

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

CARACTÉRISATION DES NOUVEAUX DÉRIVÉS DE L'ACIDE
AMINOBENZOÏQUE (DABS) AYANT DES ACTIVITÉS
ANTI-INFLAMMATOIRE ET ANTI-TUMORALE
SUR LE CANCER DE LA VESSIE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
YASSINE OUFQIR

MAI 2022

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je voudrais dans un premier temps remercier, mon directeur de recherche Dr Carlos Reyes-Moreno de m'avoir donné la chance de réaliser ce travail au sein de son laboratoire. J'ai toujours apprécié votre sens très développé, votre rigueur dans l'accomplissement de chaque tâche, vos qualités humaines sans égal et votre esprit très ouvert. Merci pour votre patience, disponibilité et surtout vos judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je remercie également mon codirecteur, Dr Gervais Bérubé pour l'aide précieuse et les nombreuses molécules fournies par son laboratoire, ce projet serait impossible sans ces molécules prometteuses. Merci pour votre temps ainsi que votre confiance.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour leur aide dans la réalisation de ce projet :

Dr Julie Girouard pour vos conseils, votre aide, votre soutien et votre sympathie et surtout de m'avoir appris les différentes techniques en biologie cellulaire et moléculaire.

Dr Jovane Hamelin Morrissette pour votre confiance, votre gentillesse, vos critiques constructives et vos conseils m'étaient d'une grande utilité dans l'accomplissement de mes tâches.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire d'immuno-oncologie de l'UQTR : Laurie Fortin, Marion Ravelojaona, Nihad Khiat pour leur collaboration et serviabilité qu'elles m'ont témoignées durant ces dernières années. Merci beaucoup mes très chères amies.

Finalement, je tiens à remercier Céline Van Themsche et Lionel Berthoux qui ont mis à notre disposition des instruments qui nous ont permis de réaliser plusieurs expériences tout au long de ma maîtrise.

Enfin la difficulté tient plutôt dans le fait de n'oublier personne dans mes remerciements. J'exprime toute ma gratitude envers les personnes dont les noms n'apparaîtraient pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre. Ils se reconnaîtront. Merci à tous et pour tout.

DÉDICACE

Je dédie cet ouvrage

À mes parents qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années d'études.

Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

À mes frères, ma Femme et ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

À tous mes ami(e)s qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

À tous ceux que j'aime.

RÉSUMÉ

L'inflammation chronique joue un rôle crucial dans le développement et la progression du cancer de la vessie urothélial (CVU). Afin d'offrir une opportunité unique de traitement pour ce type de cancer, un dérivé d'hydrazide, le DAB-1, a récemment été identifié dans notre laboratoire comme un médicament potentiel pour cibler l'inflammation liée au cancer. Dans des modèles précliniques de CVU murin, ce composé particulier a montré une activité anticancéreuse remarquable. Le DAB-1 est fabriqué à partir de l'acide *para*-aminobenzoïque et porte deux composants différents, une partie maléimide et une partie hydrazide, qui sont essentiels pour son activité anti-inflammatoire et ses propriétés anticancéreuses. Afin d'améliorer son potentiel biologique, la partie hydrazide a été modifiée pour fournir trois molécules de deuxième génération nommées DAB-2-28, DAB-2-31E et DAB-2-31B, et deux molécules de troisième génération nommées DAB-3-27 et DAB-3-33. Dans le but de déterminer les activités anticancéreuses et anti-inflammatoires de ces nouvelles molécules DAB, différentes études *in vitro* ont été réalisées pour évaluer leurs effets sur le comportement des cellules de CVU murines, notamment la signalisation cellulaire via l'immunodétection des protéines, la réponse inflammatoire cellulaire via la mesure de la production d'oxyde nitrique (NO), et la toxicité cellulaire via la viabilité/prolifération cellulaire. L'activité anti-inflammatoire a été confirmée *in vivo* en utilisant un modèle d'inflammation aiguë induite par la carraghénane, et *ex vivo* en utilisant des macrophages isolés de la cavité péritonéale de souris. Le modèle murin préclinique de CVU, avec les cellules tumorales MB49-I ectopiques, a été utilisé pour évaluer les effets antitumoraux et anti-métastatiques du DAB le plus puissant *in vitro*. Les données des études *in vitro* ont révélé que, parmi les différentes molécules DAB étudiées, le DAB-2-28 présente une activité cytotoxique moindre avec une plus grande efficacité que le DAB-1 pour inhiber la production de NO induite par la combinaison de l'IFN γ avec le TNF α ainsi que l'activation des voies de signalisation pro-tumorale et pro-inflammatoire IL6/STAT3 et TNF α /NF κ B. De plus, alors que le DAB-2-28 présente une activité anti-inflammatoire *in vivo* similaire à celle du DAB-1, il a efficacement inhibé l'expression des enzymes iNOS et COX-2 induite par l'activation combinée de l'IFN γ avec le LPS dans les macrophages péritonéaux. Particulièrement, l'analyse de la cinétique de croissance des tumeurs MB49-I implantées par voie sous-cutanée chez des souris C57Bl/6 a montré que le DAB-2-28 était plus efficace pour inhiber le développement tumoral. En conclusion, cette étude a apporté la preuve préclinique du principe de la molécule DAB-2-28 dans le traitement du CVU.

Mots-clés : Thérapie anti-cancer, inflammation, cancer de la vessie, DABs, oxyde nitrique, facteur nucléaire kappa B, signal transducer and activator of transcription 3, inductible NO synthase, cyclo-oxygénase 2.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iv
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	ix
LISTE DES SYMBOLES	x
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer de la vessie urothélial.....	1
1.1.1 Définition, épidémiologie et statistiques	1
1.1.2 Facteurs de risque	1
1.1.3 Signes et symptômes	2
1.1.4 Méthodes diagnostiques	3
1.1.5 Stades du cancer de la vessie	4
1.1.6 Traitements standards	6
1.1.7 Inhibiteurs du point de contrôle immunitaire	8
1.2 Inflammation et cancer de la vessie urothélial	11
1.2.1 Rôle de l'inflammation dans le cancer de la vessie urothélial	11
1.2.2 Anti-inflammatoires non stéroïdiens et cancer de la vessie urothélial	14
1.3 Thérapie du cancer de la vessie à base des dérivés du PABA.....	17
1.3.1 Mise en place d'une thérapie à base d'anti-inflammatoires dérivés du PABA.....	17
1.3.2 Mise en évidence des propriétés anti-inflammatoires des DABs	17
1.3.3 Mise en évidence des propriétés anti-cancéreuses et anti-métastatiques des DABs.....	18
1.3.4 Études structure-activité basées sur DAB-1	21
1.4 La problématique.....	25
1.5 L'hypothèse	27
1.6 Objectifs	27

CHAPITRE II	Approches expérimentales et méthodologies.....	28
2.1	Les DABs de 2 ^e et 3 ^e génération à l'étude.....	28
2.2	Culture cellulaire	30
2.3	Évaluation de la production de NO par le test de réactif de Griess.....	30
2.4	Évaluation de la viabilité/prolifération cellulaire par le test de MTT	31
2.5	Évaluation du niveau d'activation des voies de signalisation intracellulaire	32
2.6	Évaluation de l'activité inflammatoire à l'aide d'un modèle d'inflammation aiguë chez la souris.....	33
2.7	Modèle de tumeur de cancer murin de la vessie.....	34
2.8	Analyse statistique.....	34
CHAPITRE III	RÉSULTATS	35
3.1	Étude sur la relation structure–activité des molécules DABs de 2 ^e génération....	35
3.2	Étude sur la relation structure–activité des molécules DABs de 3 ^e génération ...	40
3.3	Évaluation de l'activité anti-inflammatoire des DABs dans un modèle d'inflammation aiguë chez la souris	44
3.4	Effets des DABs sur l'expression des enzymes iNOS et COX-2 par des macrophages péritonéaux isolés de souris CD-1	47
3.5	Cinétique de croissance des tumeurs MB49-I en réponse à DAB-2-28	49
CHAPITRE IV	DISCUSSION	51
4.1	Analyse critique des études proposées	51
4.2	Perspectives d'une thérapie du cancer de la vessie avec les DABs	59
CONCLUSION	61
BIBLIOGRAPHIE	62

