
  - Ajouter 150-200µl de « Wash Buffer »
  - Centrifugation de la plaque : 5 minutes, 2000 Tours/minute, Vitesse 9, Frein 9
- Préparation pour l'acquisition
  - Aspirer les puits avec une pipette (ne pas cliquer la plaque car perte des « Beads »)
  - Ajouter 150-200µl de « Wash Buffer »

## **10- Lecture au FACS arrays**

- Une fois les cytokines marquées, elles étaient laissées sur la plaque. La lecture a été automatisée avec le FACS arrays en passant la plaque complète. Lors de chaque manipulation le FACS a été étalonné (setup). L'acquisition a été réalisée avec le logiciel BD FACS Array Système Software\*.
- L'acquisition des résultats ont été obtenus de manière automatique. Afin d'avoir une meilleure qualité de l'acquisition, les premières analyses ont ensuite été filtrées avec le logiciel FCS Filter\*.
- Après ce filtre, les données brut de l'acquisition ont été analysées par le logiciel FCAP Array\*.
- Les données ont ensuite été enregistrés dans une base de données Excel\* pour l'analyse statistique.

## **4.13 ANALYSES STATISTIQUES**

Toutes les données cliniques et biologiques ont été saisies dans une base de données de type Excel\* 2010. L'analyse descriptive des données a été réalisée avec Excel\* et présentée sous forme de graphique ou de tableaux.

L'analyse statistique a été réalisée avec la version 5 de Statview\* (SAS Institute Inc). Les variables quantitatives ont été comparées par un test t de Student. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs pour un  $p < 0,05$ .

# RESULTATS

## 5 RESULTATS

### 5.1 ANALYSE DES CYTOKINES

Dans le protocole initial, il était prévu d'analyser et d'étudier la corrélation de la réponse des cytokines induite par les instillations de BCG dans le sang et dans l'urine. Les échantillons ont été congelés de manière prospective à -80°C pour une analyse globale des échantillons par FACS à la fin des inclusions.

Lors de la décongélation, les tubes d'urines étaient exploitables pour cette analyse sans problèmes particuliers.

Par contre, pour les tubes de sang sec, ils ont été congelés en l'état sans extraction préalable du sérum, comme prévu dans le protocole initial. En fait, lors de la décongélation, ces tubes ont été inexploitables du fait de la lyse cellulaire induite par la congélation-décongélation.

Par conséquent, l'analyse des cytokines sanguines n'a pas pu être réalisée. Ces résultats n'expriment donc que l'analyse des cytokines urinaires. Il n'a par conséquent pas été possible d'analyser une corrélation entre la production locale (urine) et systémique (sang) des cytokines lors du traitement par instillations de BCG.

### 5.1.1 Analyse des cytokines urinaires pour l'ensemble de la population

Le tableau 7 représente les valeurs des différentes cytokines en fonction de la date et de l'heure du prélèvement.

|              |                | IL-2          | IL-4        | IL-6          | IL-10         | IL-17         | IFN- $\gamma$ | TNF- $\alpha$ |
|--------------|----------------|---------------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>J1H0</b>  | <b>Moyenne</b> | <b>1,70</b>   | <b>0,28</b> | <b>62,77</b>  | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   |
|              | Ecart-Type     | 1,22          | 0,65        | 130,40        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
|              | Médiane        | 1,66          | 0,00        | 16,20         | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
|              | Minimum        | 0,00          | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
|              | Maximum        | 3,32          | 2,11        | 564,70        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
| <b>J1H4</b>  | <b>Moyenne</b> | <b>1,65</b>   | <b>0,73</b> | <b>91,62</b>  | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   | <b>2,40</b>   |
|              | Ecart-Type     | 1,53          | 1,34        | 275,72        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 10,73         |
|              | Médiane        | 1,88          | 0,00        | 25,24         | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
|              | Minimum        | 0,00          | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
|              | Maximum        | 5,36          | 5,35        | 1255,79       | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 47,99         |
| <b>J21H0</b> | <b>Moyenne</b> | <b>1,75</b>   | <b>0,76</b> | <b>35,10</b>  | <b>0,39</b>   | <b>2,42</b>   | <b>0,54</b>   | <b>0,37</b>   |
|              | Ecart-Type     | 1,82          | 2,31        | 109,83        | 1,83          | 11,34         | 2,55          | 1,71          |
|              | Médiane        | 1,67          | 0,00        | 4,19          | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
|              | Minimum        | 0,00          | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
|              | Maximum        | 8,06          | 10,54       | 517,00        | 8,58          | 53,18         | 11,95         | 8,03          |
| <b>J21H4</b> | <b>Moyenne</b> | <b>10,05</b>  | <b>0,16</b> | <b>54,90</b>  | <b>1,75</b>   | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>   | <b>0,56</b>   |
|              | Ecart-Type     | 21,51         | 0,52        | 143,19        | 7,36          | 0,00          | 0,00          | 2,00          |
|              | Médiane        | 3,11          | 0,00        | 11,38         | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
|              | Minimum        | 0,00          | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
|              | Maximum        | 97,77         | 1,76        | 653,98        | 33,83         | 0,00          | 0,00          | 8,85          |
| <b>J42H0</b> | <b>Moyenne</b> | <b>1,79</b>   | <b>0,66</b> | <b>30,84</b>  | <b>0,00</b>   | <b>1,00</b>   | <b>0,06</b>   | <b>0,00</b>   |
|              | Ecart-Type     | 1,41          | 1,37        | 79,44         | 0,00          | 4,78          | 0,29          | 0,00          |
|              | Médiane        | 2,23          | 0,00        | 3,33          | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
|              | Minimum        | 0,00          | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
|              | Maximum        | 4,88          | 5,96        | 371,70        | 0,00          | 22,94         | 1,38          | 0,00          |
| <b>J42H4</b> | <b>Moyenne</b> | <b>211,15</b> | <b>0,47</b> | <b>465,38</b> | <b>516,78</b> | <b>233,08</b> | <b>165,29</b> | <b>256,77</b> |
|              | Ecart-Type     | 671,35        | 1,14        | 1119,48       | 1641,52       | 562,53        | 755,34        | 855,42        |
|              | Médiane        | 5,47          | 0,00        | 13,81         | 5,30          | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
|              | Minimum        | 0,00          | 0,00        | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00          |
|              | Maximum        | 3160,56       | 4,99        | 4525,77       | 6863,08       | 2533,22       | 3627,13       | 3544,96       |

Tableau 7 : Valeur des dosages des cytokines urinaires

Les valeurs moyennes des dosages (en pg/ml) de toutes les cytokines excepté IL-4 à J42H4 ont été très élevées mais ont été la conséquence de 4 patients seulement sur les 23 qui ont eu une production très importante.

Les figures 18 à 24 représentent l'évolution des cytokines dans le temps pour l'ensemble de la population.

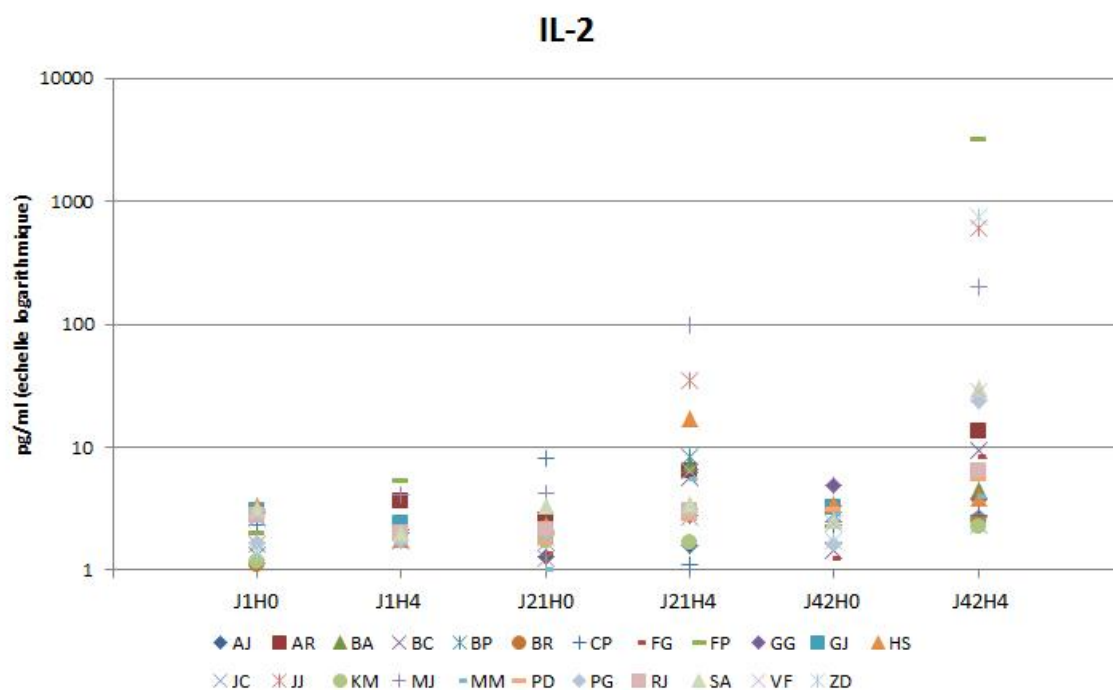


Figure 18 : Valeur d'IL-2 urinaire pour l'ensemble de la population

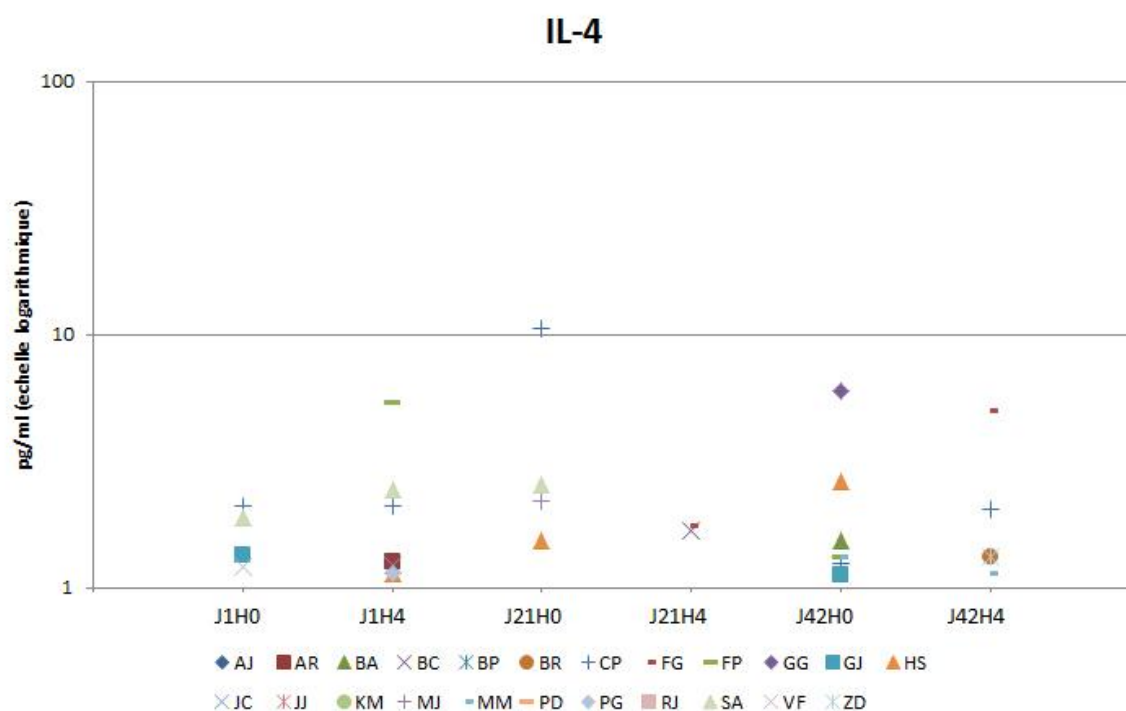


Figure 19 : Valeur d'IL-4 urinaire pour l'ensemble de la population

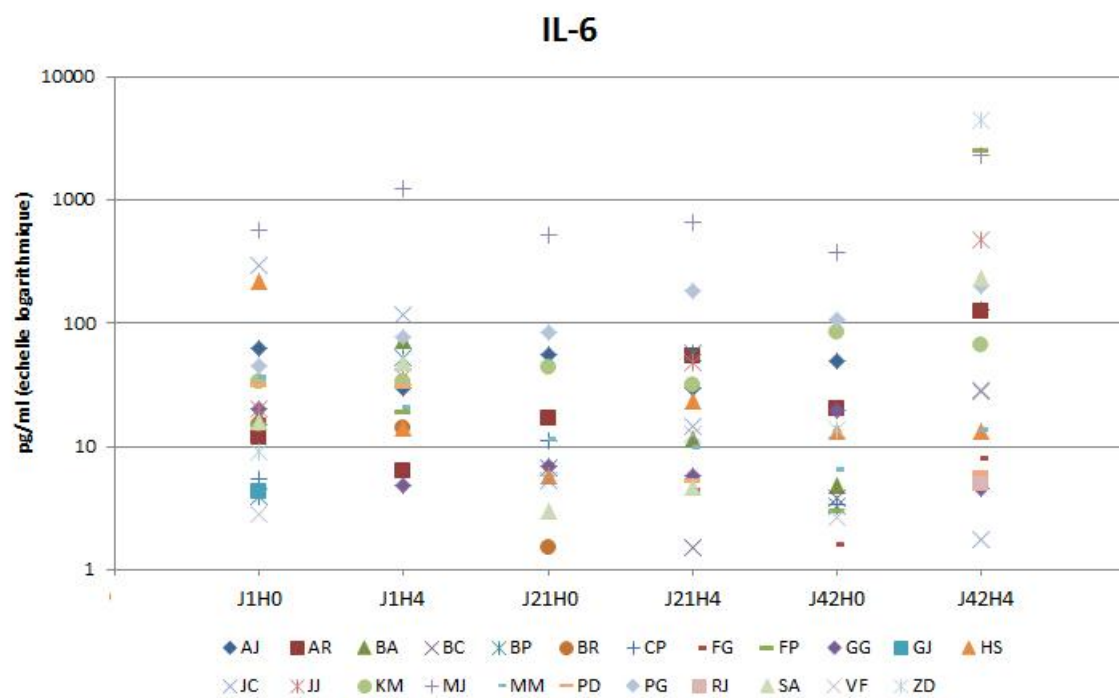


Figure 20 : Valeur d'IL-6 urinaire pour l'ensemble de la population

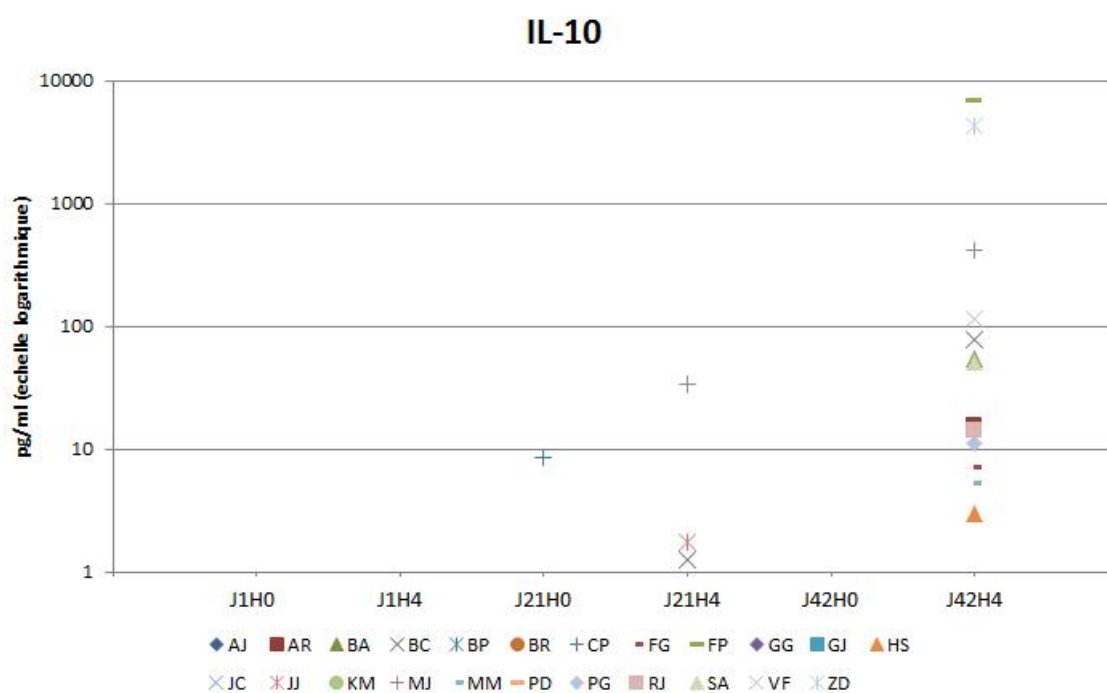


Figure 21 : Valeur d'IL-10 urinaire pour l'ensemble de la population

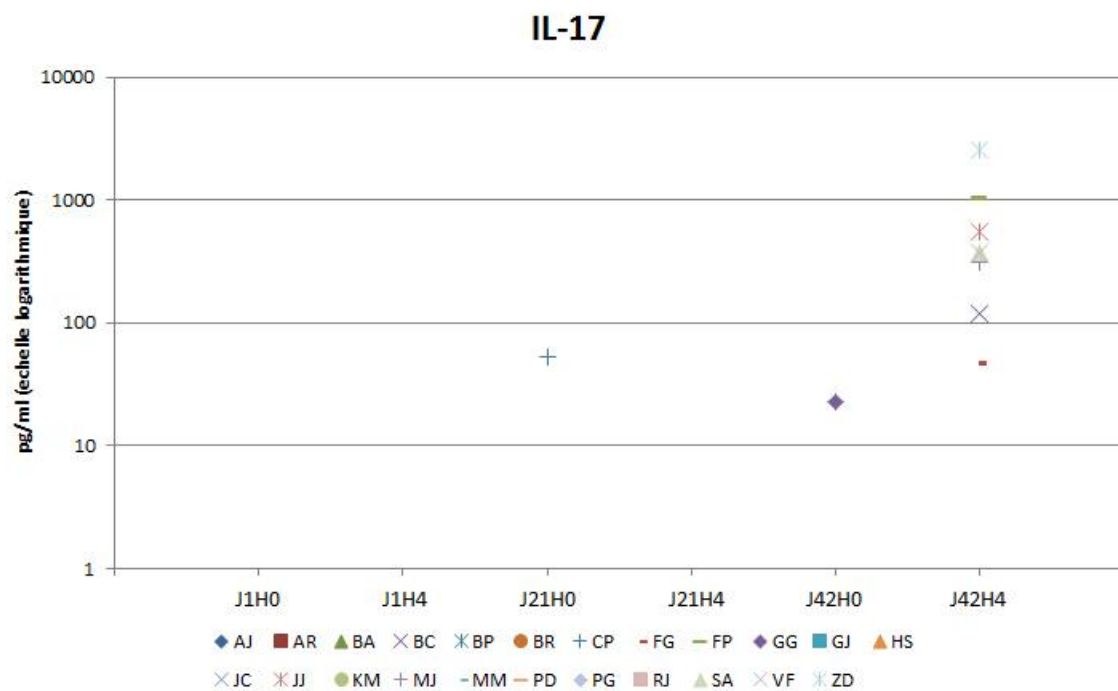


Figure 22 : Valeur d'IL-17 urinaire pour l'ensemble de la population

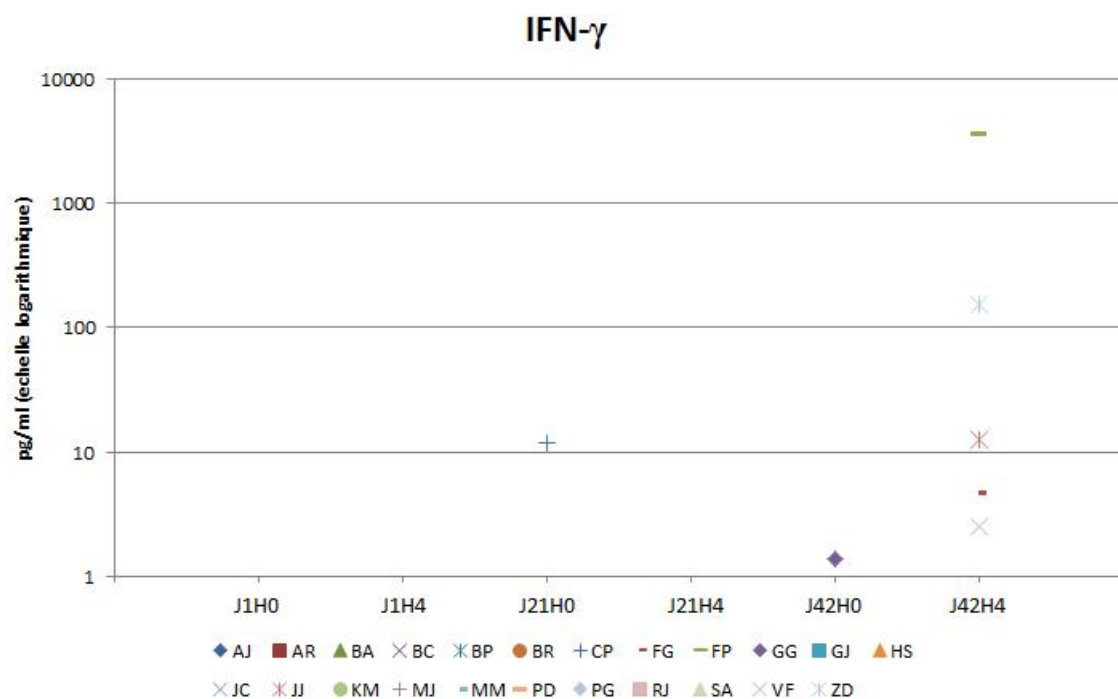


Figure 23 : Valeur d'IFN- $\gamma$  urinaire pour l'ensemble de la population

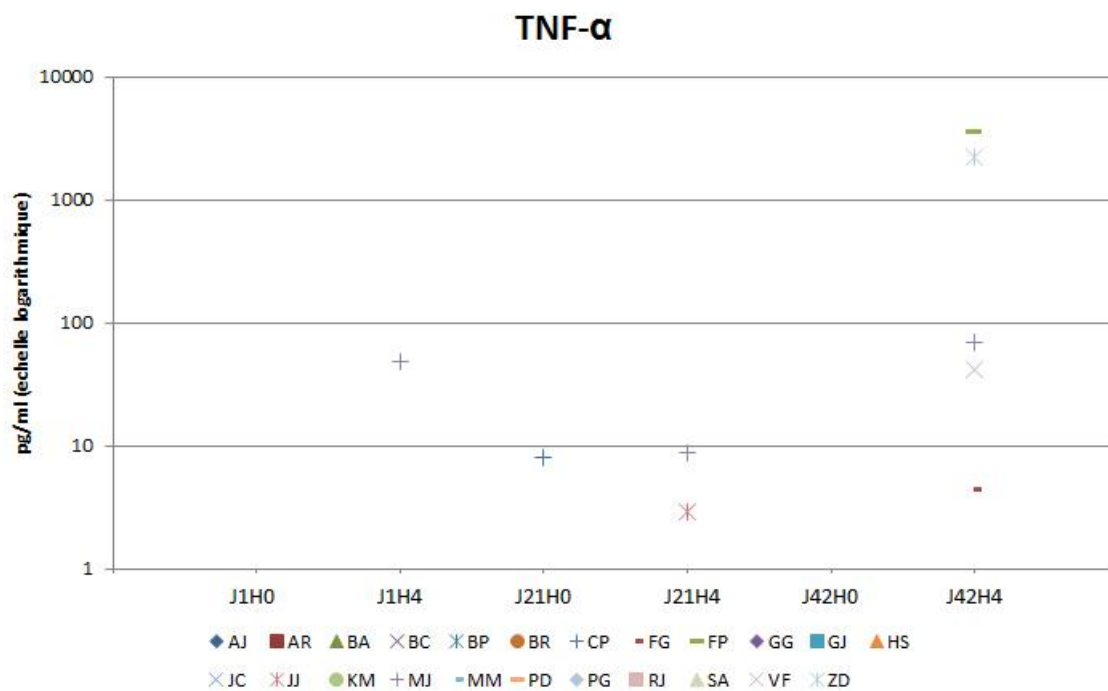


Figure 24 : Valeur de TNF- $\alpha$  urinaire pour l'ensemble de la population

Les figures 25 à 31 représentent l'évolution des cytokines en séparant les patients ayant profil « standard » des 4 patients ayant une « sur-expression » des cytokines sachant que cette sur-expression a essentiellement été observée à J42H4.

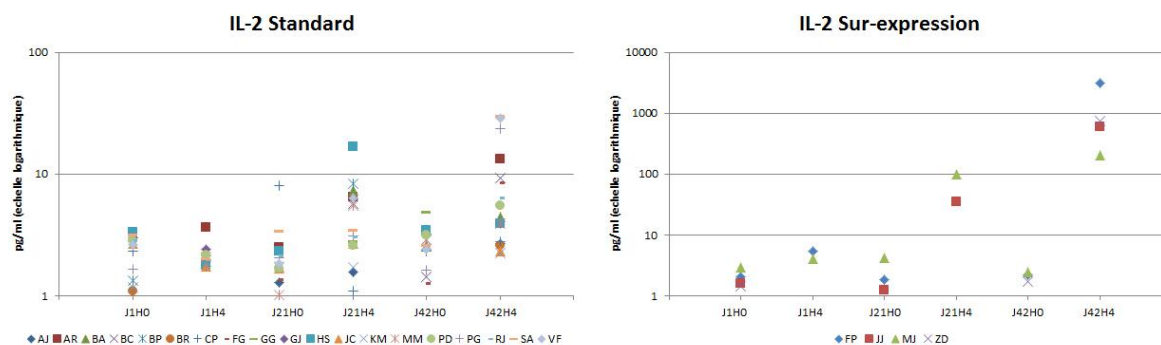


Figure 25 : Valeur d'IL-2 urinaire en fonction d'une « sur-expression » de cytokines

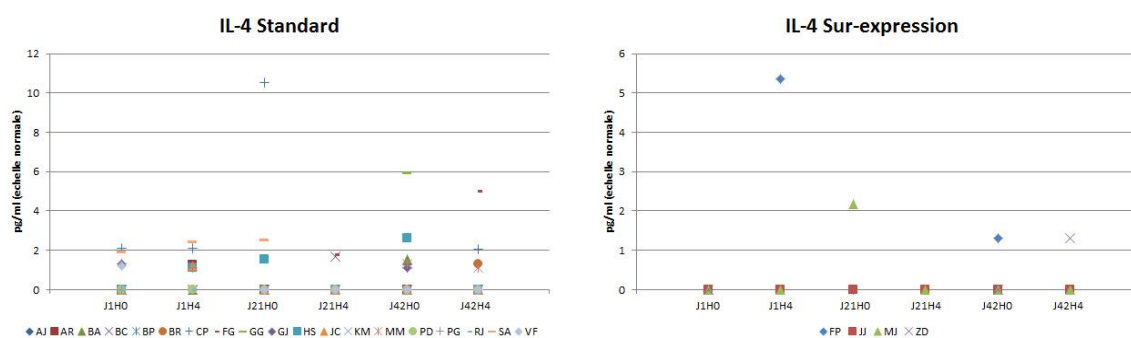


Figure 26 : Valeur d'IL-4 urinaire en fonction d'une « sur-expression » de cytokines

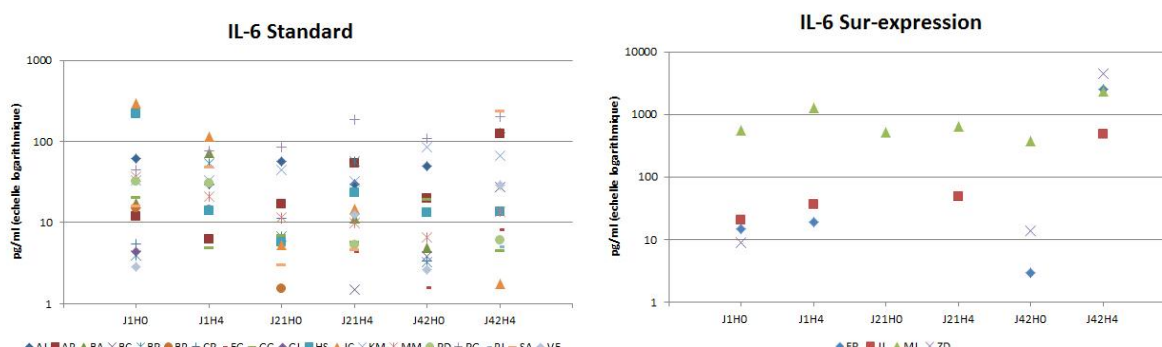


Figure 27 : Valeur d'IL-6 urinaire en fonction d'une « sur-expression » de cytokines

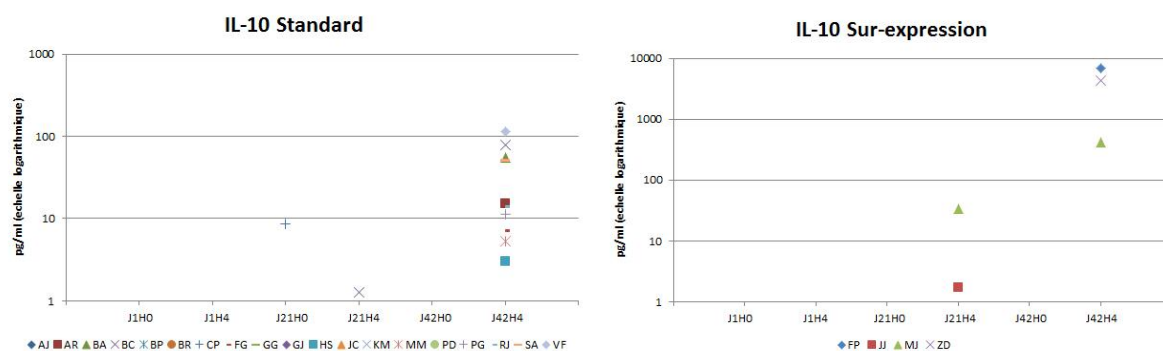


Figure 28 : Valeur d'IL-10 urinaire en fonction d'une « sur-expression » de cytokines

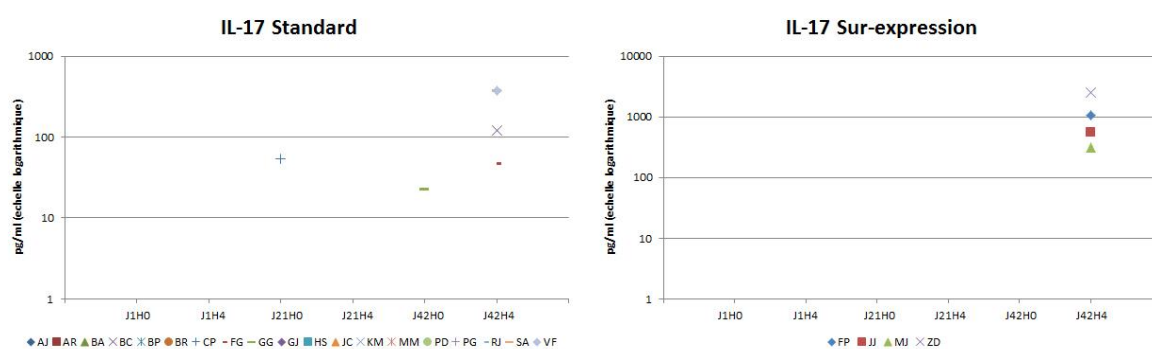


Figure 29 : Valeur d'IL-17 urinaire en fonction d'une « sur-expression » de cytokines

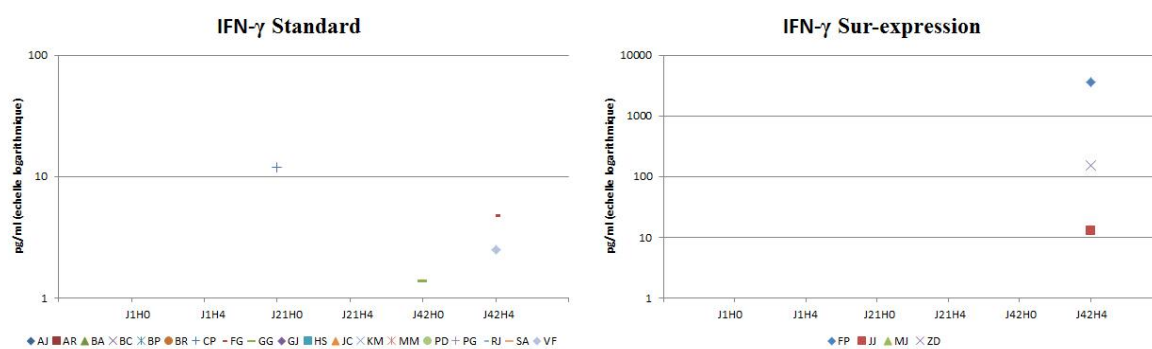


Figure 30 : Valeur d'IFN-γ urinaire en fonction d'une « sur-expression » de cytokines

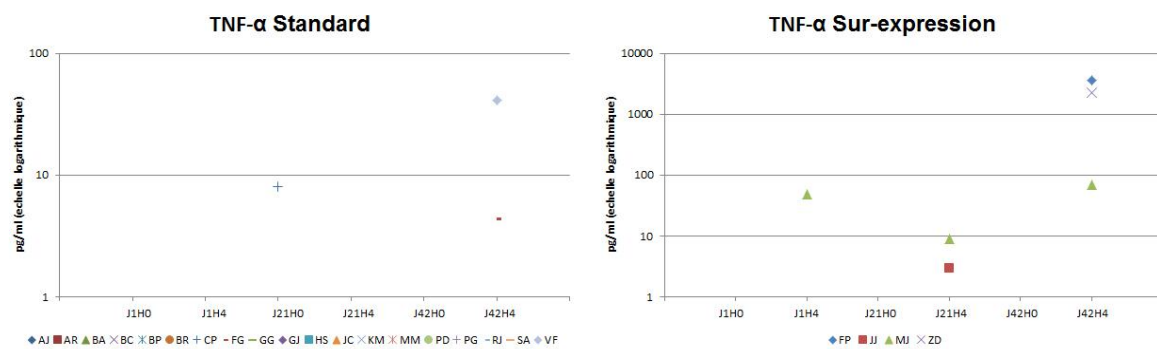


Figure 31 : Valeur de TNF- $\alpha$  urinaire en fonction d'une « sur-expression » de cytokines

### 5.1.2 Analyse de corrélation de la production des cytokines

Nous avons cherché à établir une corrélation de la production des cytokines en fonction du temps lors du traitement par BCG. Pour ce faire, nous avons fait une analyse statistique par régression. Cette analyse n'a pas pu être possible pour l'IL-17, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  du fait d'une production quasi nulle de cytokines durant le traitement. Par contre elle a été réalisée pour l'IL-2, IL-4, IL-6 et IL-10. Les valeurs de p sont représentées dans le tableau 8.

|                       | <b>IL-2</b>   | <b>IL-4</b>   | <b>IL-6</b>       | <b>IL-10</b>      |
|-----------------------|---------------|---------------|-------------------|-------------------|
| J1H0 vs J1H4          | 0.1036        | 0.1904        | <0.0001           | NA                |
| J21H0 vs J21H4        | 0.2466        | 0.6266        | <0.0001           | 0.8143            |
| J42H0 vs J42H4        | 0.9220        | 0.6872        | 0.1296            | NA                |
| J1H0 vs J21H0         | 0.0604        | 0.0005        | <0.0001           | NA                |
| J21H0 vs J42H0        | 0.9494        | 0.7100        | <0.0001           | NA                |
| J1H4 vs J21H4         | 0.1068        | 0.5443        | <0.0001           | NA                |
| <b>J21H4 vs J42H4</b> | <b>0.0100</b> | <b>0.0046</b> | <b>&lt;0.0001</b> | <b>&lt;0.0001</b> |

Tableau 8 : Valeur de p lors de l'analyse par régression

Pour l'IL-6, la production lors du traitement est corrélée de manière quasi systématique avec le temps et donc le traitement par BCG.

L'autre point important de cette analyse a été le fait que la production des cytokines (IL-2, IL-4, IL-6 et IL-10) a été corrélée dans tous les cas entre les dosages réalisées à J21H4 et ceux à J42H4. (Figure 32)

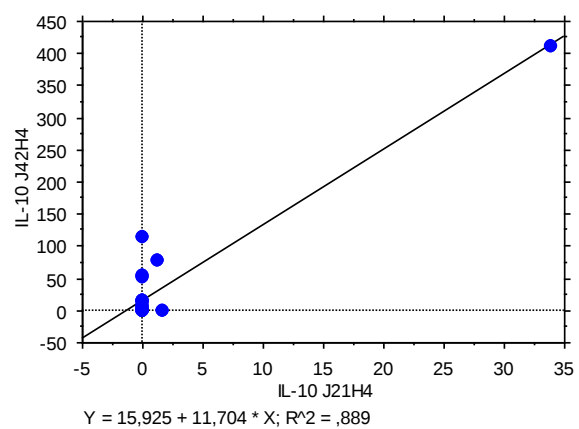
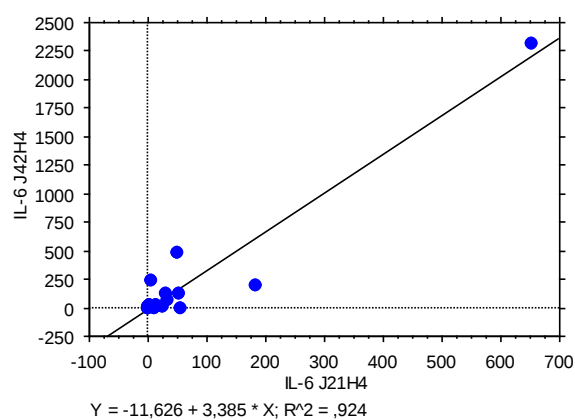
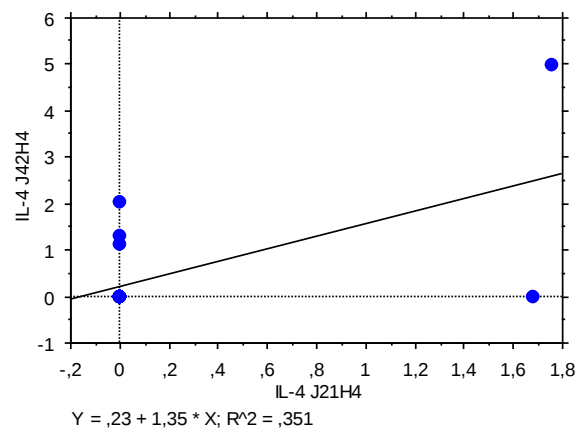
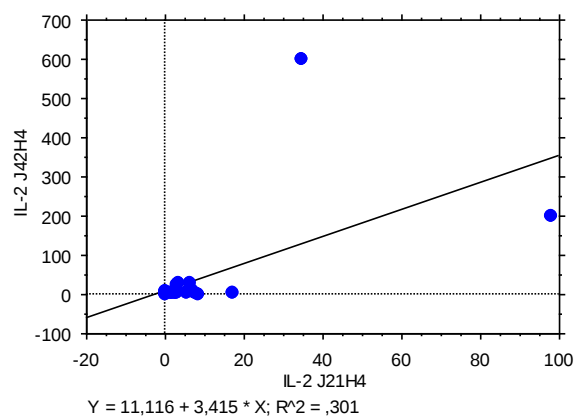


Figure 32 : Courbes de régression de l'IL-2, IL-4, IL-6 et IL-10 pour les dosages réalisés à J21H4 vs J42H4

### 5.1.3 Analyse des cytokines urinaires en fonction de la réponse au BCG

Parmi la population, 3 patients ont eu un échec d'emblée du BCG (réfractaire) avec le contrôle post-traitement qui a mis en évidence une persistance tumorale. De même, lors du suivi 2 patients ont présenté une récurrence tumorale. Les profils d'expression des cytokines de ces patients sont représentés dans les figures 33 et 34.

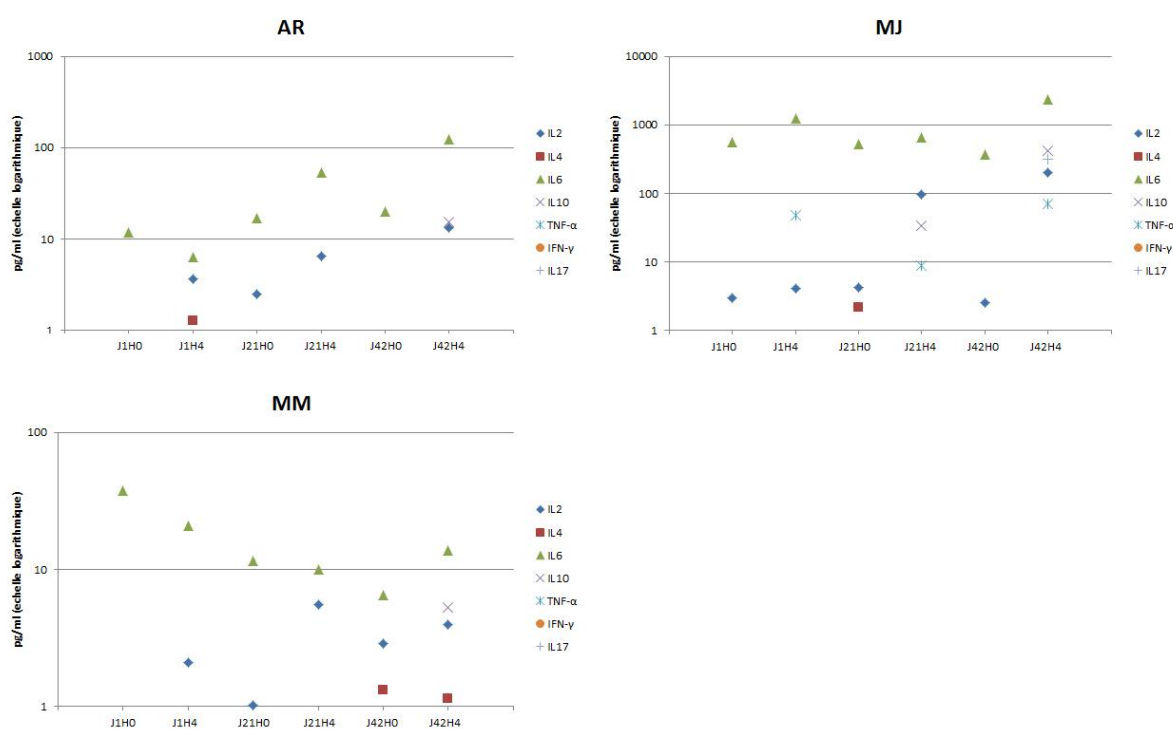


Figure 33 : Profils des patients en échec de BCG (réfractaire)

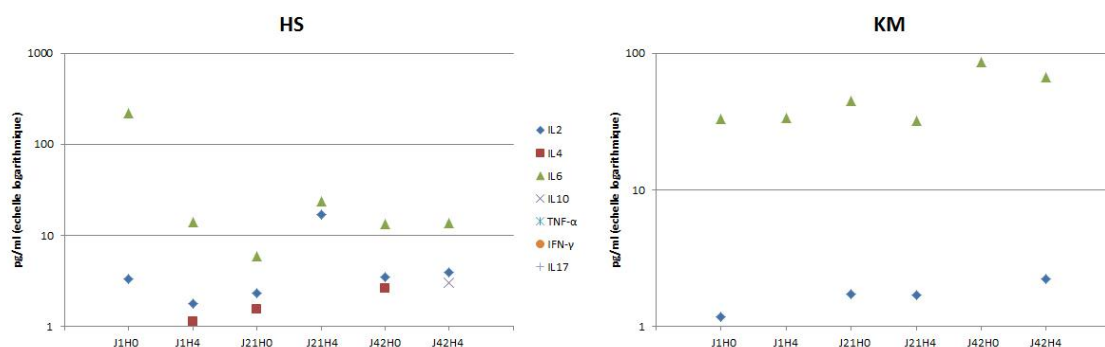


Figure 34 : Profils des patients ayant eu une récurrence après le BCG

Les figures 35 à 41 représentent l'évolution dans le temps de chaque cytokine en fonction de la réponse au traitement par BCG (Succès versus Echec/Récidive).