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Illustration de la composition de la vessie et de l'invasion tumorale par stade de la tumeur.	5
1.2 Illustration des voies de signalisation TNF α /NF κ B et IL6/STAT3.	14
1.3 Structure chimique des plus communs AINS utilisés en clinique.	15
1.4 Illustration de la molécule de base, PABA, et de son dérivé, DAB-1.	18
1.5 Méthode de synthèse de DAB-1.	19
1.6 Activités anti-cancer et anti-métastatique de DAB-1 sur les tumeurs ectopiques dérivées des cellules MB49-I.	20
1.7 Régulation de DAB-1 et des composants de base de DAB-1 sur la production de NO par les cellules MB49-I.	22
1.8 Structure chimique de DAB-1 et DAB-0.	23
1.9 Représentation graphique de la viabilité cellulaire relative et de la production de NO dans la lignée cellulaire murine MB49-I.	24
1.10 Images représentatives et analyse graphique de STAT1 phosphorylée (p-STAT1) dans des cellules MB49-I.	24
2.1 Structure des molécules DABs de 2 ^e et 3 ^e génération.	28
2.2 Méthode de synthèse des composés de 2 ^e et 3 ^e génération à partir de DAB-1.	29

3.1	Évaluation de l'activité cytotoxique et anti-inflammatoire de DAB-1 et les DABs de 2 ^e génération dans les cellules MB49-I.....	37
3.2	Évaluation de la capacité de DAB-1 et les DABs de 2 ^e génération à inhiber la voie de signalisation IL6/STAT3 dans les cellules MB49-I.....	38
3.3	Évaluation de la capacité de DAB-1 et les DABs de 2 ^e génération à inhiber la voie de signalisation TNF α /NF κ B dans les cellules MB49-I	39
3.4	Évaluation de la capacité de DAB-1 et les DABs de 3 ^e génération à inhiber la voie de signalisation IL6/STAT3 dans les cellules MB49-I.....	41
3.5	Évaluation de la capacité de DAB-1 et les DABs de 3 ^e génération à inhiber la voie de signalisation TNF α /NF κ B dans les cellules MB49-I.	42
3.6	Effets des DABs sur la production d'oxyde nitrique (NO) en fonction de la viabilité cellulaire	44
3.7	Effet anti-inflammatoire de DAB-1, DAB-2-28 et DAB-3-33 dans un modèle d'inflammation aiguë chez la souris.....	46
3.8	Effets des DABs sur l'expression des enzymes iNOS et COX-2 par des macrophages péritonéaux isolés de souris CD-1	48
3.9	Croissance tumorale des cellules MB49-I ectopiques en réponse à la thérapie moléculaire DAB-1 et DAB-2-28.....	50

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

BCG	Vaccin Bacille de Calmette-Guérin
CVU	Cancer de la vessie urothélial
COX-2	Cyclo-oxygénase 2
DAB	Dérivés de l'acide para-aminobenzoïque
I κ B	Kappa B inhibiteur
IP	Intrapéritonéale
iNOS	Inducible NO synthase
MIBC	Muscle invasive bladder cancer
M Φ	Macrophages
NF κ B	Facteur nucléaire kappa B
NMIBC	Non-muscle invasive bladder cancer
NO	Oxyde nitrique
PABA	Para-aminobenzoic acid
PBS	Tampon phosphate salin
PCI	Points de contrôle immunitaire
PD-1	Programmed Cell Death-1
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1
RTU	Résection transurétrale
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha

LISTE DES SYMBOLES

α	Alpha
β	Beta
$^{\circ}$	Degré
γ	Gamma
κ	Kappa
μ	Micro
%	Pourcent

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer de la vessie urothélial

1.1.1 Définition, épidémiologie et statistiques

Le cancer de la vessie urothélial (CVU) est le 5^e cancer le plus fréquent au Canada, soit le 4^e chez l'homme et le 11^e chez la femme et compte pour plus de 4 % de tous les cancers. On estime que 12 200 Canadiens ont reçu un diagnostic de CVU en 2020 et que 2 600 Canadiens en sont morts [1]. Bien que le CVU soit généralement considéré comme une maladie des personnes âgées avec un âge moyen du diagnostic de 65 ans, il peut survenir à tout âge [1]. Le CVU demeure l'un des cancers les plus coûteux à traiter par patient en raison de son taux élevé de récurrence (60-70%) [1]. Plus de 90 % des cas sont des carcinomes urothéliaux, dont près de 70 % présentent une maladie superficielle (non invasive). Seuls environ 20 % des patients présentent une maladie invasive au niveau des muscles et moins de 10 % des patients présentent une maladie métastatique au moment de la consultation [2].

1.1.2 Facteurs de risque

Le tabagisme est le facteur de risque principal du CVU. En effet, la moitié des cas de CVU sont reliés à du tabagisme. Les fumeurs ont un risque trois fois plus élevé de contracter un CVU durant leur vie comparativement aux non-fumeurs [3]. Bien que le mécanisme exact par lequel le tabagisme induit le CVU ne soit pas encore clair,

on pense que les produits chimiques des cigarettes sont éliminés dans l'urine après avoir été filtrés par les reins. Cela permet un contact direct des substances chimiques cancérigènes issues de la cigarette avec la muqueuse de la vessie, ce qui peut provoquer l'apparition d'un cancer de la vessie au niveau de l'urothélium. Cependant, malgré la diminution du taux de tabagisme, l'incidence du CVU est restée stable. En outre, les hommes ont toujours un risque plus élevé de développer un CVU que les femmes, même chez les non-fumeurs, ce qui suggère que d'autres facteurs tels que les expositions environnementales et la prédisposition génétique peuvent également contribuer au développement du CVU [4].

L'exposition professionnelle dans l'industrie des produits chimiques est également un facteur de risque important. Les personnes qui travaillent dans des usines de peinture, de caoutchouc, de cuir et de teintures, exposées aux produits chimiques contenus dans ces matériaux sont toutes sujets à des risques plus élevés de développement du CVU. Les amines aromatiques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques comptent parmi les substances les plus courantes associées à une augmentation du risque de CVU [5]. Mis à part les expositions professionnelles, des facteurs environnementaux, tels que la consommation d'eau à forte concentration d'arsenic ou de chlore, augmentent aussi le risque de développer un CVU [6].

Les autres facteurs de risques sont iatrogéniques secondaires à la chimiothérapie à base de cyclophosphamides [7] ou encore des dommages physiques à l'urothélium comme des infections chroniques ou des dommages causés par de l'instrumentation médicale [8].

1.1.3 Signes et symptômes

Le signe le plus fréquent du CVU est l'hématurie (présence de sang dans l'urine), qui est présente chez environ 85 % des patients, bien que parfois l'urine semble normale et que du sang soit détecté lors d'un test de laboratoire [9]. En cas d'hématurie

visible, la couleur de l'urine peut devenir orange, rose ou rouge et dans tous les cas, l'hématurie peut être continue ou intermittente. D'autres symptômes peuvent comprendre des douleurs et des brûlures à la miction, ainsi qu'un besoin d'uriner urgent et fréquent. Les symptômes du CVU peuvent être identiques à ceux d'une infection vésicale (cystite) et les deux maladies peuvent être concomitantes. En ce qui concerne un cancer en phase avancée, les symptômes peuvent être des douleurs aux os provenant de métastases osseuses, ou des douleurs aux flancs provenant de métastases s'étant logées dans la zone rétropéritonéale [10].

1.1.4 Méthodes diagnostiques

Comme mentionné précédemment, l'hématurie est souvent le premier signe détectable d'un CVU. Ainsi, les patients présentant de l'hématurie seront souvent eux-mêmes les premiers à identifier ce signe [11].

La première étape du diagnostic consiste à recueillir les antécédents médicaux et à procéder à un examen physique et interne. Ensuite, une analyse d'urine et une cytologie urinaire sont effectuées pour examiner la présence de cellules cancéreuses dans l'urine du patient. Cette méthode est particulièrement efficace pour l'identification de cancers de grade et stade élevé, mais moins pour des tumeurs de bas grade [12].

Un pyélogramme intraveineux peut être effectué pour confirmer la présence d'une tumeur dans le système urinaire. Cette procédure nécessite l'injection d'un produit de contraste dans la veine et la prise de radiographies séquentielles pendant que le produit traverse le rein, les uretères et la vessie [13].

Pour approfondir l'examen, une cystoscopie peut également être réalisée, car elle permet de regarder à l'intérieur de la vessie à l'aide d'une caméra et de vérifier la présence de zones anormales. En général, une biopsie de la tumeur est effectuée en

même temps que la cystoscopie. Il est parfois possible d'enlever la totalité de la tumeur lors d'une biopsie [14].