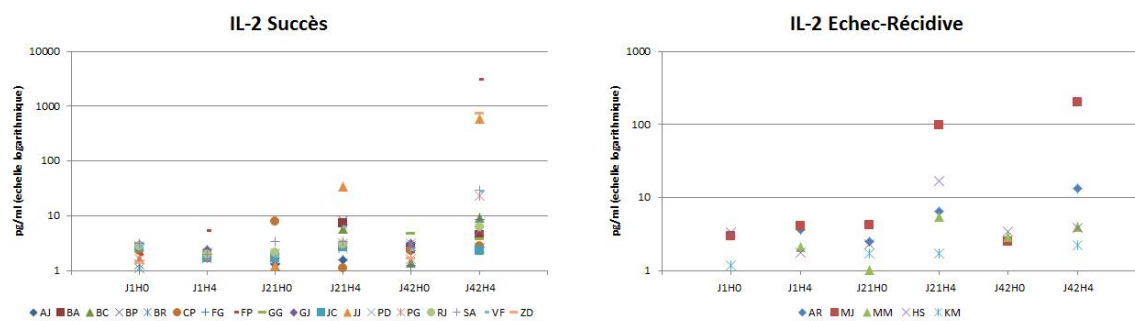


Figure 35 : Valeur d'IL-2 urinaire en fonction de la réponse au traitement par BCG

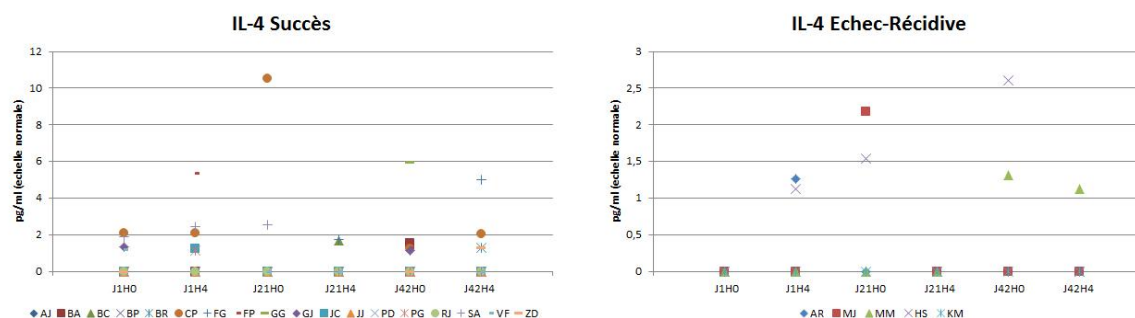


Figure 36 : Valeur d'IL-4 urinaire en fonction de la réponse au traitement par BCG

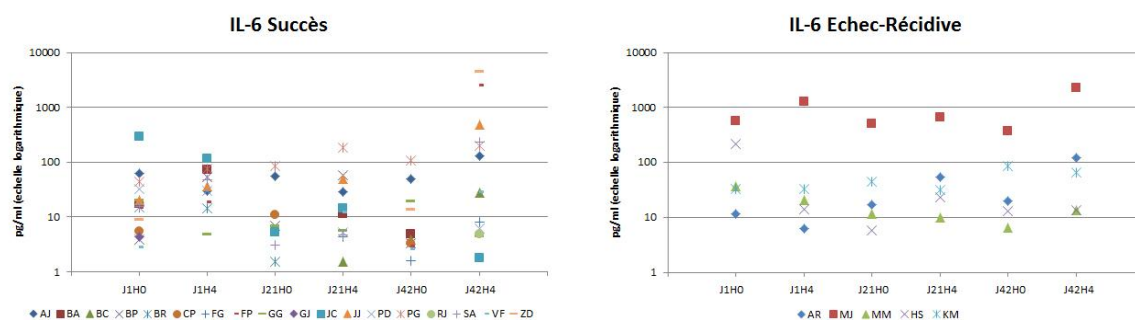


Figure 37 : Valeur d'IL-6 urinaire en fonction de la réponse au traitement par BCG

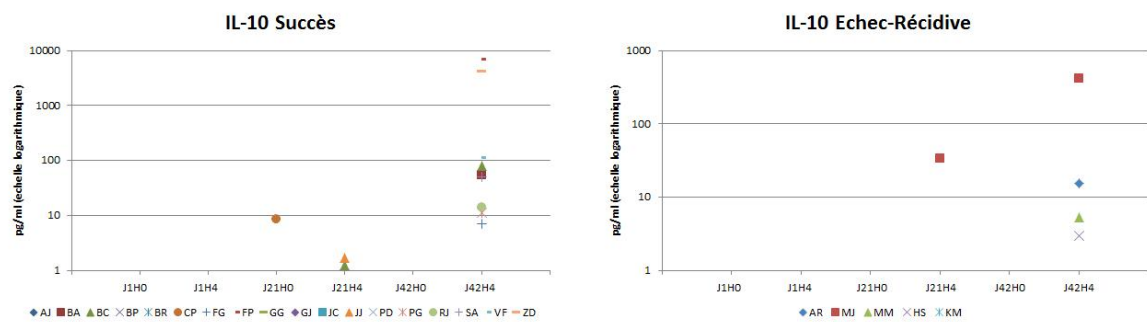


Figure 38 : Valeur d'IL-10 urinaire en fonction de la réponse au traitement par BCG

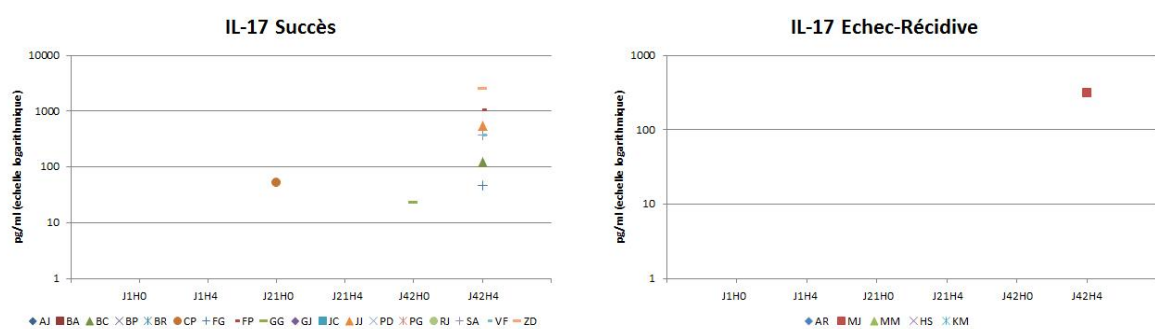


Figure 39 : Valeur d'IL-17 urinaire en fonction de la réponse au traitement par BCG

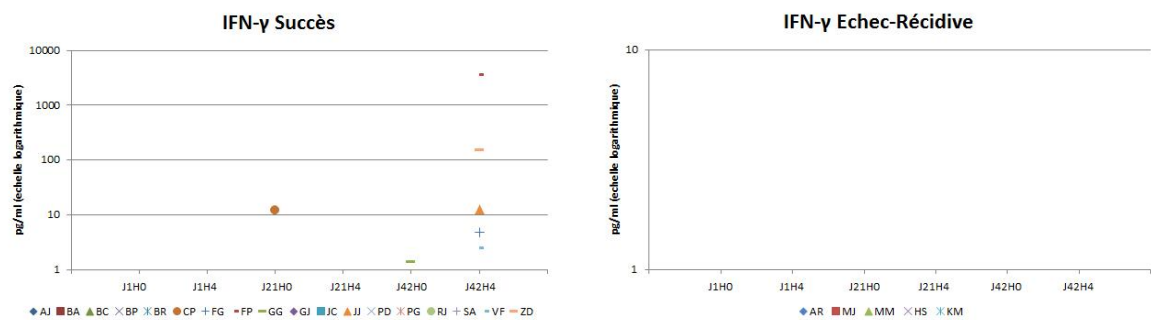


Figure 40 : Valeur d'IFN-γ urinaire en fonction de la réponse au traitement par BCG

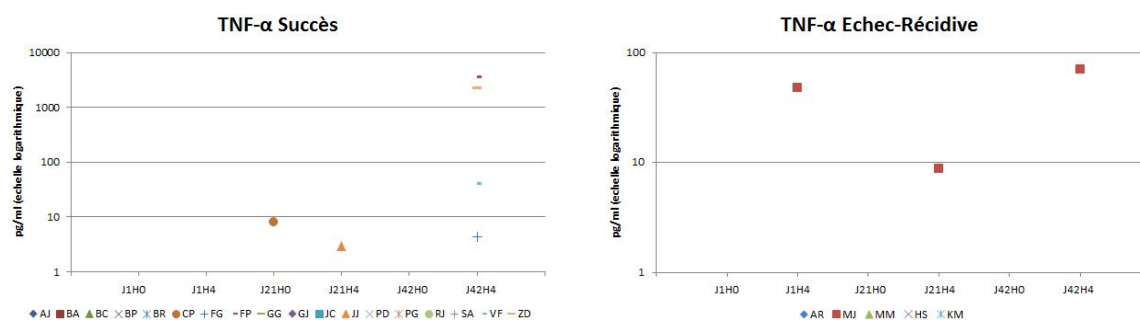


Figure 41 : Valeur de TNF- $\alpha$  urinaire en fonction de la réponse au traitement par BCG

Nous avons comparé, de manière statistique par un test t de Student, la production de cytokines urinaires en fonction de l'échec d'emblée (n=3) ou du succès (n=20) du traitement par BCG (Tableaux 9 et 10). Et nous avons également comparé la production de cytokines urinaires en fonction de deux groupes : succès (n=18) versus échec ou récurrence (n=5) (Tableaux 11 et 12).

Il n'a pas été mis en évidence de différence significative du taux de sécrétion des cytokines en fonction d'un succès ou d'un échec/récurrence au traitement par BCG. Cependant il est difficile de comparer cette population en terme de récurrence à court et moyen terme étant donné que certains patients ont eu un traitement d'entretien de BCG et d'autres non.

|            |           | IL-2   |        | IL-4   |        | IL-6          |        | IL-10  |        | TNF- $\alpha$ |        | IFN- $\gamma$ |        | IL-17  |        |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|---------------|--------|--------|--------|---------------|--------|---------------|--------|--------|--------|
|            |           | Echec  | Succès | Echec  | Succès | Echec         | Succès | Echec  | Succès | Echec         | Succès | Echec         | Succès | Echec  | Succès |
| <b>J1</b>  | <b>H0</b> | 0,98   | 1,81   | 0,00   | 0,33   | 204,58        | 41,50  | 0,00   | 0,00   | 0,00          | 0,00   | 0,00          | 0,00   | 0,00   | 0,00   |
|            | <b>H4</b> | 3,26   | 1,37   | 0,42   | 0,79   | 427,60        | 32,33  | 0,00   | 0,00   | 16,00         | 0,00   | 0,00          | 0,00   | 0,00   | 0,00   |
| <b>J21</b> | <b>H0</b> | 2,60   | 1,61   | 0,73   | 0,77   | 181,81        | 11,93  | 0,00   | 0,45   | 0,00          | 0,42   | 0,00          | 0,63   | 0,00   | 2,80   |
|            | <b>H4</b> | 36,59  | 5,63   | 0,00   | 0,19   | 239,23        | 24,18  | 11,28  | 0,17   | 2,95          | 0,16   | 0,00          | 0,00   | 0,00   | 0,00   |
| <b>J42</b> | <b>H0</b> | 1,79   | 1,79   | 0,44   | 0,69   | 132,78        | 15,55  | 0,00   | 0,00   | 0,00          | 0,00   | 0,00          | 0,07   | 0,00   | 1,15   |
|            | <b>H4</b> | 73,05  | 231,86 | 0,38   | 0,48   | 817,26        | 412,60 | 144,17 | 572,68 | 23,22         | 291,80 | 0,00          | 190,08 | 104,45 | 252,38 |
| <b>p</b>   |           | 0.7533 |        | 0.5372 |        | <b>0.0599</b> |        | 0.6761 |        | 0.6333        |        | 0.6778        |        | 0.6619 |        |

Tableau 9 : Concentration moyenne des cytokines urinaires (pg/ml) en fonction de la réponse au traitement d'attaque de BCG. (p : test t de Student)

|                |           | IL-2   | IL-4   | IL-6          | IL-10  | TNF- $\alpha$ | IFN- $\gamma$ | IL-17  |
|----------------|-----------|--------|--------|---------------|--------|---------------|---------------|--------|
| <b>J1</b>      | <b>H0</b> | 0.2851 | 0.4322 | 0.0402        | -      | -             | -             | -      |
|                | <b>H4</b> | 0.0441 | 0.6757 | 0.0174        | -      | 0.0127        | -             | -      |
| <b>J21</b>     | <b>H0</b> | 0.3958 | 0.9770 | 0.0090        | 0.7012 | 0.7012        | 0.7012        | 0.7012 |
|                | <b>H4</b> | 0.0166 | 0.5672 | 0.0118        | 0.0113 | 0.0213        | -             | -      |
| <b>J42</b>     | <b>H0</b> | 0.9985 | 0.7726 | 0.0133        | -      | -             | 0.7080        | 0.7080 |
|                | <b>H4</b> | 0.7118 | 0.8851 | 0.5715        | 0.6834 | 0.6234        | 0.6942        | 0.6811 |
| <b>p total</b> |           | 0.7533 | 0.5372 | <b>0.0599</b> | 0.6761 | 0.6333        | 0.6778        | 0.6619 |

Tableau 10 : Valeur de p pour la comparaison de la concentration des cytokines urinaires en fonction de la réponse au traitement d'attaque de BCG (Echec/Succès) et du timing de prélèvement. (p : test t de Student)

|            |           | IL-2           |        | IL-4           |        | IL-6           |        | IL-10          |        | TNF- $\alpha$  |        | IFN- $\gamma$  |        | IL-17          |        |
|------------|-----------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|
|            |           | Echec-Récidive | Succès | Echec-Récidive | Succès | Echec-Récidive | Succès | Echec-Récidive | Succès | Echec-Récidive | Succès | Echec-Récidive | Succès | Echec-Récidive | Succès |
| <b>J1</b>  | <b>H0</b> | 1.49           | 1.76   | 0.00           | 0.36   | 172.95         | 32.17  | 0.00           | 0.00   | 0.00           | 0.00   | 0.00           | 0.00   | 0.00           | 0.00   |
|            | <b>H4</b> | 2.31           | 1.44   | 0.48           | 0.82   | 266.04         | 33.48  | 0.00           | 0.00   | 9.60           | 0.00   | 0.00           | 0.00   | 0.00           | 0.00   |
| <b>J21</b> | <b>H0</b> | 2.37           | 1.56   | 0.74           | 0.77   | 119.15         | 10.38  | 0.00           | 0.51   | 0.00           | 0.47   | 0.00           | 0.70   | 0.00           | 3.13   |
|            | <b>H4</b> | 25.67          | 5.17   | 0.00           | 0.22   | 154.66         | 23.73  | 6.77           | 0.19   | 1.77           | 0.18   | 0.00           | 0.00   | 0.00           | 0.00   |
| <b>J42</b> | <b>H0</b> | 1.76           | 1.79   | 0.78           | 0.62   | 99.44          | 11.79  | 0.00           | 0.00   | 0.00           | 0.00   | 0.00           | 0.08   | 0.00           | 1.27   |
|            | <b>H4</b> | 45.06          | 257.29 | 0.23           | 0.54   | 506.35         | 453.99 | 87.10          | 636.14 | 13.93          | 324.22 | 0.00           | 211.20 | 62.67          | 280.42 |
| <b>p</b>   |           | 0.5673         |        | 0.5259         |        | 0.2484         |        | 0.5084         |        | 0.4844         |        | 0.5706         |        | 0.4401         |        |

Tableau 11 : Concentration moyenne des cytokines urinaires (pg/ml) en fonction de la réponse à court et moyen terme au BCG. (p : test t de Student)

|                |           | IL-2   | IL-4   | IL-6    | IL-10  | TNF- $\alpha$ | IFN- $\gamma$ | IL-17  |
|----------------|-----------|--------|--------|---------|--------|---------------|---------------|--------|
| <b>J1</b>      | <b>H0</b> | 0.6714 | 0.2819 | 0.0290  | -      | -             | -             | -      |
|                | <b>H4</b> | 0.2772 | 0.6385 | 0.1036  | -      | 0.0828        | -             | -      |
| <b>J21</b>     | <b>H0</b> | 0.3951 | 0.9834 | 0.0488  | 0.5999 | 0.5999        | 0.5999        | 0.5999 |
|                | <b>H4</b> | 0.0607 | 0.4315 | 0.0731  | 0.0806 | 0.1246        | -             | -      |
| <b>J42</b>     | <b>H0</b> | 0.9680 | 0.8197 | 0.02525 | -      | -             | 0.6097        | 0.6097 |
|                | <b>H4</b> | 0.5442 | 0.6030 | 0.9288  | 0.5209 | 0.4859        | 0.5920        | 0.4567 |
| <b>p total</b> |           | 0.5673 | 0.5259 | 0.2484  | 0.5084 | 0.4844        | 0.5706        | 0.4401 |

Tableau 12 : Valeur de p pour la comparaison de la concentration des cytokines urinaires en fonction de la réponse à court et moyen terme au BCG (Echec-Récidive/Succès) et du timing de prélèvement. (p : test t de Student)

### 5.1.4 Profils de sécrétion des cytokines urinaires par patient

Lors de l'analyse de l'ensemble des cytokines par patients, il a été possible de dégager pour certains patients des profils différents de sécrétions des cytokines en terme quantitatif en cours de traitement témoignant d'une réponse immunologique variable.

Globalement les 2 cytokines sécrétées de manière significative ont été l'IL-2 et l'IL-6. Il a été observé 2 types de profil différent en fonction d'une augmentation, d'une diminution ou d'une stabilité du taux de cytokines durant les traitements pas BCG.

Un premier profil a mis en évidence une augmentation progressive du taux d'IL-2 et d'IL-6 au cours du traitement. (Figures 42) On a observé dans ces cas une augmentation progressive du taux d'IL-2 avant chaque instillation (H0) de BCG avec une réponse à H4 faible de sécrétion de cytokines. Par exemple PG a un profil cytokinique avec un taux initial d'IL-6 de 45 pg/ml et qui a augmenté progressivement pour atteindre 200 pg/ml en fin de traitement. Le taux d'IL-2 initial a été faible à 2 pg/ml et a évolué sur une pente ascendante pour atteindre 25 pg/ml en fin de traitement. De même le profil de KM a été identique avec des taux IL-2 et d'IL-6 qui ont augmenté progressivement au cours du traitement.

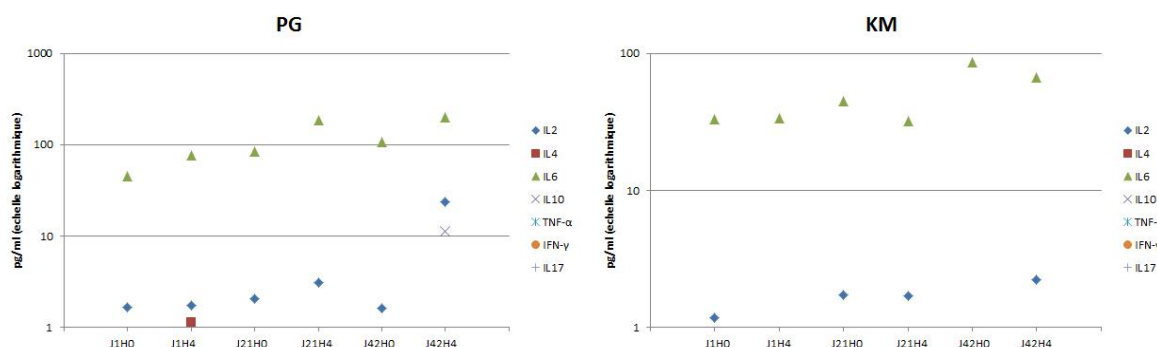


Figure 42 : Exemple de 2 profils patient de sécrétion avec une augmentation d'IL-2 et d'IL-6 au cours du traitement.

A l'inverse un 2<sup>ème</sup> profil a été mis en évidence chez d'autres patients avec une diminution au cours du traitement du taux d'IL-6 que ce soit avant l'instillation (H0) et après l'instillation de BCG (H4), ceci associé à une stabilité de l'IL-2 mais à des valeurs faibles (<5pg/ml). (Figure 43)

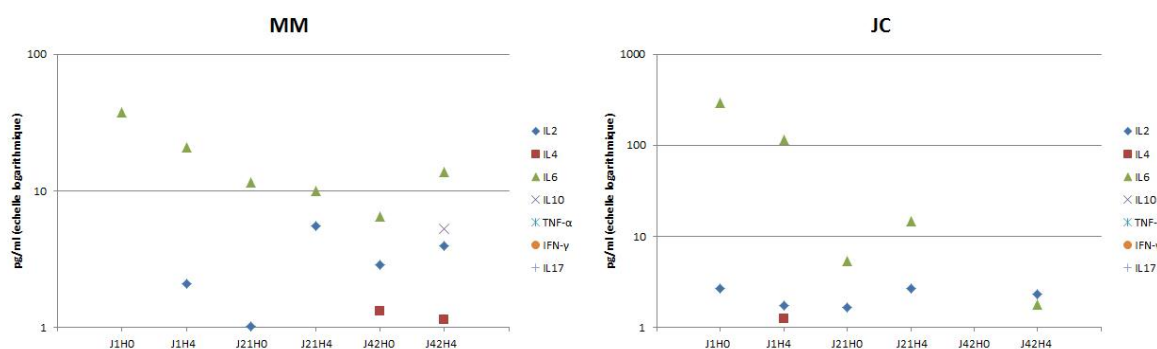


Figure 43 : Exemple de 2 profils de sécrétion avec une diminution d'IL-6 et une stabilisation d'IL-2 au cours du traitement.

### 5.1.5 Profils de sécrétion des cytokines urinaires à J42H4

Un intérêt particulier a été porté sur le taux de cytokines à J42H4. En effet lors des premières instillations de BCG, les taux des cytokines (excepté IL-2 et IL-6) ont été relativement faibles avec des pics de sécrétion plus importants pour certains patients lors du dosage à J42H4.

Nous avons ainsi mis en évidence également 4 types de profils différents en fonction de l'importance du taux de sécrétion des cytokines et du nombre de cytokines sécrétées. En effet, globalement, sur la population, le taux d'IL-4 a été quasiment nul. Par contre les taux de sécrétion d'IL-10, IL-17, INF- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  ont été également faible excepté pour les dosages réalisés à J42H4.

Nous avons ainsi stratifié un premier profil de 5 patients (profil 1) de sécrétion à J42H4 avec une sécrétion de toutes les cytokines dosées. (Figure 44). Un deuxième profil de 8 patients (profil 2) de sécrétion avec une sécrétion d'IL-2, IL-6 associé à une sécrétion d'IL-10 et/ou IL-17 et quasiment pas de sécrétion de l'INF- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ . (Figure 45) Un troisième profil de 8 patients (profil 3) avec une sécrétion que d'IL-2 et IL-6 et quasiment pas des autres cytokines. (Figure 46) Enfin, 2 patients ont eu une absence totale de sécrétion de toutes les cytokines.

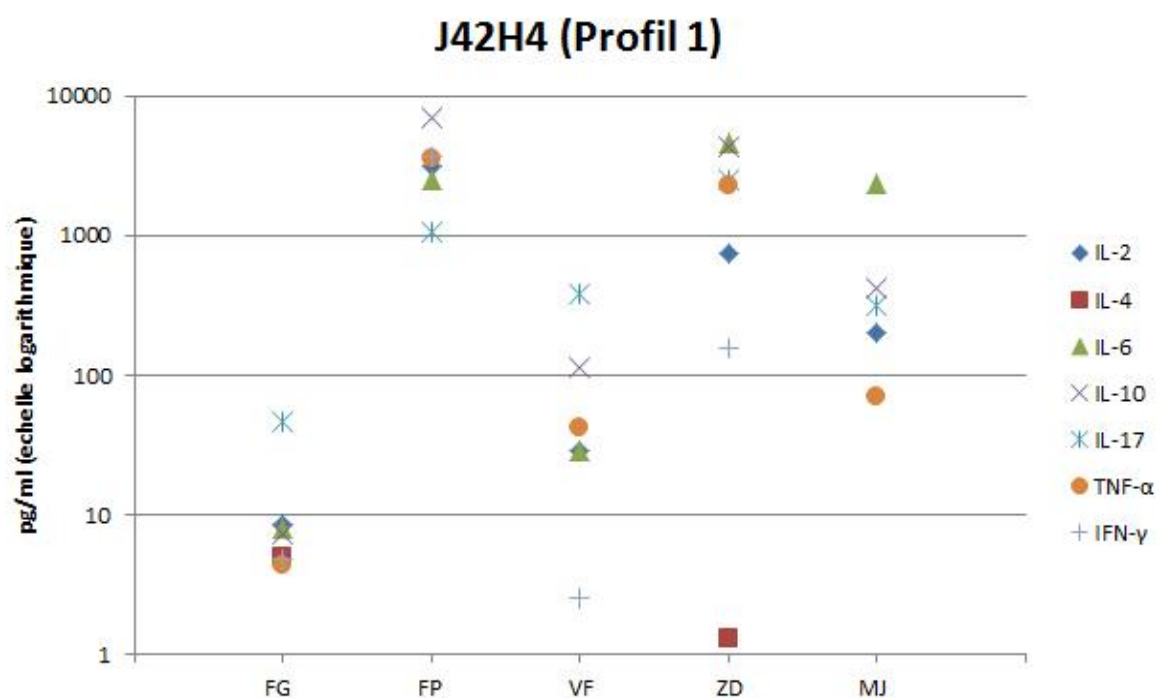


Figure 44 : Profil 1 de sécrétion à J42H4 (par patient)

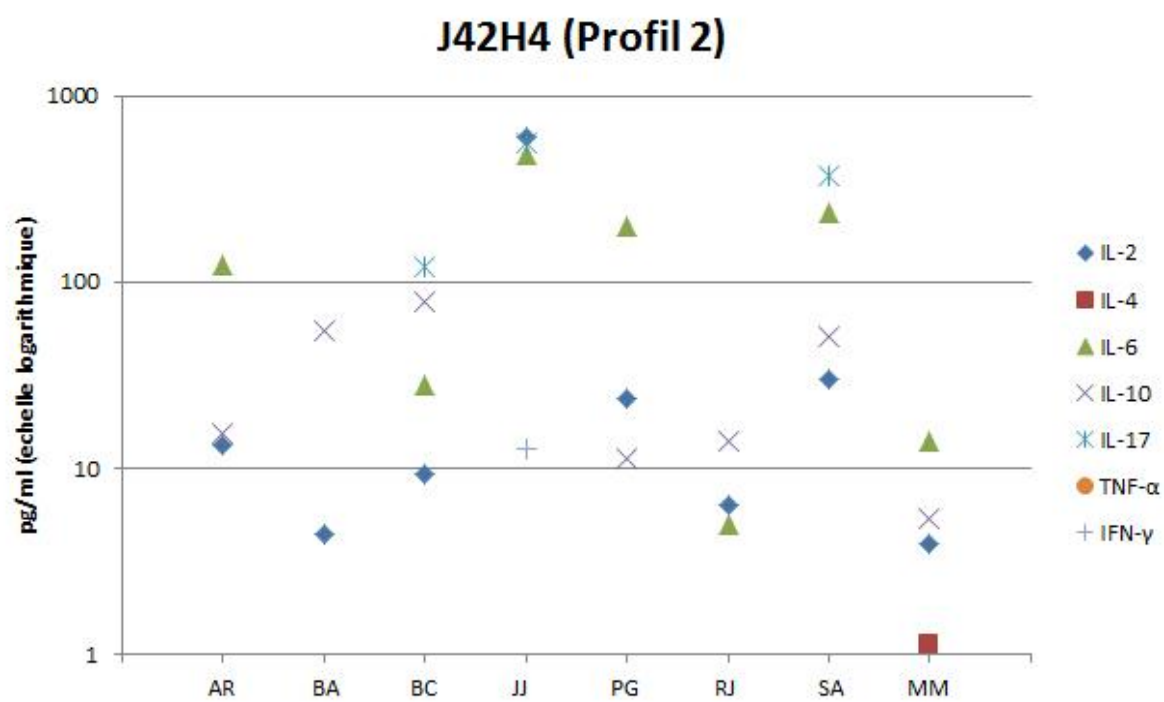


Figure 45 : Profil 2 de sécrétion à J42H4 (par patient)

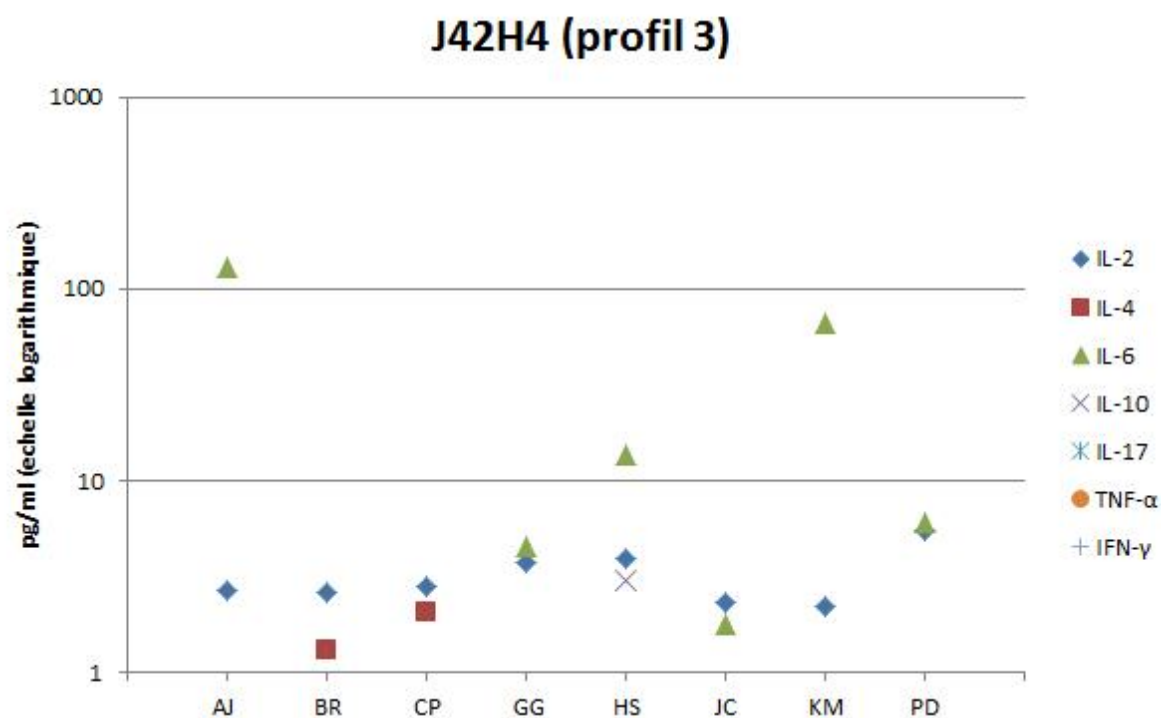


Figure 46 : Profil 3 de sécrétion à J42H4 (par patient)

### **5.1.6 Profils de sécrétion des cytokines urinaires en fonction de la réponse au traitement**

Nous avons corrélé les profils de sécrétion des cytokines en fonction de la réponse au traitement par BCG. Il n'a pas été mis en évidence de tendance significative des différents profils et de la réponse au traitement.

Nous avons analysé plus spécifiquement le profil des 3 patients (AR, MJ et MM) en échec d'emblée du BCG et des 2 patients (HS et KM) ayant récidivés en cours de traitement. Même si l'analyse statistique n'était pas significative et l'échantillon trop faible pour faire une analyse en sous-groupe, nous avons observé une tendance à avoir un profil de sécrétion similaire pour des 5 patients :

- L'IL-6 a été élevé au début du traitement puis a évolué vers une diminution lors des instillations sur les dosages réalisés avant chaque instillation (H0) associé à une réaction faible à H4 de chaque instillation (excepté pour MJ où les sécrétions à H4 ont été importantes)
- L'IL-2 a été faible au début de traitement et lors des dosages réalisés avant les instillations (H0) en ayant une tendance à diminuer ou rester stable au cours du traitement (excepté pour MJ)
- La sécrétion d'IFN- $\gamma$  a été nulle pour tous ces patients tout au long du traitement même à J42H4.
- La sécrétion d'IL-17 a été nulle pour tous ces patients tout au long du traitement même à J42H4 (excepté pour MJ à J42H4)
- La sécrétion des autres cytokines en particulier à J42H4 a été faibles (excepté pour MJ)

### 5.1.7 Résumé de l'analyse des cytokines urinaires

Globalement la production des cytokines IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL-17 ont été faible. Les cytokines qui ont été les plus pertinentes lors des instillations de BCG ont été IL-2 et IL-6. De plus cette production de cytokines a été variable durant le traitement, en effet la production la plus importante a été lors de la 4<sup>ème</sup> heure après la 6<sup>ème</sup> instillation (J42H4), avec auparavant des productions qui ont été faibles. Cependant il a existé une corrélation importante entre la production des cytokines à J21H4 et celle à J42H4 pour l'IL-2, IL-4, IL-6 et IL-10.

Il n'y a pas eu de différence significative sur la production ou non des cytokines urinaires en fonction de la réponse au traitement d'attaque. Une tendance ( $p=0.0599$ ) a été mise en évidence pour la sécrétion de IL-6, avec une augmentation de la production de celle-ci dans le groupe de patient en échec de traitement.

Même si l'analyse des profils de cytokines n'a pas mis en évidence de corrélation avec la réponse au BCG, il semble se dégager une tendance pour le groupe en échec ou récidive après traitement avec : un taux élevé d'IL-6 avant le traitement évoluant vers une diminution des dosages réalisé avant les instillations à H0, un faible taux d'IL-2 évoluant peu sous traitement, une absence de sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL17, un pic faible de sécrétion des cytokines à J42H4.

## 5.2 ANALYSE DES PBMC

Initialement tous les patients ont eu un prélèvement de sang avant chaque instillation de BCG (1<sup>ère</sup>, 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> instillation) en vue de cette analyse des PBMC. Pour faire l'analyse des PBMC, il faut les extraire par ficoll sur du sang frais sans qu'il soit congelé auparavant. Cependant pour les premiers cas de l'étude, le sang a été congelé immédiatement détruisant ainsi tous les PBMC et n'a par conséquent pas pu être utilisé pour cette analyse. Au final l'analyse des PBMC n'a donc pu être réalisée que sur les 10 patients ayant eu une technique de Ficoll juste après le prélèvement pour la congélation. De plus, dans ce groupe de patients, aucun n'a eu d'échec ou de récurrence tumorale lors du suivi, limitant ainsi toute analyse en sous-groupe.

### 5.2.1 Interprétation du marquage des PBMC

Les PBMC ont été analysés par cytométrie de flux avec le FACS Canto. L'analyse a été réalisée avec le logiciel BD FACS Diva Software\*. Ce logiciel permet d'obtenir un marquage de l'ensemble des PBMC et est représenté sur la figure 47.

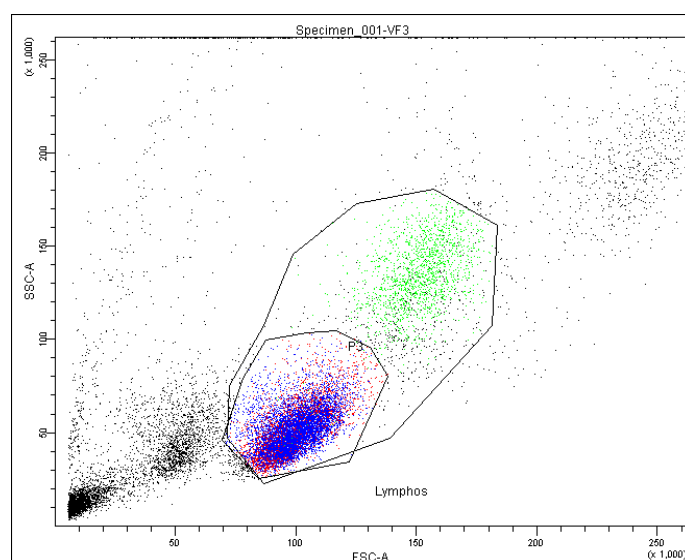


Figure 47 : Aspect d'un échantillon après lecture au FACS Canto des PBMC par cytométrie de flux (lymphocyte en bleu et rouge ; monocyte en vert)

L'objectif de l'étude a été d'analyser les lymphocytes T, lymphocytes B, macrophages et les Natural Killer. Par conséquent nous avons pris comme zone d'intérêt pour l'analyse la zone comprenant les lymphocytes et les monocytes (bleu et vert sur le schéma). Les autres points (noir sur la courbe) correspondent à des débris cellulaires et n'ont pas été pris en compte dans l'analyse.

Les différentes populations analysées ont été :

|                               |                     |                                  |
|-------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| ⇒ Lymphocyte T                | CD3+                |                                  |
| • Lymphocyte T $\alpha\beta$  | TCR $\alpha\beta$ + | (et CD3+)                        |
| - Lymphocyte T CD4            | CD4+                | (et TCR $\alpha\beta$ + et CD3+) |
| - Lymphocyte T CD8            | CD8+                | (et TCR $\alpha\beta$ + et CD3+) |
| • Lymphocyte T $\gamma\delta$ | $\gamma\delta$ +    | (et CD3+)                        |
| ⇒ Lymphocyte B                | CD19+               |                                  |
| ⇒ Macrophage - Monocyte       | CD14+               |                                  |
| ⇒ Natural Killer              | CD56+               |                                  |

La figure 48 représente les aspects des graphismes obtenus en fonction de l'expression des différents marqueurs. Les valeurs quantitatives relatives des PBMC ont été obtenues après interprétation de ces graphismes.