1.1.5 Stades du cancer de la vessie

La vessie est un sac musculaire composé de plusieurs couches de tissus distincts, qui sert de réservoir temporaire à l'urine produite par les reins [15]. L'une des principales fonctions des reins est d'éliminer de la circulation sanguine divers ions, solutés et déchets métaboliques, dont certains sont potentiellement toxiques. La paroi de la vessie est donc continuellement exposée à des concentrations élevées de composés présents dans l'urine. Il est crucial que la vessie empêche tout échange de déchets et d'eau entre l'urine, les tissus et le sang tout au long du cycle mictionnel. La barrière de perméabilité est assurée par l'urothélium, la muqueuse la plus interne composée de 5 à 7 couches cellulaires d'épithélium stratifié qui recouvre la plupart des voies urinaires [15]. Puis, il y a la sous-muqueuse qui contient des vaisseaux sanguins, des nerfs et des glandes, appelée aussi chorion ou laminae propria. La troisième couche est composée de cellules musculaires lisse appelées détrusor recouvrant le chorion. Cette couche permet à la vessie de se distendre et de se contracter et ainsi à faciliter la miction. Finalement, une couche de tissus adipeux et conjonctifs recouvre l'extérieure de la vessie [15].

Le cancer de la vessie est classé en fonction de l'invasion et de la propagation, à l'aide du système de classification TNM (Tumor, Node, Metastasis) de l'Américan Joint Committee on Cancer [16]. Le stade de la tumeur décrit la profondeur à laquelle la tumeur s'est développée dans la paroi de la vessie, et si elle s'est étendue à d'autres organes (**Figure 1.1**) [17]. Le cancer de la vessie est largement divisé en cancer de la vessie non invasif sur le plan musculaire (NMIBC) de stades Ta, Tis et T1, et en cancer de la vessie invasif sur le plan musculaire (MIBC) de stades T2-T4 si la croissance de la tumeur s'étend dans la couche musculaire ou au-delà [17-19].

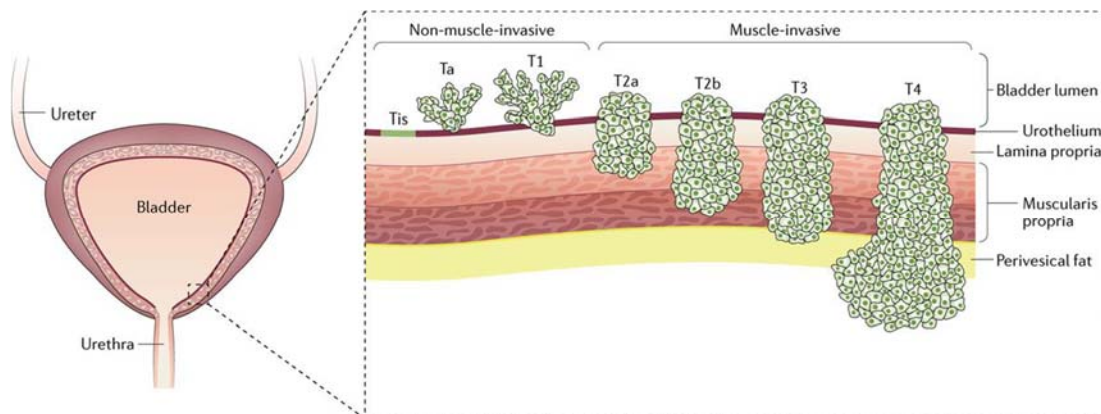


Figure 1.1 Illustration de la composition de la vessie et de l'invasion tumorale par stade de la tumeur [17].

Les tumeurs de stade Ta sont des tumeurs superficielles non invasives qui présentent généralement une croissance papillaire dans la lumière de la vessie (**Figure 1.1**). Elles sont strictement confinées à la muqueuse épithéliale et n'envahissent pas la membrane basale. Si le carcinome est dépourvu de morphologie papillaire et présente un modèle de croissance plat, il est classé comme Tis (carcinome *in situ*). Les tumeurs de stade T1 ont envahi la couche stromale sous-épithéliale, mais pas la couche musculaire. Si une tumeur envahit la couche musculaire de la vessie, elle est de stade T2 ou plus, selon l'étendue de l'invasivité. Les tumeurs T2 s'étendent jusqu'à la couche musculaire, tandis que les tumeurs T3 présentent une extension périvésicale et les tumeurs T4 une extension aux tissus environnants tels que la prostate, l'utérus, le vagin ou la paroi pelvienne ou abdominale [17-19]. Les désignations de stade TX indiquent que la tumeur primaire n'a pas pu être évaluée, tandis que T0 indique qu'il n'y a pas de preuve de tumeur primaire. La présence, ou non de cellules cancéreuses dans les ganglions et des métastases est essentiel pour le pronostic du patient, mais plus difficile à déterminer [20, 21]. Les méthodes d'imagerie telles que la tomographie par émission de positrons et la tomographie par émission de positrons et la tomographie par émission de positrons (Positron Emission Tomography and Computed Tomography, ou PET/CT) peuvent détecter des ganglions lymphatiques pelviens hypertrophiés, mais un

examen pathologique des tissus post-chirurgicaux est généralement nécessaire pour confirmer si la tumeur s'est propagée aux ganglions lymphatiques, en raison de la faible sensibilité des tests d'imagerie. Le statut des ganglions est classé en N0-N3 en fonction de l'emplacement et du nombre de ganglions positifs, tandis que le statut M0-M1 décrit la présence de métastases. Nx et Mx indiquent que le statut ganglionnaire et métastatique n'a pas pu être évalué [20, 21].

1.1.6 Traitements standards

En raison de l'évolution imprévisible de la maladie, du taux élevé de récurrence et du risque de progression, les patients atteints d'un CVU nécessitent un suivi continu et coûteux pour le patient et pour le système de santé [22]. Cela fait du CVU l'un des cancers les plus coûteux par patient [23]. Le stade de la tumeur du patient constitue le facteur crucial pour le choix du traitement. Pour les patients atteints de CVU de stade Ta, Tis et T1, le traitement standard est la résection transurétrale (RTU) de la tumeur, combinée le plus souvent à une immunothérapie intravésicale avec le Bacillus Calmette-Guérin (BCG) ou à une chimiothérapie cytostatique en utilisant la mitomycine C, un médicament réticulant l'ADN, ou des agents intercalant l'ADN comme l'épirubicine ou la pirarubicine. La thérapie intravésicale est particulièrement bien adaptée aux NMIBC et vise à réduire le risque de récurrence et de progression [24]. Il a été démontré que la chimiothérapie réduit de manière significative le taux de récurrences, mais qu'elle a peu d'effet sur le taux de progression [25].

Le BCG a été développé comme vaccin vivant atténué contre la tuberculose au début du 20^e siècle. Dans les années 1930, on a remarqué que les patients atteints de tuberculose avaient une incidence de cancer plus faible, donc le BCG a été proposé comme thérapie potentielle du cancer. La première utilisation du BCG pour le traitement du CVU a été signalée en 1976 [26].

La chimiothérapie intravésicale et le BCG réduisent tous deux de manière significative le taux de récurrences tumorales, mais la réduction est plus importante avec l'utilisation du BCG. Ce dernier a également l'avantage de réduire le taux de progression, et il est considéré comme le traitement de choix pour le NMIBC [27]. L'utilisation du BCG est principalement limitée par l'admissibilité des patients en raison de sa toxicité et d'une récente pénurie d'approvisionnement associée à sa production [28]. Le mode d'action de l'immunothérapie par le BCG est complexe et n'est pas entièrement compris. L'instillation intravésicale du BCG provoque une réaction inflammatoire pouvant participer aux phénomènes cytotoxiques et se traduisant par la libération d'interleukine (IL)-1, IL-6 et IL-8 suite à la phagocytose, par des cellules présentatrices d'antigènes (c.-à-d. cellules dendritiques), des bacilles qui ont adhéré à l'urothélium. La reconnaissance des antigènes (Ag) bactériens par les lymphocytes T CD4+ va permettre la prolifération des lymphocytes T CD8+, des macrophages (MΦs) et des lymphocytes Natural Killer (NK) qui seront responsables de la destruction des cellules tumorales [29]. Bien que le BCG soit en général efficace, le traitement échoue chez 30 à 40 % des patients [30]. Il a été rapporté que le taux de survie des patients évoluant d'un NMIBC à un MIBC peut être pire que celui des patients atteints d'un MIBC sans antécédents d'un NMIBC.