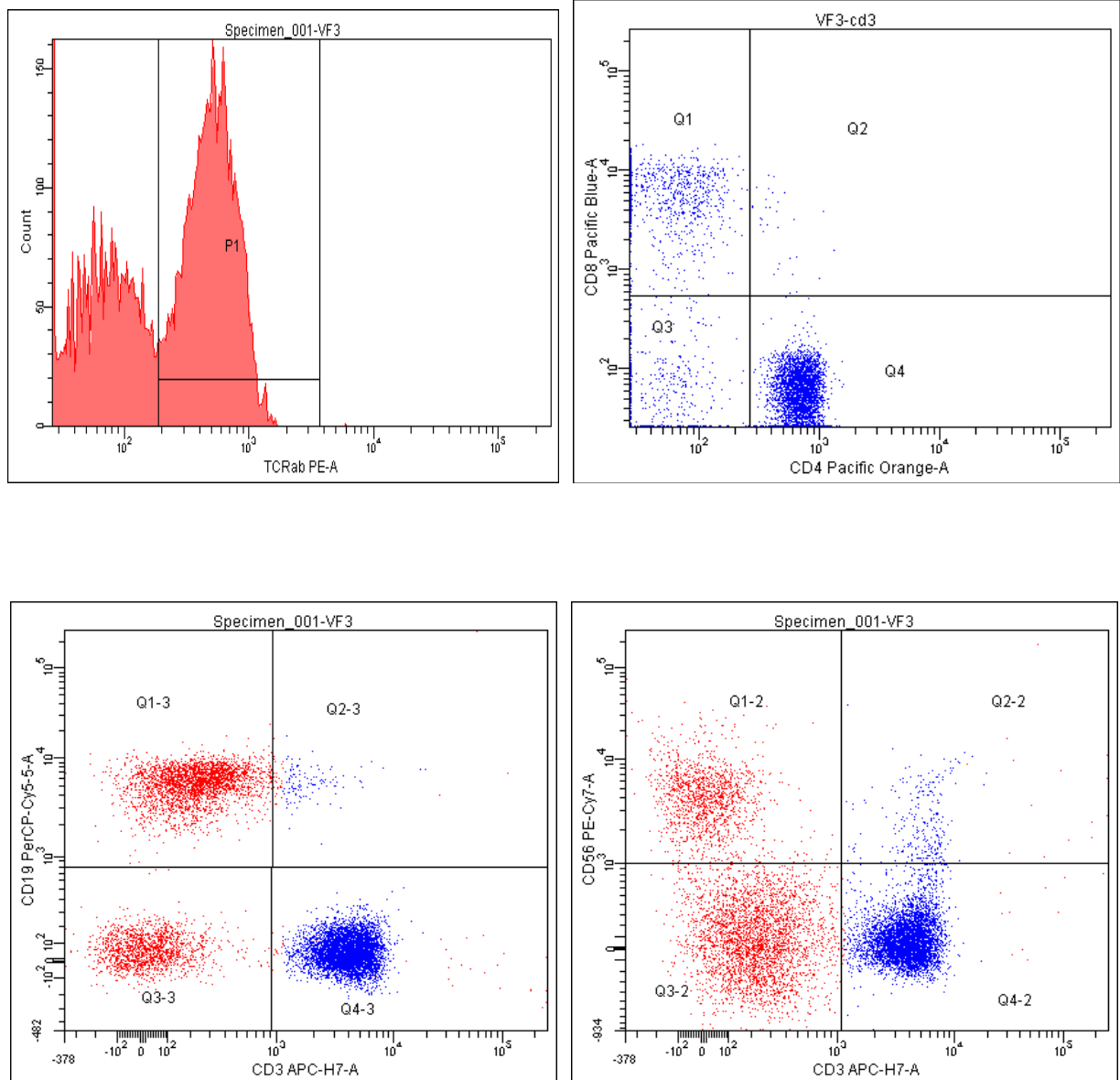


Figure 48 : Aspects des analyses au FACS Canto pour la détermination des PBMC

### 5.2.2 Analyse des PBMC pour l'ensemble de la population

Pour l'ensemble de la population, l'analyse des PBMC est représentée dans le tableau 13.

|                               |                     | J1      |            | J21     |            | J42     |            |
|-------------------------------|---------------------|---------|------------|---------|------------|---------|------------|
|                               |                     | Moyenne | Ecart-type | Moyenne | Ecart-type | Moyenne | Ecart-type |
| ⇒ Lymphocyte T                | CD3+                | 55,29   | ± 25,20    | 45,93   | ± 16,67    | 68,06   | ± 13,86    |
| • Lymphocyte T $\alpha\beta$  | TCR $\alpha\beta$ + | 48,08   | ± 21,37    | 37,65   | ± 13,47    | 61,5    | ± 14,4     |
| - Lymphocyte T CD4            | CD4+                | 63,93   | ± 15,38    | 65,70   | ± 26,4     | 71,8    | ± 8,6      |
| - Lymphocyte T CD8            | CD8+                | 28,48   | ± 14,10    | 27,95   | ± 25,14    | 22,56   | ± 8,3      |
| • Lymphocyte T $\gamma\delta$ | $\gamma\delta$ +    | 2,84    | ± 2,87     | 1,78    | ± 1,30     | 2,06    | ± 1,69     |
| ⇒ Lymphocyte B                | CD19+               | 15,50   | ± 8,24     | 21,42   | ± 18,53    | 14,34   | ± 9,12     |
| ⇒ Macrophage - Monocyte       | CD14+               | 6,64    | ± 3,91     | 5,35    | ± 5,23     | 6,92    | ± 4,71     |
| ⇒ Natural Killer              | CD56+               | 13,41   | ± 10,20    | 15,37   | ± 9,15     | 15,24   | ± 12,72    |

Tableau 13 : Analyse des PBMC en % moyen pour l'ensemble de la population

Les figures 49 à 51 représentent l'évolution des taux des PBMC dans le temps en fonction des instillations de BCG.

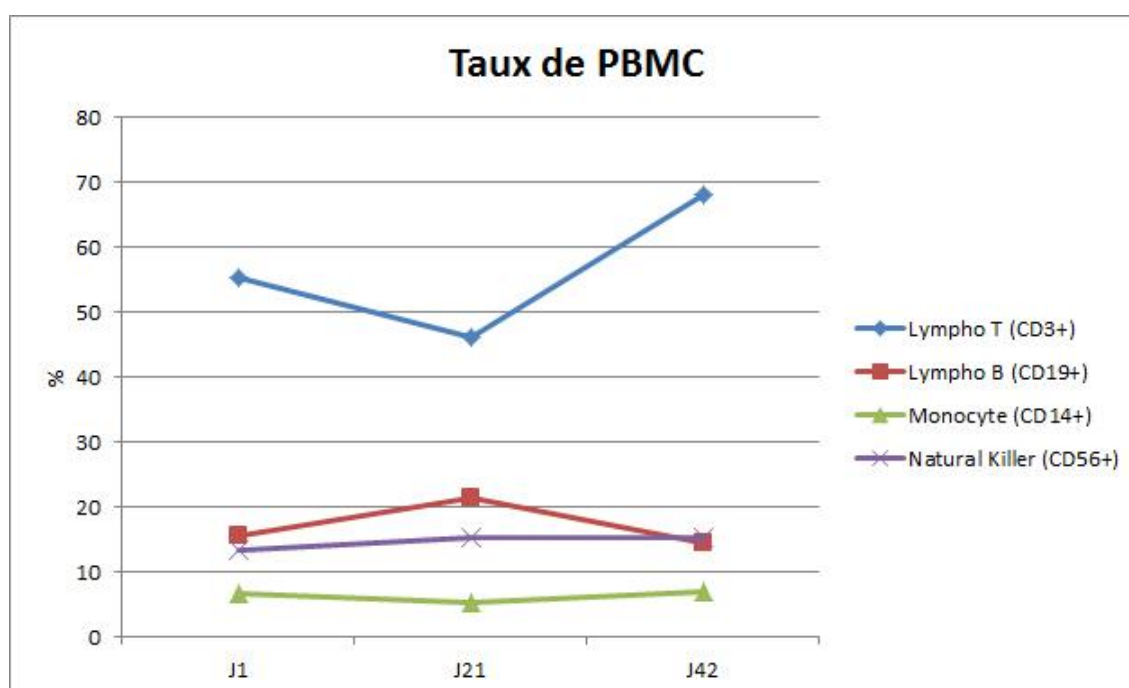


Figure 49 : Evolution dans le temps des taux de PBMC

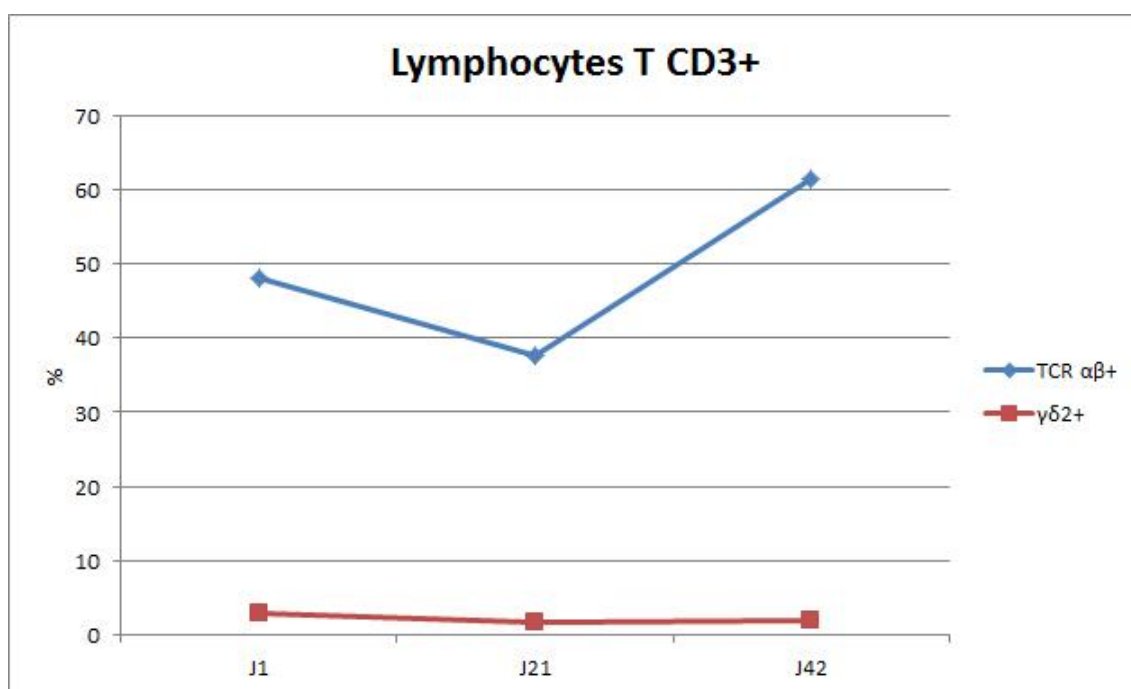


Figure 50 : Evolution des taux de lymphocytes CD3+ en séparant les TCR $\alpha\beta$ + et  $\gamma\delta$ 2+.

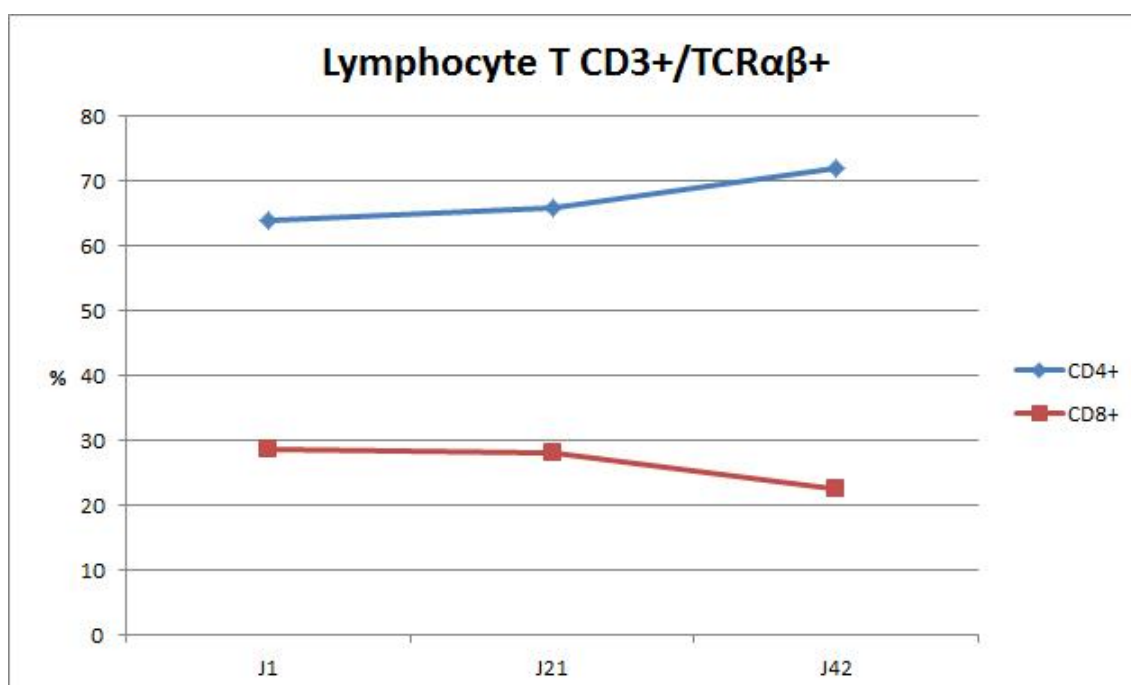


Figure 51 : Evolution des taux de lymphocytes T CD3+/TCR $\alpha\beta$ + en séparant les CD4+ et CD8+.

L'analyse de ces résultats met en évidence une tendance à une augmentation du taux de lymphocytes T et en particulier de lymphocytes T CD4+ lors du traitement par BCG. Pour les autres PBMC, les valeurs semblent stables dans le temps. Cependant l'analyse statistique par comparaison non-appariées du taux des PBMC entre J1, J21 et J42 n'a pas mis en évidence de différence statistique significative entre les groupes excepté pour un taux plus importantes de lymphocyte T et en particulier  $\alpha\beta$  entre J21 et J42. (Tableau 14)

|                                 |                     | J1 vs J21 | J1 vs J42 | J21 vs J42    |
|---------------------------------|---------------------|-----------|-----------|---------------|
|                                 |                     | P         | P         | P             |
| ⇒ Lymphocyte T                  | CD3+                | 0.4474    | 0.3254    | 0.0426        |
| • Lymphocyte T $\alpha\beta$    | TCR $\alpha\beta$ + | 0.3171    | 0.2440    | <b>0.0196</b> |
| - Lymphocyte T CD4              | CD4+                | 0.8765    | 0.3223    | 0.6350        |
| - Lymphocyte T CD8              | CD8+                | 0.9610    | 0.4174    | 0.6595        |
| • Lymphocyte T $\gamma\delta$ 2 | $\gamma\delta$ 2+   | 0.4225    | 0.5975    | 0.7655        |
| ⇒ Lymphocyte B                  | CD19+               | 0.4333    | 0.8167    | 0.4584        |
| ⇒ Macrophage - Monocyte         | CD14+               | 0.6065    | 0.9086    | 0.6168        |
| ⇒ Natural Killer                | CD56+               | 0.7176    | 0.7796    | 0.9851        |

Tableau 14 : Valeur de p lors des comparaisons non-appariées des taux de PBMC entre les différents prélèvements (J1, J21 et J42)

## 5.3 PHENOTYPAGE DE L'INFILTRATION LYMPHO-MACROCYTAIRE DES TUMEURS DE VESSIE

### 5.3.1 Objectif et population

Parallèlement à cette étude prospective sur la cohorte des 23 patients, nous avons mené une étude immuno-histo-chimique (IHC) sur une banque de tumeur de vessie rétrospective pour caractériser le phénotype de l'infiltration lympho-macrocytaire in situ.

Une banque de 48 tumeurs de vessie congelées a été créée de septembre 2001 à décembre 2005 avec des prélèvements de tissu tumoral effectués lors des résections endoscopique ou de la pièce de cystectomie. L'étude immuno-histo-chimique a été réalisé sur 9 tumeurs dont les 6 ayant eu un antécédent de traitement par instillations de BCG.

Le stade tumoral des tumeurs a été TVNIM (4 cas) ou TVIM (5 cas). Le délai 1<sup>ère</sup> tumeur – mise en banque a été de  $70,3 \pm 74,7$  mois (1 – 221 mois). Le délai instillation de BCG – mise en banque a été de  $57,7 \pm 51,7$  mois (5 – 149 mois).

### 5.3.2 Marquages

L'analyse de la stroma réaction péri-tumorale a été réalisée par immuno-histo-chimie avec les anticorps suivant :  $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$ , V $\delta$ 2, CD4, CD8, CD20, CD14, CD16, CD68.

L'interprétation du marquage immuno-histo-chimique a été réalisée selon la technique du « point counting »<sup>103</sup> avec une grille de 1 cm<sup>2</sup> avec 121 intersections. La lecture a été réalisée avec un grossissement x400 sur 15 champs successifs. Les résultats sont exprimés en pourcentage de surface tissulaire occupée par les cellules marquées.

Nombre total de cellules marquées =  $\frac{\text{Nb de cellules marquées sous les intersections} \times 100}{\text{Nb totale d'intersection (121 x 15)}}$

Les figures 52 et 53 représentent des exemples d'infiltration de la stroma réaction péri-tumorale pour CD8 et CD68.

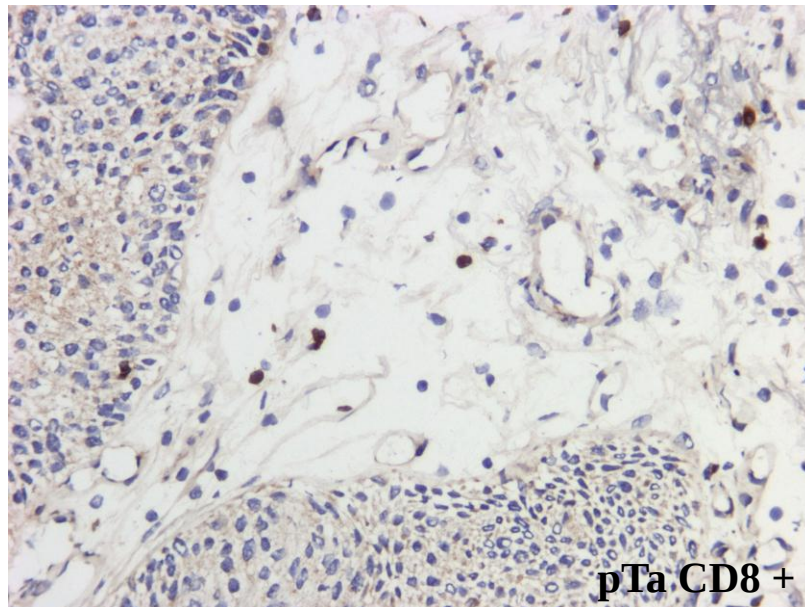


Figure 52 : Etude IHC de l'infiltration de la stroma réaction péri-tumorale pour CD8+

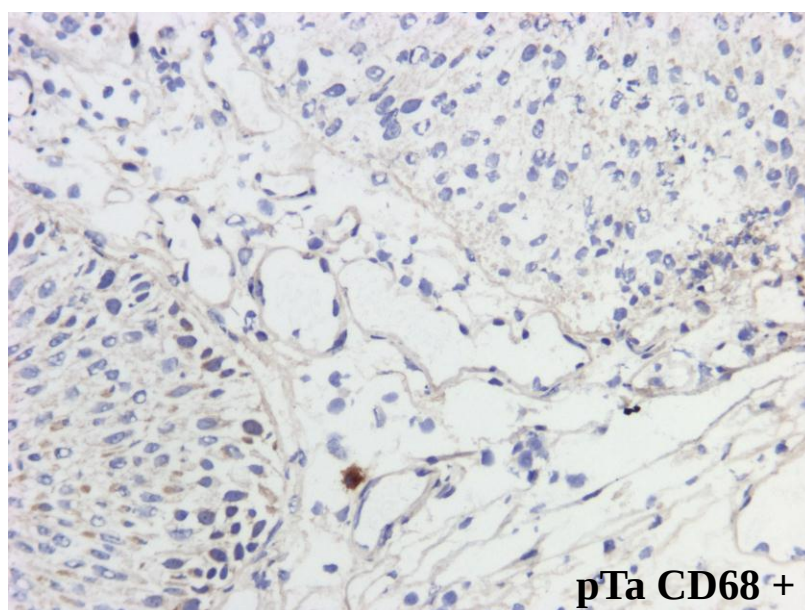


Figure 53 : Etude IHC de l'infiltration de la stroma réaction péri-tumorale pour CD68+

### 5.3.3 Résultats de l'infiltration lympho-macrocytaire

Les résultats de l'infiltration lympho-macrocytaire pour l'ensemble de la population est représentée dans le tableau 15. Les résultats sont exprimés en ‰ et non en % du fait d'une faible concentration.

| Marqueur    | Concentration |            |
|-------------|---------------|------------|
|             | Moy (‰)       | Dev St (‰) |
| <b>CD20</b> | 20,9          | ± 50.84    |
| <b>CD4</b>  | 20,1          | ± 13.69    |
| <b>CD8</b>  | 14,3          | ± 5.08     |
| <b>CD68</b> | 20,6          | ± 18.4     |
| <b>CD16</b> | 2,6           | ± 2.32     |
| <b>CD14</b> | 13,5          | ± 8.1      |
| <b>αβ</b>   | 0,5           | ± 0.93     |
| <b>γδ</b>   | 1,2           | ± 1.55     |
| <b>Vδ2</b>  | 1,0           | ± 0.72     |

Tableau 15 : Concentration de l'infiltration lympho-macrocytaire de la population (n=9)

Les tableaux 16 et 17 expriment les résultats en fonction des antécédents de BCG (oui versus non) et du type de tumeur (TVNIM versus TVIM).

Globalement l'infiltrat lymphocytaire a été variable en fonction des antécédents de BCG et du type de tumeur. Un taux plus important de cellules CD14<sup>+</sup> (principalement des macrophages) et une diminution des cellules CD68<sup>+</sup> (principalement des macrophages activés) ont été observé en cas d'antécédent de BCG. En cas de TVIM, le taux de cellules CD14<sup>+</sup> (principalement des macrophages) et de cellules Vδ2<sup>+</sup> (principalement des lymphocytes T Vδ2) a été plus important comparativement au TVNIM.

| Marqueur | Antécédent de BCG |            |           |            | p                   |
|----------|-------------------|------------|-----------|------------|---------------------|
|          | Oui (n=6)         |            | Non (n=3) |            |                     |
|          | Moy (%)           | Dev St (‰) | Moy (%)   | Dev St (‰) |                     |
| CD20     | 1,9               | ± 2.48     | 58,9      | ± 84.09    | 0,116               |
| CD4      | 18,1              | ± 15.11    | 24,1      | ± 11.97    | 0,573               |
| CD8      | 14,4              | ± 5.82     | 13,9      | ± 4.28     | 0,908               |
| CD68     | 11,1              | ± 6.99     | 39,7      | ± 22.05    | <b><u>0,018</u></b> |
| CD16     | 3,1               | ± 2.73     | 1,5       | ± 0.31     | 0,347               |
| CD14     | 16,6              | ± 8.07     | 7,3       | ± 3.66     | <b><u>0,107</u></b> |
| αβ       | 0,3               | ± 0.46     | 0,9       | ± 1.59     | 0,363               |
| γδ       | 0,9               | ± 1.73     | 1,8       | ± 1.14     | 0,440               |
| Vδ2      | 1,2               | ± 0.54     | 0,1       | ± 0.95     | 0,226               |

Tableau 16 : Concentration de l'infiltration lympho-macrocytaire en fonction des antécédents de BCG.

| Marqueur | Infiltration tumorale |            |            |            | p            |
|----------|-----------------------|------------|------------|------------|--------------|
|          | TVNIM (n=4)           |            | TVIM (n=5) |            |              |
|          | Moy (%)               | Dev St (‰) | Moy (%)    | Dev St (‰) |              |
| CD20     | 44,5                  | ± 74.50    | 2,1        | ± 2.73     | 0,237        |
| CD4      | 23,7                  | ± 9.63     | 17,2       | ± 16.79    | 0,516        |
| CD8      | 12,4                  | ± 2.60     | 15,8       | ± 6.34     | 0,358        |
| CD68     | 15,8                  | ± 13.55    | 24,5       | ± 23.09    | 0,533        |
| CD16     | 1,1                   | ± 0.77     | 3,8        | ± 2.53     | 0,087        |
| CD14     | 8,3                   | ± 5.18     | 17,7       | ± 7.81     | <u>0,077</u> |
| αβ       | 0,8                   | ± 1.31     | 0,2        | ± 0.49     | 0,367        |
| γδ       | 0,8                   | ± 1.31     | 1,5        | ± 1.80     | 0,529        |
| Vδ2      | 0,4                   | ± 0.52     | 1,4        | ± 0.49     | <u>0,020</u> |

Tableau 17 : Concentration de l'infiltration lympho-macrocytaire en fonction de l'infiltration tumorale.

# DISCUSSION

## 6 DISCUSSION

### 6.1 AUTO-CRITIQUES

Différentes critiques peuvent être portées sur ce travail. Tout d'abord la durée de réalisation de cette étude a été longue mais nous avons été confrontés à différents niveaux à des retards dans un premier temps d'ordre administratif pour avoir toutes les autorisations. En effet même si pour les patients, il n'y avait qu'une simple prise de sang qui était réalisée en plus dans cette étude par rapport au schéma standard de la prise en charge, il était nécessaire d'avoir le dossier en règle. Par la suite, l'étude a également demandé du temps pour l'inclusion des patients et il a été nécessaire de prolonger la durée d'inclusion.

Un autre point critique de l'analyse finale a été une absence des analyses sanguines pour la production des cytokines. En effet l'objectif principal de l'étude était de « déterminer une corrélation entre la production locale (vessie) et systémique (sang) des cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL 17, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) durant un traitement par BCG pour un cancer de la vessie ». Lors du design initial de l'étude, nous avons convenu de mettre en congélation les tubes de sang à -80°C pour ne faire une analyse des cytokines qu'à la fin des inclusions. Le problème a été que nous avons mis en congélation les tubes de sang totaux et que lors de la décongélation il y a eu une hémolyse des cellules sanguins perturbant par la suite toute exploitation du sang. Nous avons essayé tout de même après centrifugation de récupérer le sérum pour l'exploiter en vain. Par conséquent cette erreur de préparation de stockage du sang a été préjudiciable pour l'objectif principal de l'étude qui n'a pas pu être analysé. Par conséquent nous n'avons étudié que la production d'urine des cytokines sans corrélation avec la production systémique dans le sang. Il aurait fallu faire une simple centrifugation des tubes de sang avant congélation pour ne garder que le sérum.

De même, nous avons rencontré aussi un problème pour le stockage des PBMC qui ont été congelés immédiatement pour les premiers cas rendant leur analyse impossible. L'étude des PBMC, même si en objectif secondaire, n'a par conséquent pu être réalisée que sur un sous-groupe de la population.

## 6.2 PRODUCTION DES CYTOKINES

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une variation de la production des cytokines urinaires au cours des instillations de BCG pour le traitement des cancers de la vessie. Cependant la sécrétion des cytokines n'a pas été constante pour tous les patients et les valeurs qui ne sont que des moyennes ne sont le reflet que de moins de la moitié de la population car les médianes restent faibles.

Globalement à l'état de base il n'a pas été observé de cytokine dans les urines que ce soit dans notre étude ou dans la littérature<sup>65, 86</sup> excepté pour l'IL-6 dans notre étude. Par la suite la sécrétion a été maximale à la 4<sup>ème</sup> heure après la 6<sup>ème</sup> instillation (J42H4) de BCG. Cette sécrétion urinaire de cytokines a été significative pour IL-2, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ . La sécrétion a été quasi nulle pour l'IL-4 durant toutes les instillations.

De même, au cours du traitement (1<sup>ère</sup> et 3<sup>ème</sup> instillation de BCG), la production de toutes les cytokines a été quasi nulle excepté pour l'IL-6 et à un moindre niveau l'IL-2.

Par conséquent, il existe une sécrétion de cytokines urinaires essentiellement à la 4<sup>ème</sup> heure après l'instillation de BCG qui se produit dans la 2<sup>ème</sup> partie des instillations de BCG à savoir après la 4<sup>ème</sup> instillation pour être maximale à la 6<sup>ème</sup> instillation.

L'analyse de la production de cytokines a mis en évidence deux profils différents en fonction de la réponse d'emblée ou non aux 6 instillations de BCG.

En effet, en cas d'échec du traitement par BCG, la production d'IL-6 a été significative dans les urines et ce même avant l'initialisation du traitement (J1H0). Par la suite cette production a été toujours présente à des valeurs au moins de 200pg/ml durant toute la phase de traitement. A l'inverse, la production des autres cytokines (IL-2, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) durant la phase de traitement a été quasi nulle avec juste un pic à la 4<sup>ème</sup> heure de la 6<sup>ème</sup> instillation (J42H4) qui a été observé mais avec des valeurs inférieures à 150pg/ml.

A l'opposé en cas de succès du traitement par BCG, la production d'IL-6 a été inférieure à 50pg/ml durant toute la phase de traitement et ce même avant d'initier le traitement, excepté à la 4<sup>ème</sup> heure de la 6<sup>ème</sup> instillation (J42H4). Alors que la production des autres cytokines (IL-2, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) durant la phase de traitement a été faible mais avec un pic important à la 4<sup>ème</sup> heure de la 6<sup>ème</sup> instillation (J42H4) avec des valeurs supérieures à 200pg/ml.

Cependant même si le pic de production des cytokines à la 4<sup>ème</sup> heure de la 6<sup>ème</sup> instillation (J42H4) a semblé plus important en cas de succès du BCG, il n'a pas été statistiquement significatif comparativement au groupe en échec d'emblée de BCG.

### **6.2.1 Interleukine-2 (IL-2)**

L'IL-2 est le témoin d'une réponse TH1 prédominante qui est produite par le BCG. Sa sécrétion apparaît surtout en 2<sup>ème</sup> partie du traitement d'attaque du BCG et elle semble corrélée à la réponse au BCG.

Différentes études ont analysées la cinétique de sécrétion de l'IL-2, dans les urines, en cours de traitement par instillation de BCG. Il en ressort qu'il n'existe pas d'IL-2 dans les urines à l'état de base. Suite à une instillation de BCG, un pic de sécrétion d'IL-2 est détectable entre la 2<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> heure (en moyenne à la 6<sup>ème</sup> heure) avec un retour à l'état de base à la 24<sup>ème</sup> heure. Cette sécrétion d'IL-2 est significative à partir de la 2<sup>ème</sup> à 4<sup>ème</sup> instillation de BCG alors qu'elle ne l'est pas juste après la première instillation. Cette sécrétion maximale atteint des valeurs de 2000 à 3000 pg/ml.<sup>50, 51, 59-62</sup> Dans notre étude nous confirmons ces données avec un seuil moyen de production de l'IL-2 qui est à 211pg/ml mais avec un maximum allant à 3160pg/ml.

Cette production urinaire et sanguine d'IL-2 a une valeur pronostique de la réponse au traitement par instillation de BCG. Contrairement à la littérature, notre étude a mis en évidence que la sécrétion d'IL-2 a été statistiquement significative d'un échec d'emblée au BCG ce qui est tout de même différent d'une récurrence. En effet la sécrétion de l'IL-2 a été de manière significative plus élevée dans le groupe en échec de BCG lors des dosages réalisés à la 4<sup>ème</sup> heure de la 1<sup>ère</sup> instillation ( $p=0.0441$ ) et de la 3<sup>ème</sup> instillation ( $p=0.0166$ ). A l'inverse, l'IL-2 a été sécrétée en proportion plus importante en cas de succès du BCG à la 4<sup>ème</sup> heure de la 6<sup>ème</sup> instillation mais de manière non significative ( $p=0.7118$ ).

### 6.2.2 Interleukine-6 (IL-6)

Dans notre étude, nous avons mis en évidence un taux urinaire moyen d'IL-6 significatif à 62pg/ml avant de débiter tout traitement par BCG. Cette présence de cytokines urinaires à l'état de base chez un patient ayant une tumeur de vessie n'a été observée que pour cette cytokine. La sécrétion d'IL-6 a été ensuite variable lors des instillations de BCG avec une augmentation du dosage à la 4<sup>ème</sup> heure de chaque instillation comparativement au dosage fait avant l'instillation et avec un pic maximal à la 4<sup>ème</sup> heure de la 6<sup>ème</sup> instillation (moyenne de 465pg/ml).

Un point important de notre étude a été qu'en cas d'échec de BCG, le taux d'IL-6 a été présent et élevé (>200pg/ml) tout au long du traitement dans les urines alors qu'il était faible (<50pg/ml) en cas de succès du BCG. Par conséquent, on peut se poser la question de savoir si la présence d'IL-6 dans les urines n'est pas la conséquence de cellule tumorale vésicale persistante. Il pourrait être utilisé comme un facteur prédictif de réponse au BCG en cours de traitement.

L'IL-6 est une cytokine sécrétée principalement par les cellules urothéliales normales mais aussi par les cellules urothéliales tumorales et les macrophages. L'IL-6 est considéré comme une source importante pour l'activation du contrôle TH1/Th2 des lymphocytes CD4+ en favorisant la réponse Th2 et en inhibant la réponse TH1. Par conséquent, les taux faible d'IL-6 en cas de répondeur et les taux élevé en cas de non-répondeur corréleront bien avec le type de réponse recherché avec le BCG qui est une réaction TH1 prépondérante. Cette sécrétion en cours de traitement semble donc avoir un intérêt pour prédire la réponse au traitement mais elle pourrait également être utilisée pour ne pas réaliser d'instillation de BCG et envisager un autre traitement. On pourrait supposer que la présence d'IL-6 est le témoin de cellules tumorales persistantes ce qui peut expliquer la mauvaise réponse au BCG étant donné qu'elle est sécrétée aussi par les cellules tumorales.

### **6.2.3 Interféron $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )**

La production de l'IFN- $\gamma$  est nécessaire à la production et l'activation de cellules lymphocytaires induite par les instillations de BCG. Elle est sécrétée principalement par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et témoin d'une réponse cellulaire TH1 prédominante.

Dans notre étude, nous avons mis en évidence que dans le groupe de patient en échec de BCG (réfractaire) et dans le groupe de patient ayant une récurrence après le traitement, le taux d'IFN- $\gamma$  a été dans tous les cas nul tout au long du traitement. La comparaison entre ces groupes et le groupe de patient ayant répondu au traitement n'a pas été significative, mais il semble tout de même se dégager que les patients n'ayant aucune sécrétion d'IFN- $\gamma$  après le traitement par BCG et ce même à J42H4 ont une moins bonne réponse.

La non sécrétion d'IFN- $\gamma$  après un traitement par BCG pourrait donc être un facteur prédictif d'échec de traitement du fait d'une réaction immunologique non suffisante ou non efficace.

Les différents essais thérapeutiques qui ont été réalisés avec de l'IFN comme co-stimulant du BCG l'ont été fait avec de l'IFN- $\alpha$  et non de l'IFN- $\gamma$ . Il pourrait donc être intéressant d'évaluer cette hypothèse de l'absence de production d'IFN- $\gamma$  comme facteur pronostique d'échec du BCG du fait d'une absence de réaction immunologique efficace et de co-stimuler l'action du BCG avec de l'IFN- $\gamma$ .

### **6.2.4 Vision globale des cytokines urinaires**

Lors de l'analyse de l'ensemble des cytokines par patients, il a été mis en évidence des profils différents de sécrétions des cytokines en terme qualitatif et quantitatif en cours de traitement témoignant d'une réponse immunologique variable. Cette production de cytokines a été variable durant le traitement, en effet la production la plus importante a été lors de la 4<sup>ème</sup> heure après la 6<sup>ème</sup> instillation (J42H4), avec auparavant des productions qui ont été faibles. Cependant il a existé une corrélation entre la production des cytokines à J21H4 et celle à J42H4 pour l'IL-2, IL-4, IL-6 et IL-10.

Globalement la production des cytokines IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL-17 ont été faible. Alors que les 2 cytokines sécrétées de manière significative ont été l'IL-2 et l'IL-6. La sécrétion urinaire d'IL-6 est plus ou moins physiologique car elle est produite par les cellules urothéliales tumorales, les macrophages mais aussi les cellules urothéliales normales. La sécrétion d'IL-2 au cours du traitement par BCG est classique et le témoin d'une réponse TH1.

Il a été observé 2 types de profil différents d'IL-2 et d'IL-6. Un 1<sup>er</sup> profil a mis en évidence une augmentation progressive du taux d'IL-2 et d'IL-6 au cours du traitement. A l'inverse un 2<sup>ème</sup> profil a été mis en évidence chez d'autres patients avec une diminution au cours du traitement du taux d'IL-6 et une stabilité de l'IL-2 mais à des valeurs faibles (<5pg/ml).

De même, une analyse plus spécifique de la sécrétion des cytokines à J42H4 a mis en évidence 4 types de profil différents : un premier profil avec une sécrétion de toutes les cytokines dosées. Un deuxième profil avec une sécrétion d'IL-2, IL-6 associé à une sécrétion d'IL-10 et/ou IL-17 et quasiment pas de sécrétion de l'INF- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ . Un troisième profil avec une sécrétion que d'IL-2 et IL-6 et quasiment pas des autres cytokines. Enfin un profil avec une absence totale de sécrétion de toutes les cytokines.

Tout ceci met en évidence que chaque patient répond différemment au traitement en fonction de son profil immunologique. Par conséquent l'efficacité de ce traitement n'est pas lié uniquement au type de tumeur de la vessie mais également, et probablement de manière plus importante, à l'hôte. En effet si la réponse induite par le traitement de BCG ne stimule pas le système immunitaire, les chances de succès du traitement ne sont probablement pas optimales et pas non plus liées spécifiquement au BCG.

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une tendance pour un profil de sécrétion de cytokines dans le groupe en échec ou récurrence après traitement de BCG avec : un taux élevé d'IL-6 avant le traitement évoluant vers une diminution des dosages réalisés avant les instillations à H0, un faible taux d'IL-2 évoluant peu sous traitement, une absence de sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL17, un pic faible de sécrétion des cytokines à J42H4.

Il paraît donc important de pouvoir ajuster le traitement en fonction de la réponse immunitaire induite par le BCG. Celle-ci ne peut pas être prédite avant de débiter le traitement mais elle peut être facilement évaluée lors du traitement d'attaque du BCG avec des dosages urinaires et sanguins des cytokines. En fonction de ce profil de sécrétion, il pourrait être possible de stratifier les patients sur la probabilité de succès du traitement et permettre ainsi un

traitement à la carte aux patients en fonction de la réponse induite par le BCG. En effet si le patient est répondeur au BCG avec une production efficace de cytokines, il serait alors possible de continuer en particulier avec un traitement d'entretien par BCG. A l'inverse, en cas d'absence de réponse immunitaire, le traitement par BCG semble donc inutile et probablement qu'il faudrait s'orienter vers une autre thérapeutique. Enfin, pour les cas intermédiaire, il pourrait se discuter d'adapter les doses et le schéma des instillations pour le traitement d'entretien. (Figure 54) De Boer *et al*<sup>104</sup> ont déjà proposé et réalisé une réduction de la dose de BCG chez la souris en fonction du profil de sécrétion TH1 (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12p40) et TH2 (IL-10, IL-4) mesuré de manière semi-quantitative par RT-PCR.

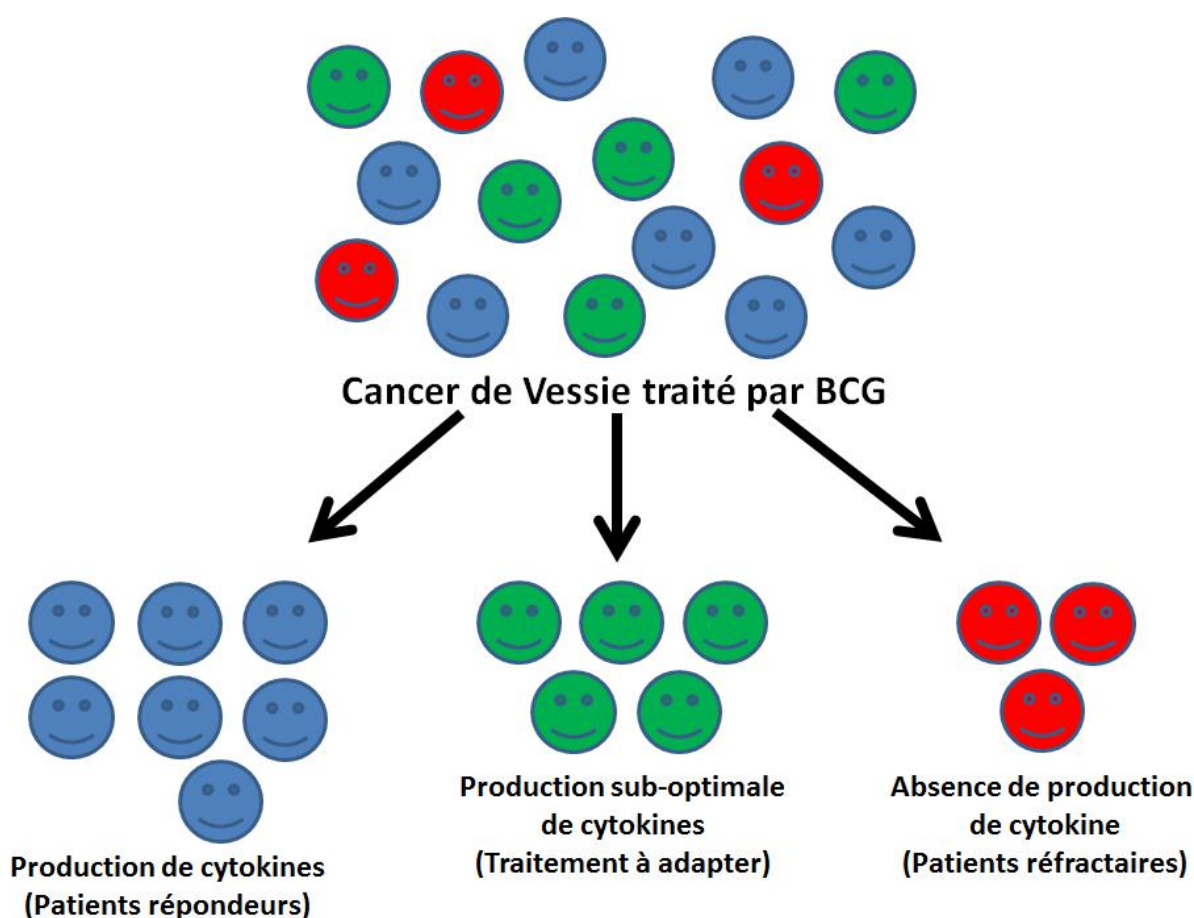


Figure 54 : Type de réponse au BCG en fonction du profil de cytokines

L'autre point important mais qui n'a pas été évalué dans cette étude, serait également de corréler la réponse immunologique avec la présence et l'intensité des effets secondaires ce qui pourrait être également une cause d'arrêt du traitement et peut être une cause de modification des doses de BCG pour limiter cette réaction.

Il paraît donc possible et intéressant d'essayer d'établir des nomogrammes prédictifs de la réponse au BCG en fonction du profil immunologique et du taux de sécrétions des cytokines. Ceci permettrait de prédire avec plus de précision la réponse de l'hôte et probablement adapter au mieux la prise en charge thérapeutique de la tumeur de vessie. Ces hypothèses méritent bien entendu d'être confirmées mais sur une population à plus large échelon.

## 6.3 ANALYSE DES PBMC

Dans notre étude, l'analyse des PBMC a été réalisée chez 10 patients. Nous avons mis en évidence au cours du traitement une augmentation du taux de lymphocytes  $T\alpha\beta^+$  et en particulier une augmentation du ratio  $CD4^+/CD8^+$  même si de manière non statistiquement significative. Pour les autres PBMC, les résultats ont mis en évidence une stabilité dans le temps sans variation au cours des instillations de BCG. Les prélèvements pour l'analyse, ont tous été réalisés avant les instillations de BCG (1<sup>ère</sup>, 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup>), peut être que la réalisation supplémentaire de prélèvement à H4 voire à H24 aurait permis d'observer des résultats différents.

De plus, dans notre étude sur le phénotypage de l'infiltration lympho-macrocytaire des tumeurs de vessie, nous avons mis en évidence qu'en cas d'antécédents de tumeur de vessie, il existait une diminution des cellules  $CD68^+$  (principalement des macrophages activés) et une augmentation des cellules  $CD14^+$  (principalement des macrophages). Il n'y a pas eu de variation significative des cellules  $\gamma\delta^+$  même si la tendance était à une augmentation de l'infiltration en cas d'antécédent de BCG. Par contre le taux de cellules  $V\delta2^+$  était plus important pour les tumeurs plus agressives (TVIM par rapport au TVNIM).