La méthode de traitement la plus appropriée pour les T1 à haut risque et les tumeurs invasives musculaires primaires ou évolutives opérables (stade \geq T2) est la cystectomie radicale. Il s'agit d'une chirurgie à visée curative impliquant l'ablation de la vessie urinaire et une lymphadénectomie pelvienne, qui s'accompagne toujours d'une prostatectomie chez les hommes ou généralement d'une hystérectomie chez les femmes. Si le patient est éligible, la cystectomie peut être associée à une chimiothérapie néoadjuvante systémique pour cibler les micrométastases potentielles avant la chirurgie, ce qui permet d'augmenter de 5 à 8 % la survie globale et de 9 % la survie spécifique au cancer [31, 32].

Pour les patients atteints de cancers métastatiques, la survie sans traitement est très limitée. Par conséquent, le traitement par chimiothérapie systémique est souvent la seule option possible. La chimiothérapie consiste principalement en une combinaison à base de cisplatine, par exemple gemcitabine avec cisplatine, ou encore méthotrexate, vinblastine et adriamycine avec cisplatine. Ces régimes sont parfois également utilisés dans le cadre d'un traitement adjuvant. Entre 13 et 35 % des patients traités ont une réponse complète au traitement [33].

1.1.7 Inhibiteurs du point de contrôle immunitaire

Le traitement par inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (PCI) est de loin l'avancée récente la plus importante dans le traitement du CVU et du cancer en général [34]. Pour survivre et proliférer, les tumeurs adoptent souvent des stratégies d'échappement immunitaire qui les protègent contre le système immunitaire. La compréhension de l'interaction entre la tumeur et le système immunitaire a conduit au développement de cette nouvelle classe de médicaments qui perturbe cet échappement immunitaire. Dans le corps humain, environ 150 milliards de cellules meurent naturellement chaque jour, qui sont éliminées principalement par les MΦs et les cellules dendritiques par phagocytose. Les cellules dendritiques sont également appelées cellules présentatrices d'antigènes professionnelles et forment un lien entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif en internalisant des auto-antigènes (antigène du soi) et des non-antigènes et en les transformant en peptides qui sont ensuite affichés par les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). Les cellules dendritiques arrivent ensuite à maturité et migrent vers les ganglions lymphatiques régionaux par le biais du système de vaisseaux lymphatiques. Si les antigènes que la cellule dendritique présente sont immunogènes, ils peuvent interagir avec les lymphocytes T et les préparer en induisant leur expansion et leur maturation en lymphocytes T effecteurs. Bien que les tumeurs soient issues de cellules hôtes, elles peuvent être immunogènes en raison de protéines mutées [35, 36]. Cependant,

comme les cellules normales, elles possèdent une série de récepteurs membranaires de surface qui interagissent avec les récepteurs membranaires de surface des cellules du système immunitaire, ce qui fournit des signaux à la fois stimulants et inhibiteurs. Les signaux provenant de ces interactions fonctionnent comme des points de contrôle immunitaires équilibrés, cruciaux pour le maintien de l'autotolérance, c'est-à-dire pour éviter l'auto-immunité. Bien que la description ci-dessus soit très simplifiée, la thérapie anti-PCI actuelle est largement basée sur le ciblage des récepteurs qui fournissent les signaux inhibiteurs empêchant les cellules T de cibler les cellules cancéreuses, induisant ou rétablissant ainsi une réponse immunitaire anti-tumorale. Les anti-PCI actuels ciblent principalement l'interaction entre PD-1 (programmed cell death-1) et PD-L1 (Programmed cell death-ligand 1), qui sont des membres de la superfamille des immunoglobulines. PD-L1 est exprimé à la fois sur les cellules hématopoïétiques et nonhématopoïétiques, tandis que PD-1 est exprimé à la surface des lymphocytes T. L'interaction PD-L1/PD-1 se traduit par une interaction entre les cellules T et les cellules tumorales. L'interaction PD-L1/PD-1 entraîne un "épuiement des cellules T" qui nuit à l'activité cytotoxique et diminue la production de cytokines effectrices, ce qui entraîne une inhibition de la réponse immunitaire [37, 38].

Cinq anticorps monoclonaux IgG humains distincts qui ciblent l'interaction entre PD-1 et PD-L1 ont été approuvés pour le traitement du CVU au stade avancé par la FDA américaine entre 2016 et 2017; Pembrolizumab (Keytruda, Merck and Co. Inc.)[39] et Nivolumab (Opdivo, Bristol-Myers Squibb Co.)[40] qui ciblent PD1, et Atezolizumab (Tecentriq, Genentech Inc.)[41], Avelumab (Bavencio, EMD Serono Inc)[42] et Durvalumab (Imfinzi, AstraZeneca UK Limited)[43] qui ciblent PD-L1. Les approbations couvrent l'utilisation en deuxième ou première ligne pour les patients qui ont échoué au traitement conventionnel ou qui ne sont pas éligibles au traitement standard. Les essais cliniques réalisés à ce jour ont montré des taux de réponse compris entre 15 et 30 % environ, plusieurs patients ayant obtenu une réponse complète [44]. Les propriétés sous-jacentes de la tumeur et de l'hôte qui régissent la réponse sont un

domaine d'étude essentiel, car l'activation réussie des lymphocytes T antitumoraux est influencée à la fois par une série de propriétés génomiques de la tumeur[45], et par les interactions complexes au sein du microenvironnement tumoral, composé d'une variété de cellules immunitaires et stromales et de facteurs sécrétés en plus des cellules tumorales. Les termes "chaud" et "froid" sont souvent utilisés pour décrire les tumeurs présentant un microenvironnement immunogène ou non immunogène [46, 47]. Les biomarqueurs qui permettent d'identifier de manière fiable les tumeurs hautement immunogènes ou de prédire la réponse sont activement recherchés, cela implique les moyens d'augmenter l'immunogénicité d'une tumeur "froide", ce qui pourrait étendre les avantages du traitement par inhibition des points de contrôle à un plus grand nombre de patients. Plusieurs grands essais de phase III sont en cours dans le cas du CVU (par exemple IMvigor130 (NCT02807636), DANUBE (NCT02516241), KEYNOTE-361 (NCT02853305), CheckMate-901 (NCT03036098) et JAVELIN Bladder 100 (NCT02603432)) avec des objectifs de recrutement d'environ 1000 patients chacun. De nombreuses études portent sur les inhibiteurs de PD-1 ou de PD-L1 en association avec d'autres inhibiteurs de PCI (par exemple Tremelimumab ou Ipilimumab ciblant CTLA-4), d'autres formes d'agents immunomodulateurs, ou avec des thérapies ciblées [48, 49]. Les inhibiteurs de PCI sont également en cours d'évaluation pour leur innocuité, leur efficacité et leur interaction avec le BCG chez les patients atteints de NMIBC de haut grade (par exemple NCT02324582, NCT02808143, NCT02792192, NCT02625961 et NCT02844816). La thérapie par inhibition des PCI étant si fortement dépendante du système immunitaire, il est probable que les résultats de la recherche obtenus à partir de la multitude d'études en cours sur les anti-PCI et l'immunoncologie dans de nombreux types de cancer différents auront une pertinence pancréatique pour la prédiction de la réponse, l'augmentation de l'activité des lymphocytes T, la promotion d'un microenvironnement immunogène, la levée de la résistance, la gestion des effets secondaires, la prolongation des réponses et, en fin de compte, l'amélioration du taux de survie des patients [50-52].

1.2 Inflammation et cancer de la vessie urothélial

1.2.1 Rôle de l'inflammation dans le cancer de la vessie urothélial

L'inflammation est une réponse immunitaire adaptative responsable de la protection de l'organisme contre le stress extrinsèque et endogène et de la médiation du processus d'élimination et de réparation qui suit sa résolution [53]. De manière générale, l'inflammation peut être divisée en une phase aiguë hautement régulée et une phase inflammatoire chronique soutenue qui persiste lorsque la réponse aiguë est insuffisante pour atténuer la menace induite. La présence d'une inflammation chronique a été impliquée dans toutes les facettes du développement des tumeurs, notamment l'initiation, la promotion et la progression des cellules tumorales [53].

Dans les tissus normaux, la réponse inflammatoire aiguë est activée par la reconnaissance de facteurs exogènes qui peuvent être de nature microbienne ou non, ou par des facteurs endogènes résultant d'une lésion cellulaire ou tissulaire, comme par exemple, un tissu nécrotique [54]. Les MΦs, les mastocytes et les cellules endothéliales à proximité de l'infection ou de la blessure libèrent des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL6) et des vasodilatateurs qui signalent le recrutement de protéines plasmatiques et de neutrophiles phagocytaires dans la région touchée. La vasodilatation locale permet la diffusion des protéines plasmatiques et des neutrophiles du réseau capillaire dans le tissu, ce qui entraîne des symptômes caractéristiques de la réponse inflammatoire aiguë, comme la rougeur, la chaleur et le gonflement [55]. Le contact direct avec l'irritant ou avec les cytokines libérées par les tissus lésés déclenche la libération par les neutrophiles de granules enzymatiques chargés d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) et d'enzymes protéolytiques capables de décomposer l'agent pathogène ou le tissu endommagé [56]. La neutralisation réussie de l'irritant déclenche la résolution de la phase inflammatoire aiguë par les MΦs et permet la réparation des tissus [57]. À ce stade, l'équilibre de la production de cytokines

se déplace vers les cytokines anti-inflammatoires (IL4, IL10) qui freinent la production de prostaglandines pro-inflammatoires et limitent le recrutement des neutrophiles, permettant ainsi l'élimination des cellules mortes et le remodelage/réparation des tissus par les MΦs. Une infection récalcitrante ou une irritation tissulaire persistante qui ne se résorbe pas peuvent cependant déclencher une réponse inflammatoire accrue caractérisée par le remplacement des neutrophiles par des MΦs et la génération de lymphocytes T effecteurs [57]. La prolongation de cet état inflammatoire intensifié conduit à une inflammation chronique localisée dans la zone touchée. Dans un état inflammatoire chronique localisé, l'exposition prolongée des cellules environnantes aux ROS et RNS produits par les cellules immunitaires au site de l'inflammation peut entraîner des ruptures de brins d'ADN contribuant à des erreurs de réplication et à l'instabilité génomique, à l'induction de mutations oncogènes et à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, qui peuvent collectivement contribuer à l'initiation de tumeurs [58]. En outre, ces espèces réactives peuvent endommager la membrane cellulaire par des réactions de peroxydation des lipides et interférer avec le traitement des protéines et les fonctions homéostatiques cellulaires, contribuant ainsi à la promotion des tumeurs [59].

Dans la vessie, les facteurs qui prédisposent l'urothélium à un état d'inflammation chronique soutenue semblent également augmenter le risque de CVU [58-60]. Ainsi, dans le cas de CVU, l'initiation, la promotion et la progression de la maladie seraient associées à des épisodes chroniques d'inflammation causés par la fumée de cigarette, les infections des voies urinaires ou les cystites inflammatoires chroniques [61-63]. Certaines cellules, cytokines et voies de signalisation inflammatoires jouent un rôle clé lors de ce processus [58, 64-66]. Parmi les cellules inflammatoires, la présence d'un nombre élevé de MΦs serait associée avec le développement des tumeurs plus agressives et à un mauvais pronostic [67-69]. Dans ce contexte, nos études ont démontré que les macrophages pro-inflammatoires M1 peuvent augmenter l'invasion des cellules humaines de CVU [70]. Parmi les médiateurs inflammatoires, on retrouve

les cytokines TNF α et IL6 qui activent respectivement les facteurs de transcription NF κ B et STAT3 (**Figure 1.2**) [58, 64-66, 71]. Le mécanisme d'action de TNF α implique une liaison avec son récepteur transmembranaire (TNFR1) qui va activer le complexe protéique inhibiteur kappa-Kinase (I κ K). Celui-ci, va aller phosphoryler la protéine de séquestration I κ β et ainsi entraîner deux réactions : la libération de la protéine NF κ B ainsi que l'ubiquitination de p-I κ B. Lorsque NF κ B est libéré, il sera transloqué à l'intérieur du noyau pour ainsi aller se lier à son promoteur et activer la transcription d'une foule de gènes favorisant le développement tumoral (**Figure 1.2**) [58, 64-66, 71]. La voie de signalisation engendrée par liaison d'IL-6 et de son récepteur IL6R implique l'activation des protéines « Janus Kinase » (JAK) qui vont phosphoryler les protéines STAT3, provoquant ainsi leur dimérisation et leur translocation dans le noyau. L'activation des voies de signalisation TNF α /NF κ B et IL6/STAT3 seraient entre autres responsables d'induire une conversion des cellules épithéliales normales vers un phénotype tumorigène très invasif via l'activation du programme cellulaire de transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM) [72-74]. Il s'agit d'un processus clé dans la cascade métastatique qui est caractérisé par une augmentation de l'invasion et de la migration des cellules tumorales [75]. Le processus TEM serait essentiel pour les stades précoces de la cancérogenèse, de l'invasion musculaire et de la récurrence dans les cas de CVU [76-81]. Une activation induite et constitutive de NF κ B et STAT3 serait associée à la promotion de la survie, l'invasion et la métastase tumorales [82-86]. L'activation et l'interaction entre STAT3 et NF κ B jouent un rôle vital dans le contrôle de la communication entre les cellules cancéreuses et les cellules inflammatoires intra-tumorales [87, 88]. Par ailleurs, il a été démontré que la tumeur peut contribuer à maintenir NF κ B et STAT3 constamment activés dans les leucocytes intra-tumoraux [89, 90]. Une activité constitutive de NF κ B et STAT3 inhiberait les réponses immunes anti-tumorales des M Φ s, des cellules T CD8⁺ cytotoxiques, des cellules NK et des neutrophiles. Ces études ont démontré que le

ciblage de NFκB et de STAT3 dans les cellules hématopoïétiques peut induire une immunité thérapeutique anti-tumorale efficace [89, 90].

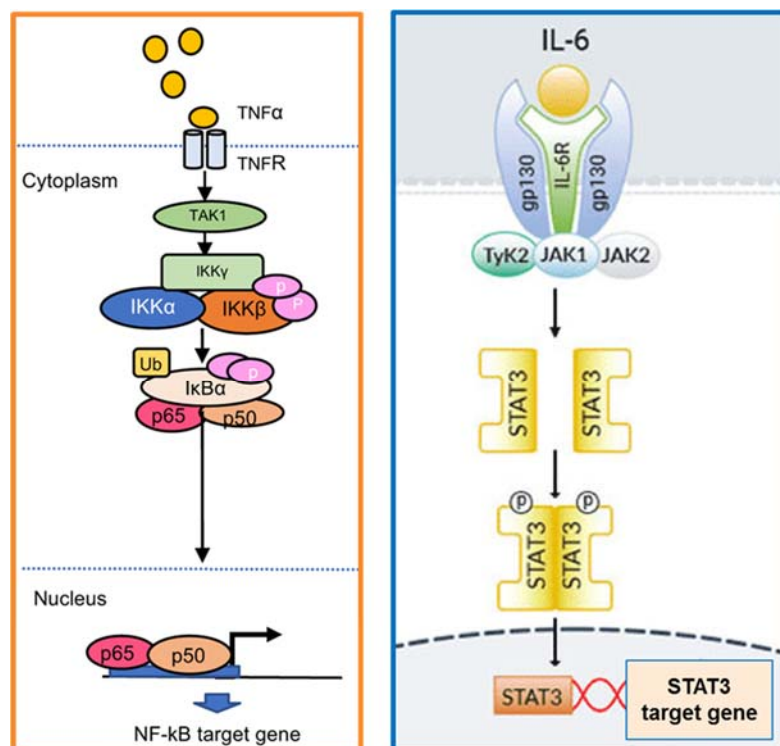


Figure 1.2 Illustration des voies de signalisation TNFα/NFκB et IL6/STAT3 [58, 64-66, 71].