Hermann *et al*<sup>105</sup> furent les premiers en 1991 à analyser les PBMC lors du traitement par BCG chez 6 patients. Ils ont conclu que le BCG n'induisait pas de modification sur les PBMC (Natural Killer ou lymphocytes T).

Par la suite Taniguchi *et al*<sup>57</sup> ont obtenu des PBMC sanguin et urinaire de patients traités par BCG pour un cancer de la vessie. En plus de la production de cytokines urinaire classique (augmentation de IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  après les instillations,) ils ont mis en évidence une augmentation de l'activité PBMC après la 3<sup>ème</sup> instillation de BCG les amenant à conclure

que la réaction immunologique n'était pas que localisée au niveau vésicale mais également systémique. Cependant, ils n'ont pas étudié le sous-type de réaction PBMC produite.

### 6.3.1 Lymphocytes T $\alpha\beta$ (CD4+ et CD8+)

Les lymphocytes T ont un rôle important dans les mécanismes de défense contre le BCG. Il a été démontré que les lymphocytes  $\alpha\beta$  sont indispensables au développement d'une réponse contre le BCG.<sup>26</sup> A l'état basal le phénotype de type CD8+ est prédominant dans la vessie normale. De nombreux auteurs ont démontré que les lymphocytes T CD4+ et CD8+ étaient présents dans la paroi vésicale après BCG et que le phénotype de type CD4+ était prédominant<sup>29-32</sup>. Parmi ces lymphocytes T CD4+, le profil majoritaire de sécrétion de cytokines après une atteinte par le BCG est un profil de type TH1 qui induit une sécrétion de IL-2, IL-12, TNF- $\beta$  et IFN- $\gamma$ .<sup>58, 94</sup>

Agarwal *et al*<sup>106</sup> ont étudié par cytométrie de flux la balance TH1 et TH2 sur les PBMC chez 41 patient ayant un cancer de vessie traité par résection trans-urétral suivi d'un traitement adjuvant par chimio ou immuno-thérapie. Lors du suivi 20 patients ont récidivés et 21 cas n'ont pas récidivés. Ils ont comparé ces résultats par rapport à 21 patients n'ayant pas de tumeur de vessie. Les résultats ont mis en évidence une diminution des CD3+, CD4+ et CD8+ chez les patients ayant une tumeur de vessie comparativement au groupe contrôle. De même, dans le groupe de patients ayant une tumeur, le taux de CD4+ a été plus faible chez les patients ayant récidivés. La sécrétion des cytokines TH1 (IL-2, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) a été diminuée chez les patients ayant une tumeur comparativement au groupe contrôle. A l'inverse la sécrétion des cytokines TH2 (IL-4, IL-6 et IL-10) a été plus élevée dans le groupe de patients ayant une tumeur. Par contre il n'y a pas eu de différence de la production de cytokines (TH1 ou TH2) entre les groupes de patients ayant une tumeur ou non et ceux ayant récidivé ou non.

Kitamura *et al*<sup>107</sup> ont réalisé une étude immuno-histo-chimique pour étudier les types d'antigène HLA de classe I (CD4, CD8, CD20, CD68, TIA-1, S-100 et FOXP3) de l'infiltration péri-tumorale chez 30 patients ayant eu un traitement par BCG. L'analyse a été faite sur des prélèvements fait avant et après le traitement par BCG. Ils ont conclu que les patients ayant une infiltration péri-tumorale par des cellules HLA de classe I ont eu une meilleur survie sans récidence à 5 ans que les autres (55,7% versus 19,1% (p=0.019)). De plus,

ils ont mis en évidence une association entre l'infiltration péri-tumorale par des cellules CD8+, CD20+, CD68+ et la réponse au BCG.

### 6.3.2 Lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont des lymphocytes impliqués dans l'immunité innée qui jouent un rôle contre les infections à mycobactéries et ont une activité cytolytique contre les cellules tumorales urothéliales in vitro.<sup>34</sup> Ils n'expriment pas habituellement le phénotype CD4+ ni le phénotype CD8+ et leur reconnaissance de l'antigène n'est pas restreinte par le système d'histocompatibilité. Par contre, ils ont la capacité de stimuler les autres populations lymphocytaires (CD4+, CD8+) en réponse à la stimulation antigénique par un phénomène de mémoire associé.<sup>35</sup>

Dans l'unité INSERM U892, différents travaux ont porté sur les lymphocytes T V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 en démontrant leur implication dans l'immunité anti-tumorale et leur activation par la mycobactérie (BCG)<sup>108-111</sup>. D'un point de vue clinique chez l'homme, Corvaisier *et al*<sup>112</sup> ont mis en évidence l'implication des lymphocytes T V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 dans la surveillance immunitaire naturelle dans le cancer du côlon en analysant des liquides d'ascite de patient ayant un cancer colique.

Dans le cancer de la vessie, différents travaux cliniques chez l'homme ont étudié l'implication de ces lymphocytes T  $\gamma\delta$  en particulier en cas de traitement par instillation par BCG. En 1992, Raziuddin *et al*<sup>113</sup> ont été les premiers à évoquer l'implication des lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans la réponse immune en cas de cancer de la vessie induit par les infections à schistosome chez l'homme.

Différents auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'infiltration de lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans la paroi vésicale au cours du traitement par BCG.<sup>36, 37</sup> Cependant cette infiltration pariétale de lymphocyte T  $\gamma\delta$  n'est pas spécifique des tumeurs de vessie ou du traitement par BCG puisqu'elle a été également mise en évidence de manière significative dans la paroi vésicale de patient ayant une cystite interstitielle (syndrome douloureux vésical)<sup>114</sup>. Cependant l'étiologie de cette pathologie reste encore très mal connue et est probablement pour une partie en lien à un problème dysimmunitaire.

Alexandroff *et al* <sup>115</sup> ont analysé la production urinaire de lymphocyte T  $\gamma\delta$  au cours d'un traitement par BCG. Ils ont mis en évidence deux groupes de patients en fonction du nombre de lymphocytes T  $\gamma\delta$ : faible (0,5% à 5% des CD3+) ou élevé (5% à 20% des CD3+). Cependant cette élévation de lymphocytes T  $\gamma\delta$  n'a été que locale, ils n'ont pas mis en évidence de variation du taux de lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans le sang périphérique (PBMC).

Dans notre étude, nous n'avons pas non plus mis en évidence de variation significative des lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans le sang périphérique (PBMC) au cours du traitement par BCG. De même dans notre analyse sur l'infiltration péri-tumorale lympho-macrocytaire, il n'y avait pas de variation significative des lymphocytes T  $\gamma\delta$  même si la tendance était à une augmentation de l'infiltration en cas d'antécédent de BCG.

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  semblent donc avoir un rôle important dans la réponse immunitaire induite par le BCG dans le cancer de la vessie et possiblement dans son phénomène de mémoire à moyen terme. Cependant les mécanismes de défense restent encore mal connus. Delvider *et al* <sup>116</sup> ont mis en évidence l'effet des lymphocytes T  $\gamma\delta$ , après activation antigénique, pour potentialiser la maturation des cellules dendritiques infectées par BCG, en favorisant notamment leur sécrétion d'IL-12, propice à la mise en place d'une réponse T conventionnelle. Dans le même sens Naoe *et al* <sup>117</sup> ont également étudié la production des cellules dendritiques en cas de stimulation par le BCG. Ils ont mis en évidence que le BCG a été un puissant stimulateur des cellules dendritiques et que ces cellules dendritiques activées par le BCG ont été des puissants stimulateurs de cellules Natural Killer et des lymphocytes T  $\gamma\delta$ . Par conséquent les cellules dendritiques et les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ont semblé avoir un rôle important dans la réaction immunitaire et la réaction anti-tumorale induite par les instillations endo-vésicales de BCG dans le cancer de la vessie. <sup>87</sup>

Un autre point important est la sécrétion d'IL-17 qui se fait par l'intermédiaire des lymphocytes T  $\gamma\delta$  <sup>118</sup>. Takeuchi *et al* <sup>102</sup> ont mis en évidence que le taux de production d'IL-17 a été diminué en cas de souris déficiente en lymphocyte T  $\gamma\delta$ . Ils ont conclu que l'IL-17 produit par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  joue un rôle dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles en cas de traitement vésical par BCG avec une activité anti-tumorale contre le cancer de vessie. Cette production d'IL-17 par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  a également été mise en évidence en cas d'infection urinaire à *Escherichia Coli*. <sup>119</sup> Dans notre étude la sécrétion d'IL-17 a été très faible et significative que lors du prélèvement réalisé à la 4<sup>ème</sup> heure de la 6<sup>ème</sup> instillation. Elle n'a de

plus pas été statistiquement significative de la réponse au traitement même si la tendance a été d'observer un taux d'IL-17 plus élevé en cas de succès du traitement par BCG.

Enfin l'action anti-tumorale des lymphocytes T  $\gamma\delta$  est également mal connue. Yuasa *et al*<sup>120</sup> ont développé un modèle animal de souris pour étudier l'effet de l'administration intra-vésicale de lymphocytes T  $\gamma\delta$  sur le cancer de la vessie. Ils ont mis en évidence que l'administration intra-vésicale de lymphocytes T  $\gamma\delta$  avec 5 $\mu$ M d'acide zolédronique entraînait une activité anti-tumorale contre les cellules du cancer de la vessie dans des vessies orthotopiques de ce modèle murin avec une amélioration de la survie. Suzuki *et al*<sup>121</sup> ont mis en évidence l'effet additive de l'acide valproïque sur la cytotoxicité des lymphocytes T  $\gamma\delta$  contre des lignées cellulaires de cancer de vessie, mais pas avec l'acide zolédronique.

# CONCLUSIONS

## 7 CONCLUSIONS

Notre étude a donc mis en évidence qu'il existait une réaction locale suite aux instillations de BCG dans le traitement du cancer de la vessie avec une production de cytokines urinaires qui a été variable durant le traitement. La production la plus importante a été lors de la 4<sup>ème</sup> heure après la 6<sup>ème</sup> instillation (J42H4), avec auparavant des productions qui ont été faibles. Il a existé une corrélation entre la production des cytokines à J21H4 et celle à J42H4 pour l'IL-2, IL-4, IL-6 et IL-10. De plus il semble exister des profils différents de production des cytokines durant le traitement que ce soit pour la combinaison IL-2/IL-6 en cours de traitement ou les profils à la fin du traitement (J42H4).

Il n'y a pas eu de différence significative sur la production ou non des cytokines urinaires en fonction de la réponse au traitement d'attaque. Une tendance ( $p=0.0599$ ) a été mise en évidence pour la sécrétion de IL-6, avec une augmentation de la production de celle-ci dans le groupe de patient en échec de traitement. Même si l'analyse des profils de cytokines n'a pas mis en évidence de corrélation avec la réponse au BCG, il semble se dégager une tendance pour le groupe en échec ou récidive après traitement avec : un taux élevé d'IL-6 avant le traitement évoluant vers une diminution des dosages réalisé avant les instillations à H0, un faible taux d'IL-2 évoluant peu sous traitement, une absence de sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL17, un pic faible de sécrétion des cytokines à J42H4.

En ce qui concerne l'analyse des PBMC, notre étude n'a pas mis en évidence de variation significative au cours du traitement. L'action sur le système immunitaire périphérique semble donc faible lors des instillations endo-vésicales de BCG. A l'inverse, même s'il s'agissait d'une population différente de la population de l'étude initiale, nous avons mis en évidence une modification de l'infiltration lympho-macrocytaire peri-tumorale différente en fonction des antécédents ou non de BCG. Il semble donc y avoir tout de même un recrutement de cellules immuno-compétentes dans la paroi vésicale induite par le BCG. Ce type d'infiltration par des cellules quiescentes pourrait également avoir un effet pronostique sur la réponse au traitement et le risque de récidive sur le moyen ou long terme.

L'intérêt d'établir un tel profil à la fois de sécrétion des cytokines au cours du traitement par BCG et d'établir à la fin du traitement le type d'infiltration lympho-macrocytaire dans la paroi vésicale induit par ces instillations, peut permettre, pour l'avenir, de faire un traitement à la carte aux patients en fonction de cette réponse induite.

# PERSPECTIVES

## 8 PERSPECTIVES

### 8.1 PUBLICATIONS

Ce travail de thèse de sciences a été réalisé dans le cadre d'une étude prospective avec une analyse des données uniquement à la fin car ce n'était pas possible auparavant du fait de la collecte des échantillons. Ceci explique donc pourquoi il n'y a pas eu de publications spécifiques sur cette étude. La première perspective est donc de publier au moins 2 articles sur ce travail : un 1<sup>er</sup> article sur les profils de sécrétion des cytokines urinaires lors du traitement par BCG et un 2<sup>ème</sup> article sur la stroma réaction péri-tumorale par immuno-histo-chimie. Eventuellement un 3<sup>ème</sup> article sera réalisé sur la réaction des PBMC au cours du traitement par BCG mais probablement moins pertinent.

### 8.2 AXES DE RECHERCHE

Ce travail a mis en avant plusieurs points intéressants qui méritent d'être approfondis. En effet, le BCG est efficace dans la prise en charge des tumeurs de vessie non infiltrant le muscle (TVNIM). Son mécanisme d'action reste encore mal défini. Cependant les instillations de BCG n'ont pas une véritable action anti-tumorale (excepté pour le carcinome in situ) mais elles permettent surtout de limiter le risque de voir apparaître une nouvelle tumeur lors du suivi. Par conséquent, plus que de s'intéresser au mécanisme immunologique induit lors des instillations de BCG, il semble intéressant de s'intéresser aux conséquences induites par le BCG pour limiter la récurrence tumorale.

#### **- Interleukine-6**

Nous avons observé que l'IL-6 était à un taux significatifs dans les urines des patients en échec immédiat du BCG, ceci avant même de débiter les instillations et tout au long du traitement. A l'opposé, les patients ayant répondu au BCG, ont eu un taux d'IL-6 très faible. Par conséquent, on peut se poser la question de savoir si un taux urinaire d'IL-6 ne serait pas le

témoin de cellules tumorales persistante dans la vessie pouvant expliquer l'échec du BCG. Il serait donc intéressant d'évaluer la production d'IL-6 chez des patients ayant une tumeur de vessie en comparant ce taux à une population saine. Ainsi on pourrait corrélérer le taux d'IL-6 à la présence de cellules tumorales ce qui imposerait de refaire une résection de vessie, si l'IL-6 est significatif, avant de débiter un traitement par BCG qui serait voué à l'échec.

#### **- Profil de sécrétion des cytokines urinaires**

Nous avons mis en évidence que le profil de sécrétion des cytokines est variable pour chaque patient avec tout de même des tendances qui semblent se dégager même si pas corrélérer de manière franche avec la réponse au traitement par BCG. Dans le groupe en échec ou récurrence après le traitement de BCG, il a été observé: un taux élevé d'IL-6 avant le traitement évoluant vers une diminution des dosages réalisés avant les instillations à H0, un faible taux d'IL-2 évoluant peu sous traitement, une absence de sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL17, un pic faible de sécrétion des cytokines à J42H4.

Il paraît donc possible et intéressant d'essayer d'établir des nomogrammes prédictifs, sur un plus large échantillon, de la réponse au BCG en fonction du profil immunologique et également de corrélérer la production des cytokines aux effets secondaires. Ceci permettrait de prédire avec plus de précision la réponse de l'hôte et probablement adapter au mieux la prise en charge thérapeutique.

#### **- Infiltration des lymphocytes T $\gamma\delta$**

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ont un rôle important dans l'immunité transitionnelle à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Ils sont également impliqués dans l'infection au BCG. Différents travaux ont mis en évidence une augmentation de l'infiltration de la paroi vésicale lors des tumeurs de vessie traitées par instillation de BCG. Le recrutement et l'infiltration pariétale de ces lymphocytes T  $\gamma\delta$  induit par le BCG pourrait donc être un point important pour limiter le risque de récurrence tumorale. Il semble donc intéressant de corrélérer l'infiltration de lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans la paroi vésicale induite à la fin des 6 instillations de BCG en particulier dans les granulomes inflammatoires et la réponse au BCG à moyen terme. De même, on pourrait corrélérer cette infiltration de lymphocytes T  $\gamma\delta$  et la réponse à un traitement d'entretien de BCG.

# REFERENCES

## 9 REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(4):225-49.
2. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol.* 2006;49(3):466-5; discussion 75-7.
3. Malmstrom PU, Sylvester RJ, Crawford DE, Friedrich M, Kroke S, Rintala E, et al. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2009;56(2):247-56.
4. Pfister C, Roupret M, Wallerand H, Davin JL, Quintens H, Guy L, et al. Recommandations en Onco-Urologie 2010: Tumeurs urothéliales. *Prog Urol.* 2010;20 Suppl 4:S255-74.
5. Gattegno B, Chopin D. Histoire naturelle des tumeurs superficielles de la vessie. *Prog Urol.* 2001;11(5):963-90.
6. Gontero P, Bohle A, Malmstrom PU, O'Donnell MA, Oderda M, Sylvester R, et al. The role of bacillus Calmette-Guerin in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2010;57(3):410-29.
7. Nadler RB, Catalona WJ, Hudson MA, Ratliff TL. Durability of the tumor-free response for intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy. *J Urol.* 1994;152(2 Pt 1):367-73.
8. Sylvester RJ, van der MA, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol.* 2002;168(5):1964-70.
9. Lamm DL. Carcinoma in situ. *Urol Clin North Am.* 1992;19(3):499-508.
10. Chopin D, Saint F, Gattegno B. Immunothérapie endovésicale: le Bacille de Calmette-Guérin. *Prog Urol.* 2001;11(5):1067-115.
11. Lamm DL, van der Meijden PM, Morales A, Brosman SA, Catalona WJ, Herr HW, et al. Incidence and treatment of complications of bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy in superficial bladder cancer. *J Urol.* 1992;147(3):596-600.
12. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Schneider M, Cattani A, Schlumberger JR, et al. Active immunotherapy for acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 1969;1(7597):697-9.

13. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol.* 1976;116(2):180-3.
14. Ratliff TL, Kavoussi LR, Catalona WJ. Role of fibronectin in intravesical BCG therapy for superficial bladder cancer. *J Urol.* 1988;139(2):410-4.
15. Hudson MA, Brown EJ, Ritchey JK, Ratliff TL. Modulation of fibronectin-mediated Bacillus Calmette-Guerin attachment to murine bladder mucosa by drugs influencing the coagulation pathways. *Cancer Res.* 1991;51(14):3726-32.
16. Parsons CL. The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/urethritis. *Urology.* 2007;69(4 Suppl):9-16.
17. De Reijke TM, De Boer LC, Steerenberg PA, Vos PC, Kurth KH, Schamhart DH. The effects of intravesical pretreatment with pentosan polysulfate on the bacillus Calmette-Guerin induced immune reaction of the guinea pig. *J Urol.* 1994;151(3):746-9.
18. Kresowik TP, Griffith TS. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Immunotherapy.* 2009;1(2):281-8.
19. Thanhauser A, Bohle A, Schneider B, Reiling N, Mattern T, Ernst M, et al. The induction of bacillus-Calmette-Guerin-activated killer cells requires the presence of monocytes and T-helper type-1 cells. *Cancer Immunol Immunother.* 1995;40(2):103-8.
20. Lattime EC, Gomella LG, McCue PA. Murine bladder carcinoma cells present antigen to BCG-specific CD4+ T-cells. *Cancer Res.* 1992;52(15):4286-90.
21. Zlotta AR, Drowart A, Van Vooren JP, de Cock M, Pirson M, Palfliet K, et al. Evolution and clinical significance of the T cell proliferative and cytokine response directed against the fibronectin binding antigen 85 complex of bacillus Calmette-Guerin during intravesical treatment of superficial bladder cancer. *J Urol.* 1997;157(2):492-8.
22. Janis EM, Kaufmann SH, Schwartz RH, Pardoll DM. Activation of gamma delta T cells in the primary immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Science.* 1989;244(4905):713-6.
23. Kaufmann SH. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol Today.* 1995;16(7):338-42.
24. Munk ME, Gatrill AJ, Schoel B, Gulle H, Pfeffer K, Wagner H, et al. Immunity to mycobacteria: possible role of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes. *Apmis.* 1990;98(8):669-73.
25. Ratliff TL, Gillen D, Catalona WJ. Requirement of a thymus dependent immune response for BCG-mediated antitumor activity. *J Urol.* 1987;137(1):155-8.
26. Ratliff TL, Ritchey JK, Yuan JJ, Andriole GL, Catalona WJ. T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. *J Urol.* 1993;150(3):1018-23.