1.2.2 Anti-inflammatoires non stéroïdiens et cancer de la vessie urothélial

Étant donné que l'inflammation chronique joue un rôle critique à différents stades du développement tumoral [53], l'utilisation de composés anti-inflammatoires peut avoir un grand impact non seulement pour le traitement du cancer, mais également pour la prévention et la protection contre les maladies cancéreuses. Parmi les cibles explorées dans la lutte contre l'inflammation liée au cancer figurent les enzymes cyclo-oxygénase 2 (COX-2) et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), les facteurs de transcription STAT3 et NFκB et les cytokines IL6 et TNFα et leurs récepteurs (IL6R et TNFR) [91]. De nombreux médicaments utilisés dans la lutte contre l'inflammation liée au cancer

appartiennent à la classe des médicaments appelés anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) [92]. Certains exemples des AINS comprennent l'aspirine, l'ibuprofène, l'indométhacine, le naproxène et le célécoxib (**Figure 1.3**).

Les AINS sont un groupe hétérogène de composés dont leur structure chimique est très diverse mais qui ont un mécanisme d'action similaire, c'est-à-dire la capacité à bloquer l'enzyme COX-2 ou la prostaglandine endoperoxyde H synthase (PGHS). Ces médicaments ont aussi des effets secondaires généralement similaires, y compris des complications gastro-intestinales et parfois, cardiovasculaires.

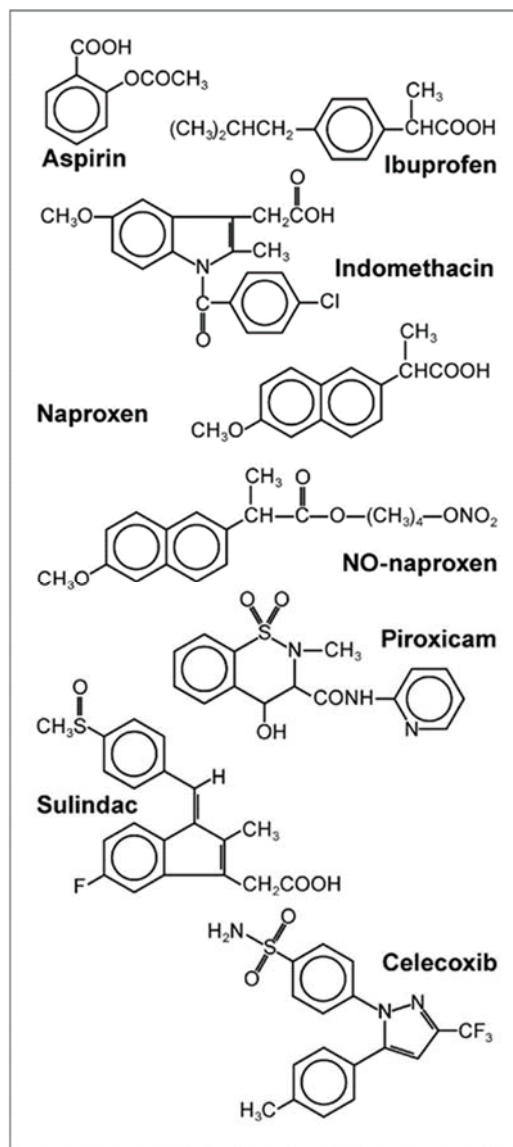


Figure 1.3 Structure chimique des plus communs AINS utilisés en clinique [92].

L'inhibition de l'enzyme COX-2 peut être considérée comme une stratégie anticancer à privilégier car l'un des principaux produits de son activité, la prostaglandine E₂, est augmentée dans les cellules cancéreuses [93] et est capable de stimuler la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses [94]. L'usage des AINS comme stratégie de thérapie anticancer est d'autant pertinente pour traiter le CVU du fait que le tabagisme est un facteur de risque important et que les constituants de la fumée de tabac augmentent l'expression de la COX-2 [95, 96]. Étant donné que de nombreuses études ont suggéré que l'aspirine avait un effet préventif potentiel dans plusieurs types de cancers [97, 98], son rôle dans le CVU a également retenu l'attention. Au fait, le haut niveau d'expression/activité de COX-2 est à la fois associé à une augmentation des propriétés malignes des cellules de CVU mais également lié à l'incidence de cas de CVU de haut grade et de stade avancé [99, 100]. On pense que l'activité antitumorale de l'aspirine repose principalement sur deux mécanismes différents. Premièrement, l'aspirine peut interférer avec la cancérogenèse en inhibant la COX-2, qui est produite en réponse à l'inflammation. Deuxièmement, l'aspirine joue un rôle anticancer en promouvant l'apoptose ou en inhibant la prolifération des cellules tumorales [101, 102]. Cependant, une importante analyse multicohorte portant sur l'utilisation des AINS, avec et sans aspirine, a conclu à une réduction du risque de CVU chez les hommes et les femmes qui ont déclaré une utilisation régulière des AINS sans aspirine par rapport à ceux qui n'ont déclaré aucune utilisation [103]. Le célécoxib est un autre AINS à l'étude qui serait considéré comme le futur traitement standard pour les patients atteints d'un NMIBC. Cependant, bien que le célécoxib à doses modérées-élevées puisse prévenir ou retarder les récurrences chez les patients présentant un NMIBC, le risque accru d'événements cardiovasculaires graves ne justifierait pas son utilisation en clinique [104, 105].

1.3 Thérapie du cancer de la vessie à base des dérivés de l'acide para-aminobenzoïque (Para-aminobenzoic acid ,ou PABA)

1.3.1 Mise en place d'une thérapie à base d'anti-inflammatoires dérivés du PABA

Notre équipe de recherche a établi une collaboration avec l'équipe du Dr. Gervais Bérubé (UQTR, Département de chimie, biochimie et physique) dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses, innovantes et plus efficaces que celles connues actuellement pour cibler l'inflammation liée au cancer. L'hypothèse à la base de ce projet est qu'une inactivation intracellulaire des principales voies de signalisation inflammatoires chez les leucocytes et la tumeur pourrait prévenir efficacement la promotion et la progression des cancers vers des formes très létales. Pour valider cette hypothèse, de nouveaux composés dérivés de l'acide *para*-aminobenzoïque (PABA), appelés DABs, ont été synthétisés et caractérisés dans nos laboratoires [106-108].

1.3.2 Mise en évidence des propriétés anti-inflammatoires des DABs

Les DABs de première génération fournis par le laboratoire du Dr. Bérubé ont fait l'objet d'une première étude au sein de notre laboratoire [108]. En résumé, cette étude a démontré que les DABs inhibent les voies de signalisation $INF\gamma/STAT1$ et $IL6/STAT3$ dans les M Φ s humains (cellules macrophagiques THP1). L' $INF\gamma$, par l'intermédiaire de l'activation du facteur de transcription STAT1, est connu pour induire l'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires dans les M Φ , tels que les cytokines $TNF\alpha$ et IL6, et les récepteurs de surface cellulaire *cluster of differentiation-40* (CD40) et *major histocompatibility complex-II* (MHC-II) [108, 109]. Nos études par cytométrie en flux ont démontré qu'un prétraitement avec les DABs diminue l'expression de CD40 et MHC-II dans les M Φ s humains stimulés avec l' $INF\gamma$. D'autre part, il est connu que l'activation de la voie de signalisation $IL6/STAT3$ est essentielle à la migration et à la différenciation des M Φ s [108, 110]. Ainsi, l'évaluation de la migration cellulaire

des MΦs à l'aide du test de cicatrisation (« *scratch test* ») a révélé que, par rapport aux MΦs témoins non traitées, les DABs peuvent réduire significativement la migration cellulaire induite par l'IL6. D'ailleurs, l'INF γ et le TNF α sont considérés comme les cytokines les plus importantes impliquées dans la production de NO par les MΦs tissulaires [108, 111]. Ainsi, en utilisant les cellules macrophagiques J774A.1, nos mesures de la production de NO avec le réactif de Griess a démontré que les DABs peuvent réduire de façon significative la réponse inflammatoire induite par l'effet combiné des cytokines INF γ et TNF α dans les MΦs de souris [108, 112]. La molécule ayant démontré la plus grande activité anti-inflammatoire a été considérée comme la molécule thérapeutique principale (« *lead molecule* ») et appelée DAB-1 (**Figure 1.4**).

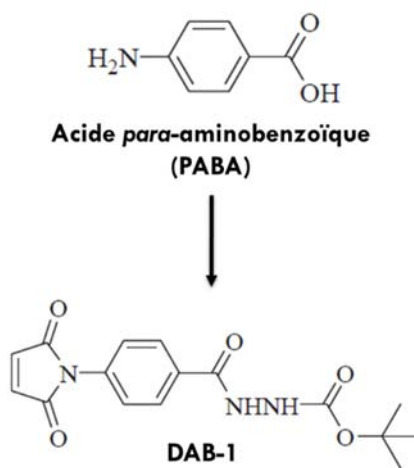


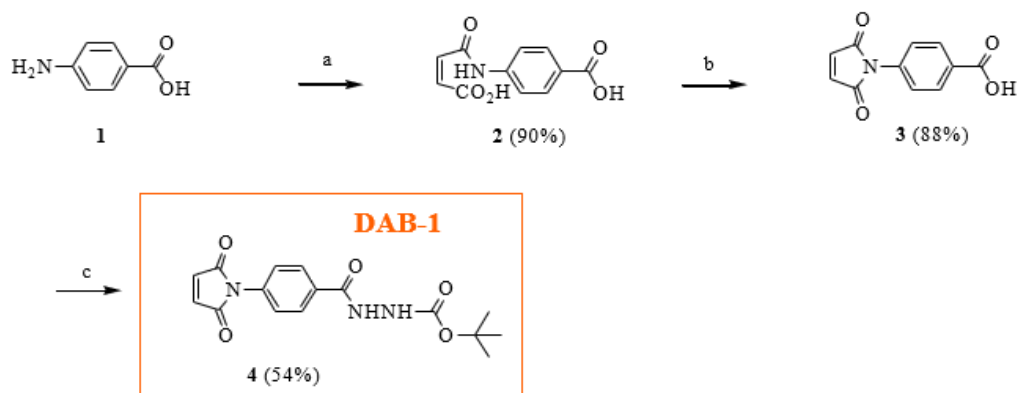
Figure 1.4 Illustration de la molécule de base, PABA, et de son dérivé, DAB-1.

1.3.3 Mise en évidence des propriétés anti-cancéreuses et anti-métastatiques des DABs

À la suite de la caractérisation anti-inflammatoire de DABs, nous nous sommes intéressés à étudier leur effet sur le CVU *in vivo*. Pour traduire nos études *in vitro* dans un modèle de souris, nous avons établi une collaboration avec la Dre Ana Maria Éijan, de l'Université de Buenos Aires, en Argentine. Son équipe de recherche a réussi à développer des modèles précliniques ectopique et orthotopique de CVU avec deux

lignées différentes, la lignée MB49 et son dérivé, la lignée MB49-I. La lignée parentale MB49 produit des tumeurs superficielles alors que la lignée MB49-I est hautement invasive et létale lorsqu'elle est implantée au niveau de la vessie [113]. Le laboratoire de la Dre Éijan est également intéressé par l'aspect inflammatoire du développement tumoral du CVU et son équipe a démontré que des traitements avec des inhibiteurs de l'enzyme iNOS peuvent inhiber la croissance des tumeurs MB49-I [114].

Nous avons utilisé le DAB-1 afin de démontrer les activités anti-cancer et anti-métastatique des DABs. Cette petite molécule « lead » est facile à synthétiser par une séquence de réactions en 3 étapes (**Figure 1.5**).



Reagents and conditions: a) Maleic anhydride (MA), dry acetone, methanol, 22 °C, 1 h; b) 1) Ac₂O, AcONa, 50 °C, 2 h; 2) H₂O, 70 °C, 2 h; c) 1) *iso*-butyl chloroformate, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C, 1 h and 22 °C, 1 h; 2) *tert*-butyl carbazate, CH₂Cl₂, 22 °C, 12 h;

Figure 1.5 Méthode de synthèse de DAB-1 [112].

Une première étude de ciblage moléculaire *in vivo* des tumeurs MB49-I ectopiques a démontré que des injections répétées de DAB-1 à 150 µM réduisaient jusqu'à 10 fois la taille des tumeurs chez les souris porteuses de tumeurs MB49-I (**Figures 1.6A et 1.6B**) [115]. Plus important encore, le nombre de métastases pulmonaires et les taux de survie des souris variaient de 13 et 62 % respectivement dans le groupe témoin, alors

que dans le groupe traité, le nombre de métastases pulmonaires était de 0 % avec un taux de survie de 100 %. Les analyses macroscopique et histologique des poumons des souris porteuses de tumeurs MB49-I a démontré de façon non équivoque l'activité anti-métastatique du composé DAB-1 à une concentration de 150 μM (Figures 1.6C et 1.6D) [115].

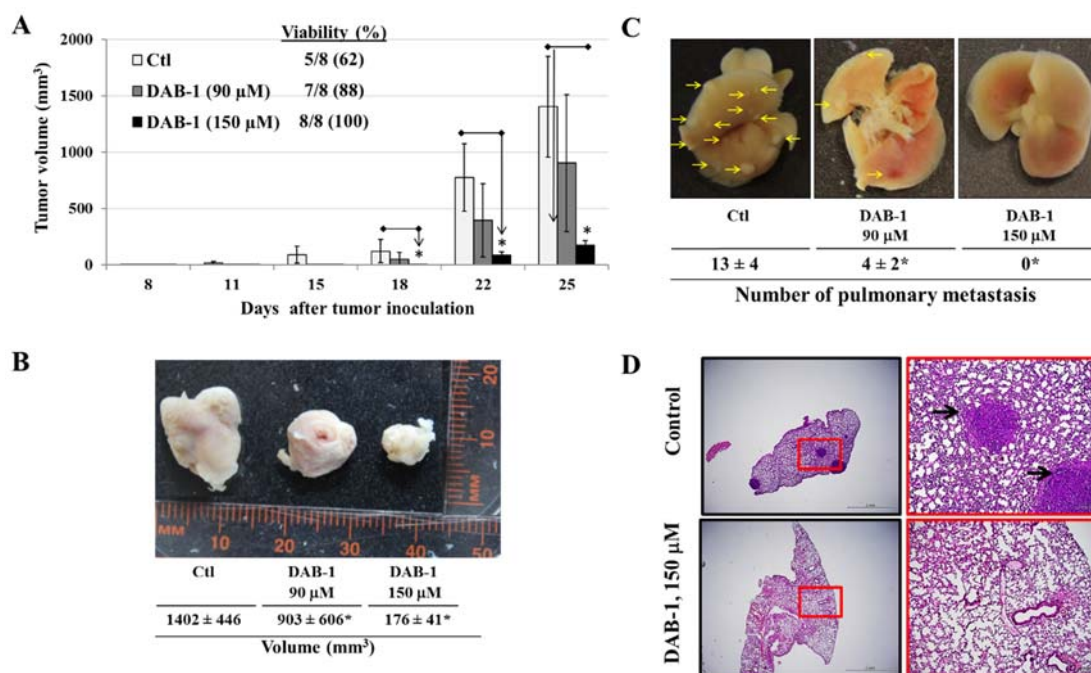


Figure 1.6 Activités anti-cancer et anti-métastatique de DAB-1 sur les tumeurs ectopiques dérivées des cellules MB49-I. **A**, Analyse graphique de la croissance tumorale. **B**, Analyse macroscopique des tumeurs ectopiques à la fin du traitement. **C**, Analyse macroscopique des poumons à la fin du traitement. **D**, Analyse histologique sur des coupes des poumons à la fin du traitement [115].

Nos résultats *in vitro* suggèrent que la principale cible de DAB-1 dans les tumeurs dérivées des cellules MB49-I est la voie de signalisation $\text{TNF}\alpha/\text{NF}\kappa\text{B}/\text{iNOS}/\text{NO}$ [115]. En effet, d'une part, nous avons établi que l'un des principaux mécanismes d'action anti-cancer de la molécule DAB-1 serait sa capacité à inhiber la production de NO en diminuant la synthèse de l'enzyme iNOS. D'autre part, nos études de signalisation ont

montré que les voies inflammatoires $TNF\alpha/NF\kappa B$ et $IL6/STAT3$ sont efficacement inhibées par DAB-1 à des doses aussi faibles que $10\ \mu M$ [115].

Finalement, des études de toxicité subchronique ont démontré que le DAB-1 était très bien toléré (viabilité normale, développement normal, absence d'effet sur l'hématocrite) et aucun signe de toxicité ou de dysfonctionnement du foie, des reins et du cœur n'a été observé à des concentrations allant jusqu'à $300\ \mu M$ [115].

En conclusion, les données précliniques, biologiques et mécanistiques de l'ensemble de nos études fournissent une solide preuve de principe sur le potentiel du DAB-1 en tant qu'agent thérapeutique sûr et efficace pour le traitement des patients atteints de NMIBC et MIBC.