27. Haanen JB, de Waal Malefijt R, Res PC, Kraakman EM, Ottenhoff TH, de Vries RR, et al. Selection of a human T helper type 1-like T cell subset by mycobacteria. *J Exp Med*. 1991;174(3):583-92.
28. McAveney KM, Gomella LG, Lattime EC. Induction of TH1- and TH2-associated cytokine mRNA in mouse bladder following intravesical growth of the murine bladder tumor MB49 and BCG immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 1994;39(6):401-6.
29. Bohle A, Gerdes J, Ulmer AJ, Hofstetter AG, Flad HD. Effects of local bacillus Calmette-Guerin therapy in patients with bladder carcinoma on immunocompetent cells of the bladder wall. *J Urol*. 1990;144(1):53-8.
30. el-Demiry MI, Smith G, Ritchie AW, James K, Cumming JA, Hargreave TB, et al. Local immune responses after intravesical BCG treatment for carcinoma in situ. *Br J Urol*. 1987;60(6):543-8.
31. Leong AS, Wannakrairot P, Jose J, Milios J. Bacillus Calmette-Guerin-treated superficial bladder cancer: correlation of morphology with immunophenotyping. *J Pathol*. 1990;162(1):35-41.
32. Peuchmaur M, Benoit G, Vieillefond A, Chevalier A, Lemaigre G, Martin ED, et al. Analysis of mucosal bladder leucocyte subpopulations in patients treated with intravesical Bacillus Calmette-Guerin. *Urol Res*. 1989;17(5):299-303.
33. Havran WL, Boismenu R. Activation and function of gamma delta T cells. *Curr Opin Immunol*. 1994;6(3):442-6.
34. Wang MH, Chen YQ, Gercken J, Ernst M, Bohle A, Flad HD, et al. Specific activation of human peripheral blood gamma/delta + lymphocytes by sonicated antigens of Mycobacterium tuberculosis: role in vitro in killing human bladder carcinoma cell lines. *Scand J Immunol*. 1993;38(3):239-46.
35. Hoft DF, Brown RM, Roodman ST. Bacille Calmette-Guerin vaccination enhances human gamma delta T cell responsiveness to mycobacteria suggestive of a memory-like phenotype. *J Immunol*. 1998;161(2):1045-54.
36. Honda S, Sakamoto Y, Fujime M, Kitagawa R. Immunohistochemical study of tumor-infiltrating lymphocytes before and after intravesical bacillus Calmette-Guerin treatment for superficial bladder cancer. *Int J Urol*. 1997;4(1):68-73.
37. Saint F, Patard JJ, Irani J, Salomon L, Hoznek A, Legrand P, et al. Leukocyturia as a predictor of tolerance and efficacy of intravesical BCG maintenance therapy for superficial bladder cancer. *Urology*. 2001;57(4):617-21; discussion 21-2.
38. Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, et al. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science*. 1997;278(5343):1623-6.

39. Koga S, Taniguchi K, Nishikido M, Kubota S, Yamashita S, Kanetake H, et al. Development of bacillus Calmette-Guerin-induced antitumor activity in peripheral blood mononuclear cells. *Urol Int*. 1991;47 Suppl 1:80-2.
40. Suttman H, Jocham D, Bohle A, Brandau S. The role of LFA-1 in the lysis of bladder cancer cells by bacillus Calmette-Guerin and interleukin 2-activated killer cells. *Urol Res*. 2002;30(4):233-9.
41. Suttman H, Jacobsen M, Reiss K, Jocham D, Bohle A, Brandau S. Mechanisms of bacillus Calmette-Guerin mediated natural killer cell activation. *J Urol*. 2004;172(4 Pt 1):1490-5.
42. Brandau S, Riemensberger J, Jacobsen M, Kemp D, Zhao W, Zhao X, et al. NK cells are essential for effective BCG immunotherapy. *Int J Cancer*. 2001;92(5):697-702.
43. Conti P, Reale M, Nicolai M, Barbacane RC, Placido FC, Iantorno R, et al. Bacillus Calmette-Guerin potentiates monocyte responses to lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin-1, but not interleukin-6 in bladder cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 1994;38(6):365-71.
44. Kurisu H, Matsuyama H, Ohmoto Y, Shimabukuro T, Naito K. Cytokine-mediated antitumor effect of bacillus Calmette-Guerin on tumor cells in vitro. *Cancer Immunol Immunother*. 1994;39(4):249-53.
45. Pryor K, Goddard J, Goldstein D, Stricker P, Russell P, Golovsky D, et al. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) enhances monocyte- and lymphocyte-mediated bladder tumour cell killing. *Br J Cancer*. 1995;71(4):801-7.
46. Cavaillon JM. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother*. 1994;48(10):445-53.
47. Esuvaranathan K, Alexandroff AB, McIntyre M, Jackson AM, Prescott S, Chisholm GD, et al. Interleukin-6 production by bladder tumors is upregulated by BCG immunotherapy. *J Urol*. 1995;154(2 Pt 1):572-5.
48. de Reijke TM, Vos PC, de Boer EC, Bevers RF, de Muinck Keizer WH, Kurth KH, et al. Cytokine production by the human bladder carcinoma cell line T24 in the presence of bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Urol Res*. 1993;21(5):349-52.
49. Bettex-Galland M, Studer UE, Walz A, Dewald B, Baggiolini M. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 detection in human urine during acute bladder inflammation caused by transurethral resection of superficial cancer and bacillus Calmette-Guerin administration. *Eur Urol*. 1991;19(2):171-5.
50. Bohle A, Nowc C, Ulmer AJ, Musehold J, Gerdes J, Hofstetter AG, et al. Elevations of cytokines interleukin-1, interleukin-2 and tumor necrosis factor in the urine of patients after intravesical bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *J Urol*. 1990;144(1):59-64.

51. De Boer EC, De Jong WH, Steerenberg PA, Aarden LA, Tetteroo E, De Groot ER, et al. Induction of urinary interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, and tumour necrosis factor during intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guerin in superficial bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 1992;34(5):306-12.
52. Fleischmann JD, Toossi Z, Ellner JJ, Wentworth DB, Ratliff TL, Imbembo AL. Urinary interleukins in patients receiving intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer. *Cancer.* 1989;64(7):1447-54.
53. Jackson AM, Alexandroff AB, Kelly RW, Skibinska A, Esuvaranathan K, Prescott S, et al. Changes in urinary cytokines and soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy. *Clin Exp Immunol.* 1995;99(3):369-75.
54. Prescott S, James K, Hargreave TB, Chisholm GD, Smyth JF. Radio-immunoassay detection of interferon-gamma in urine after intravesical Evans BCG therapy. *J Urol.* 1990;144(5):1248-51.
55. Ratliff TL, Haaff EO, Catalona WJ. Interleukin-2 production during intravesical bacille Calmette-Guerin therapy for bladder cancer. *Clin Immunol Immunopathol.* 1986;40(2):375-9.
56. Smith MD, Chandran G, Parker A, Youssef PP, Ahern M, Coleman M, et al. Synovial membrane cytokine profiles in reactive arthritis secondary to intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy. *J Rheumatol.* 1997;24(4):752-8.
57. Taniguchi K, Koga S, Nishikido M, Yamashita S, Sakuragi T, Kanetake H, et al. Systemic immune response after intravesical instillation of bacille Calmette-Guerin (BCG) for superficial bladder cancer. *Clin Exp Immunol.* 1999;115(1):131-5.
58. Luo Y, Chen X, O'Donnell MA. Role of Th1 and Th2 cytokines in BCG-induced IFN-gamma production: cytokine promotion and simulation of BCG effect. *Cytokine.* 2003;21(1):17-26.
59. Balbay D, Ozen H, Ozkardes H, Barut A, Bakkaloglu M, Tasar C, et al. Detection of urinary interleukin-2, interleukin-2 receptor, and tumor necrosis factor levels in patients with superficial bladder tumors after intravesical BCG immunotherapy. *Urology.* 1994;43(2):187-90.
60. Bohle A, Nowc C, Ulmer AJ, Musehold J, Gerdes J, Hofstetter AG, et al. Detection of urinary TNF, IL 1, and IL 2 after local BCG immunotherapy for bladder carcinoma. *Cytokine.* 1990;2(3):175-81.
61. De Jong WH, De Boer EC, Van der Meijden AP, Vegt P, Steerenberg PA, Debruyne FM, et al. Presence of interleukin-2 in urine of superficial bladder cancer patients after intravesical treatment with bacillus Calmette-Guerin. *Cancer Immunol Immunother.* 1990;31(3):182-6.

62. Haaff EO, Catalona WJ, Ratliff TL. Detection of interleukin 2 in the urine of patients with superficial bladder tumors after treatment with intravesical BCG. *J Urol.* 1986;136(4):970-4.
63. Magno C, Melloni D, Gali A, Mucciardi G, Nicocia G, Morandi B, et al. The anti-tumor activity of bacillus Calmette-Guerin in bladder cancer is associated with an increase in the circulating level of interleukin-2. *Immunol Lett.* 2002;81(3):235-8.
64. Saint F, Kurth N, Maille P, Vordos D, Hoznek A, Soyeux P, et al. Urinary IL-2 assay for monitoring intravesical bacillus Calmette-Guerin response of superficial bladder cancer during induction course and maintenance therapy. *Int J Cancer.* 2003;107(3):434-40.
65. Watanabe E, Matsuyama H, Matsuda K, Ohmi C, Tei Y, Yoshihiro S, et al. Urinary interleukin-2 may predict clinical outcome of intravesical bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for carcinoma in situ of the bladder. *Cancer Immunol Immunother.* 2003;52(8):481-6.
66. Sanchez-Carbayo M, Urrutia M, Romani R, Herrero M, Gonzalez de Buitrago JM, Navajo JA. Serial urinary IL-2, IL-6, IL-8, TNFalpha, UBC, CYFRA 21-1 and NMP22 during follow-up of patients with bladder cancer receiving intravesical BCG. *Anticancer Res.* 2001;21(4B):3041-7.
67. Kaempfer R, Gerez L, Farbstein H, Madar L, Hirschman O, Nussinovich R, et al. Prediction of response to treatment in superficial bladder carcinoma through pattern of interleukin-2 gene expression. *J Clin Oncol.* 1996;14(6):1778-86.
68. de Reijke TM, de Boer EC, Kurth KH, Schamhart DH. Urinary cytokines during intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer: processing, stability and prognostic value. *J Urol.* 1996;155(2):477-82.
69. Cockett AT, Davis RS, Cos LR, Wheelless LL, Jr. Bacillus Calmette-Guerin and interleukin-2 for treatment of superficial bladder cancer. *J Urol.* 1991;146(3):766-9; discussion 9-70.
70. Gomella LG, McGinnis DE, Lattime EC, Butler K, Baltish M, Thompson I, et al. Treatment of transitional cell carcinoma of the bladder with intravesical interleukin-2: a pilot study. *Cancer Biother.* 1993;8(3):223-7.
71. Merguerian PA, Donahue L, Cockett AT. Intraluminal interleukin 2 and bacillus Calmette-Guerin for treatment of bladder cancer: a preliminary report. *J Urol.* 1987;137(2):216-9.
72. Lee KE, Weiss GH, O'Donnell RW, Cockett AT. Reduction of bladder cancer growth in mice treated with intravesical Bacillus Calmette Guerin and systemic interleukin 2. *J Urol.* 1987;137(6):1270-3.

73. Xiao Z, Hanel E, Mak A, Moore RB. Antitumor Efficacy of Intravesical BCG, Gemcitabine, Interferon-alpha and Interleukin-2 as Mono- or Combination-Therapy for Bladder Cancer in an Orthotopic Tumor Model. *Clin Med Insights Oncol.* 2011;5:315-23.
74. Li X, Gong ZY, Li H, Wei Q, Shi M, Yang YR. Study on Toll-like receptors expression and cytokine production induced by bacillus Calmette-Guerin in human bladder cancer cell. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2004;42(3):177-81.
75. Chen FH, Crist SA, Zhang GJ, Iwamoto Y, See WA. Interleukin-6 production by human bladder tumor cell lines is up-regulated by bacillus Calmette-Guerin through nuclear factor-kappaB and Ap-1 via an immediate early pathway. *J Urol.* 2002;168(2):786-97.
76. Chen F, Zhang G, Iwamoto Y, See WA. Bacillus Calmette-Guerin initiates intracellular signaling in a transitional carcinoma cell line by cross-linking alpha 5 beta 1 integrin. *J Urol.* 2003;170(2 Pt 1):605-10.
77. Chen F, Langenstroer P, Zhang G, Iwamoto Y, See WA. Androgen dependent regulation of bacillus Calmette-Guerin induced interleukin-6 expression in human transitional carcinoma cell lines. *J Urol.* 2003;170(5):2009-13.
78. Bevers RF, de Boer EC, Kurth KH, Schamhart DH. BCG-induced interleukin-6 upregulation and BCG internalization in well and poorly differentiated human bladder cancer cell lines. *Eur Cytokine Netw.* 1998;9(2):181-6.
79. Zlotta AR, Van Vooren JP, Denis O, Drowart A, Daffe M, Lefevre P, et al. What are the immunologically active components of bacille Calmette-Guerin in therapy of superficial bladder cancer? *Int J Cancer.* 2000;87(6):844-52.
80. Leibovici D, Grossman HB, Dinney CP, Millikan RE, Lerner S, Wang Y, et al. Polymorphisms in inflammation genes and bladder cancer: from initiation to recurrence, progression, and survival. *J Clin Oncol.* 2005;23(24):5746-56.
81. Ahirwar D, Kesarwani P, Manchanda PK, Mandhani A, Mittal RD. Anti- and proinflammatory cytokine gene polymorphism and genetic predisposition: association with smoking, tumor stage and grade, and bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008;184(1):1-8.
82. Luo Y, Han R, Evanoff DP, Chen X. Interleukin-10 inhibits Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells. *Clin Exp Immunol.* 2010;160(3):359-68.
83. Nadler R, Luo Y, Zhao W, Ritchey JK, Austin JC, Cohen MB, et al. Interleukin 10 induced augmentation of delayed-type hypersensitivity (DTH) enhances Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) mediated antitumour activity. *Clin Exp Immunol.* 2003;131(2):206-16.

84. Jackson AM, Alexandrov AB, Prescott S, James K. Production of urinary tumour necrosis factors and soluble tumour necrosis factor receptors in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 1995;40(2):119-24.
85. Shintani Y, Sawada Y, Inagaki T, Kohjimoto Y, Uekado Y, Shinka T. Intravesical instillation therapy with bacillus Calmette-Guerin for superficial bladder cancer: study of the mechanism of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Int J Urol.* 2007;14(2):140-6.
86. Bisiaux A, Thiounn N, Timsit MO, Eladaoui A, Chang HH, Mapes J, et al. Molecular analyte profiling of the early events and tissue conditioning following intravesical bacillus calmette-guerin therapy in patients with superficial bladder cancer. *J Urol.* 2009;181(4):1571-80.
87. Higuchi T, Shimizu M, Owaki A, Takahashi M, Shinya E, Nishimura T, et al. A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(8):1245-55.
88. Lima L, Silva J, Amaro T, Morais A, Lopes C, Medeiros R, et al. IL-4 and TNF-alpha polymorphisms are associated with risk of multiple superficial tumors or carcinoma in situ development. *Urol Int.* 2011;87(4):457-63.
89. Ahirwar DK, Mandhani A, Dharaskar A, Kesarwani P, Mittal RD. Association of tumour necrosis factor-alpha gene (T-1031C, C-863A, and C-857T) polymorphisms with bladder cancer susceptibility and outcome after bacille Calmette-Guerin immunotherapy. *BJU Int.* 2009;104(6):867-73.
90. Ikeda N, Toida I, Iwasaki A, Kawai K, Akaza H. Surface antigen expression on bladder tumor cells induced by bacillus Calmette-Guerin (BCG): A role of BCG internalization into tumor cells. *Int J Urol.* 2002;9(1):29-35.
91. Eto M, Koga H, Noma H, Yamaguchi A, Yoshikai Y, Naito S. Importance of urinary interleukin-18 in intravesical immunotherapy with bacillus calmette-guerin for superficial bladder tumors. *Urol Int.* 2005;75(2):114-8.
92. Patard JJ, Guille F, Lobel B, Abbou CC, Chopin D. Etat actuel des connaissances sur les mécanismes d'action du BCG. *Prog Urol.* 1998;8(3):415-21.
93. O'Donnell MA, Luo Y, Chen X, Szilvasi A, Hunter SE, Clinton SK. Role of IL-12 in the induction and potentiation of IFN-gamma in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol.* 1999;163(8):4246-52.
94. Chen X, O'Donnell MA, Luo Y. Dose-dependent synergy of Th1-stimulating cytokines on bacille Calmette-Guerin-induced interferon-gamma production by human mononuclear cells. *Clin Exp Immunol.* 2007;149(1):178-85.

95. Karakiewicz PI, Benayoun S, Lewinshtein DJ, Chun FK, Shahrour K, Perrotte P. Treatment of BCG failures with intravesical BCG/Interferon: the University of Montreal experience. *Can J Urol*. 2006;13(4):3189-94.
96. Punnen SP, Chin JL, Jewett MA. Management of bacillus Calmette-Guerin (BCG) refractory superficial bladder cancer: results with intravesical BCG and Interferon combination therapy. *Can J Urol*. 2003;10(2):1790-5.
97. Lam JS, Benson MC, O'Donnell MA, Sawczuk A, Gavazzi A, Wechsler MH, et al. Bacillus Calmette-Guerin plus interferon-alpha2B intravesical therapy maintains an extended treatment plan for superficial bladder cancer with minimal toxicity. *Urol Oncol*. 2003;21(5):354-60.
98. O'Donnell MA, Lilli K, Leopold C. Interim results from a national multicenter phase II trial of combination bacillus Calmette-Guerin plus interferon alfa-2b for superficial bladder cancer. *J Urol*. 2004;172(3):888-93.
99. Joudi FN, Smith BJ, O'Donnell MA. Final results from a national multicenter phase II trial of combination bacillus Calmette-Guerin plus interferon alpha-2B for reducing recurrence of superficial bladder cancer. *Urol Oncol*. 2006;24(4):344-8.
100. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004;21(4):467-76.
101. Saban MR, Simpson C, Davis C, Wallis G, Knowlton N, Frank MB, et al. Discriminators of mouse bladder response to intravesical Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *BMC Immunol*. 2007;8:6.
102. Takeuchi A, Dejima T, Yamada H, Shibata K, Nakamura R, Eto M, et al. IL-17 production by gammadelta T cells is important for the antitumor effect of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin treatment against bladder cancer. *Eur J Immunol*. 2011;41(1):246-51.
103. McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM, Chapman JR, Bolton EM, Carter NP, et al. Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation*. 1986;42(4):352-8.
104. de Boer EC, Rooyakkers SJ, Schamhart DH, de Reijke TM, Kurth KH. BCG dose reduction by decreasing the instillation frequency: effects on local Th1/Th2 cytokine responses in a mouse model. *Eur Urol*. 2005;48(2):333-8.
105. Hermann GG, Petersen KR, Zeuthen J, Steven K. Intravesical BCG therapy in bladder carcinoma. Effect on cytotoxicity, IL-2 production and phenotype of peripheral blood mononuclear cells. *Scand J Urol Nephrol*. 1991;25(4):269-73.
106. Agarwal A, Verma S, Burra U, Murthy NS, Mohanty NK, Saxena S. Flow cytometric analysis of Th1 and Th2 cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55(6):734-43.

107. Kitamura H, Torigoe T, Honma I, Sato E, Asanuma H, Hirohashi Y, et al. Effect of human leukocyte antigen class I expression of tumor cells on outcome of intravesical instillation of bacillus calmette-guerin immunotherapy for bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(15):4641-4.
108. Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(5):539-46.
109. Scotet E, Nedellec S, Devilder MC, Allain S, Bonneville M. Bridging innate and adaptive immunity through gammadelta T-dendritic cell crosstalk. *Front Biosci.* 2008;13:6872-85.
110. Nedellec S, Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: from signals to functions. *Semin Immunol.* 2010;22(4):199-206.
111. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):467-78.
112. Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, Bennouna J, Mosnier JF, Scotet E, et al. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol.* 2005;175(8):5481-8.
113. Raziuddin S, Shetty S, Ibrahim A. Phenotype, activation and lymphokine secretion by gamma/delta T lymphocytes from schistosomiasis and carcinoma of the urinary bladder. *Eur J Immunol.* 1992;22(2):309-14.
114. Christmas TJ. Lymphocyte sub-populations in the bladder wall in normal bladder, bacterial cystitis and interstitial cystitis. *Br J Urol.* 1994;73(5):508-15.
115. Alexandroff A, Black J, Bollina P, James K. Differential production of gamma delta T cells in the urine of bladder cancer patients receiving Bacillus Calmette Guerin immunotherapy. *Int J Oncol.* 1997;10(2):387-93.
116. Devilder MC, Maillet S, Bouyge-Moreau I, Donnadieu E, Bonneville M, Scotet E. Potentiation of antigen-stimulated V gamma 9V delta 2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation. *J Immunol.* 2006;176(3):1386-93.
117. Naoe M, Ogawa Y, Takeshita K, Morita J, Iwamoto S, Miyazaki A, et al. Bacillus Calmette-Guerin-pulsed dendritic cells stimulate natural killer T cells and gammadeltaT cells. *Int J Urol.* 2007;14(6):532-8; discussion 8.
118. Deknuydt F, Scotet E, Bonneville M. Modulation of inflammation through IL-17 production by gammadelta T cells: mandatory in the mouse, dispensable in humans? *Immunol Lett.* 2009;127(1):8-12.
119. Sivick KE, Schaller MA, Smith SN, Mobley HL. The innate immune response to uropathogenic Escherichia coli involves IL-17A in a murine model of urinary tract infection. *J Immunol.* 2010;184(4):2065-75.

120. Yuasa T, Sato K, Ashihara E, Takeuchi M, Maita S, Tsuchiya N, et al. Intravesical administration of gammadelta T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(4):493-502.
121. Suzuki T, Terao S, Acharya B, Naoe M, Yamamoto S, Okamura H, et al. The antitumour effect of {gamma}{delta} T-cells is enhanced by valproic acid-induced up-regulation of NKG2D ligands. *Anticancer Res.* 2010;30(11):4509-13.