1.3.4 Études structure-activité basées sur DAB-1

Afin de mieux comprendre l'action biologique des DABs de première génération, nous avons divisé la molécule DAB-1 en ses composants de base et nous avons vérifié leur contribution respective à la réponse anti-inflammatoire de la molécule entière (**Figure 1.7**). La molécule a été divisée en trois parties : 1) la molécule de départ, le PABA, 2) la fonction maléimide (côté gauche); et 3) la fonction *tert*-butyloxycarbone (côté droit) (**Figure 1.7**). Tout d'abord, nous avons découvert que le PABA seul et les dérivés de PABA portant uniquement la fonction maléimide ou la fonction *tert*-butyloxycarbone ne présentaient aucune propriété anti-inflammatoire. En fait, seulement la combinaison de PABA avec la fonction *tert*-butyloxycarbonyl (à droite) et la fonction maléimide (à gauche) possède des propriétés anti-inflammatoires importantes [112].

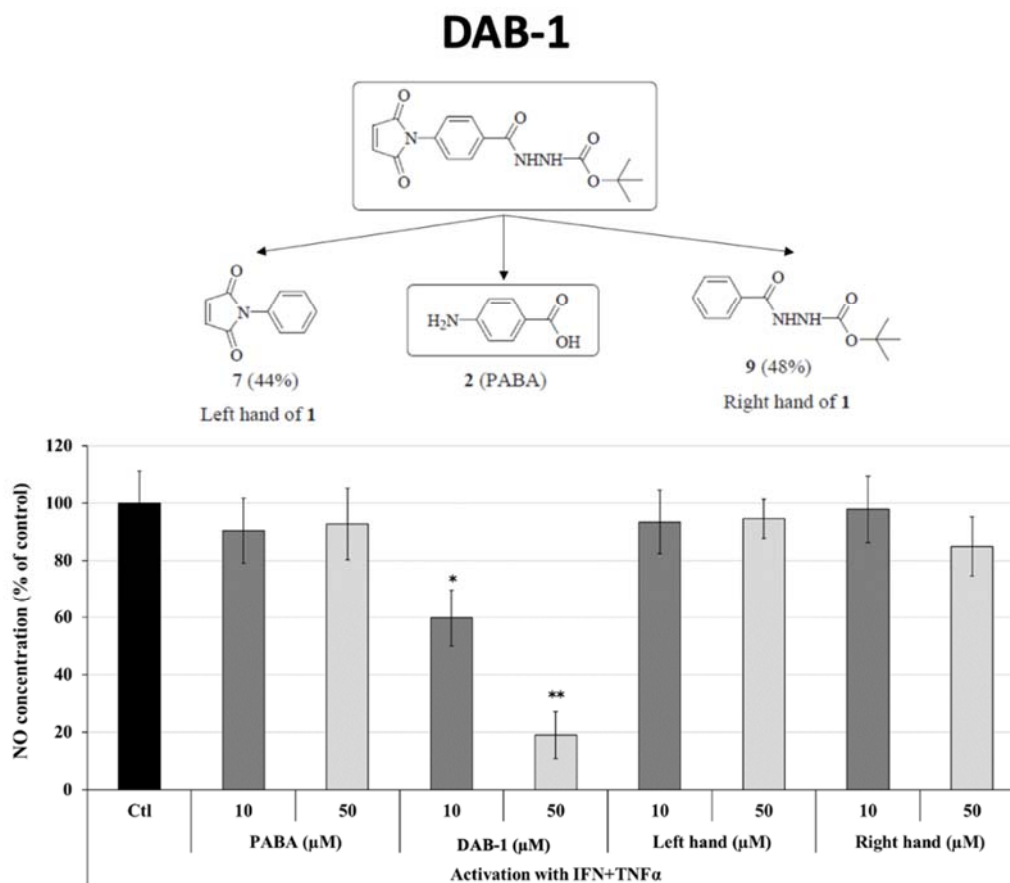


Figure 1.7 Régulation de DAB-1 et des composants de base de DAB-1 sur la production de NO par les cellules MB49-I. Les cellules ont été prétraitées avec le véhicule (contrôle, Ctl), le PABA, le DAB-1 et les parties gauche et droite de DAB-1 et stimulées ensuite avec les cytokines pro-inflammatoires IFN γ et TNF α [112].

Dans une deuxième étude sur la relation entre la structure et la fonction de la molécule DAB-1, nous avons procédé à l'élimination de la double liaison présente dans la fonction maléimide, soit la structure à gauche de la molécule DAB-1 (**Figure 1.8**). La molécule a été appelée DAB-0 [116].

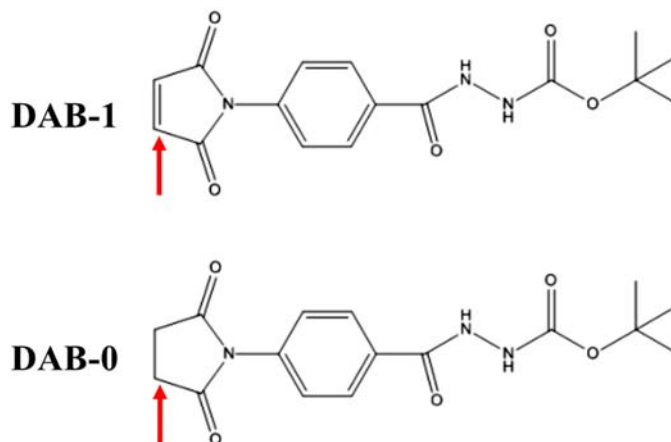


Figure 1.8 Structure chimique de DAB-1 et DAB-0.

D'abord, la toxicité de DAB-1 et DAB-0 a été évaluée par le test MTT sur les cellules MB49-I (**Figure 1.9**). Les résultats démontrent que DAB-0 reste non toxique à des concentrations allant jusqu'à 90 μM , alors que DAB-1 commence à avoir des effets cytotoxiques autour de 60 μM (**Figure 1.9A**). Ensuite, l'activité anti-inflammatoire des deux molécules a été évaluée en mesurant la production de NO dans les cellules MB49-I stimulées par l'IFN γ et le TNF α (**Figure 1.9B**). Nous avons ainsi établi que contrairement à DAB-1, qui inhibe significativement la production de NO à partir d'une concentration de 30 μM , DAB-0 n'est pas capable d'inhiber la production de NO. Enfin, les études de signalisation ont montré que DAB-0 n'interfère pas avec l'activation de STAT1 induite par l'IFN γ ni avec celle de NF κ B induite par le TNF α (**Figure 1.10**). Dans l'ensemble, cette série d'expériences a ainsi permis d'établir que la double liaison dans l'hétérocycle de la partie gauche de la molécule DAB-1 est essentielle pour exercer une inhibition sur les voies de signalisation qui, une fois activées, mènent à la production de NO.

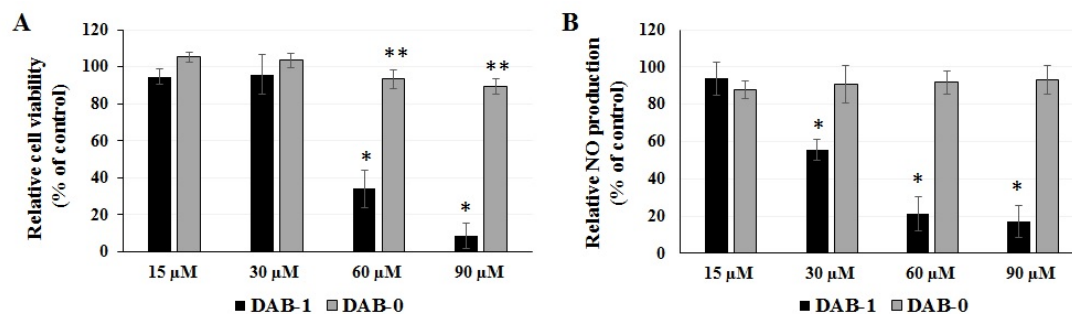


Figure 1.9 Représentation graphique de la viabilité cellulaire relative (A) et de la production de NO (B) dans la lignée cellulaire murine MB49-I, qui ont été prétraitées pendant 30 min avec le véhicule (DMSO) ou les composés DAB-1 et DAB-0 à différentes concentrations, et activé pendant 24 h avec les cytokines pro-inflammatoires IFN γ et TNF α [116].

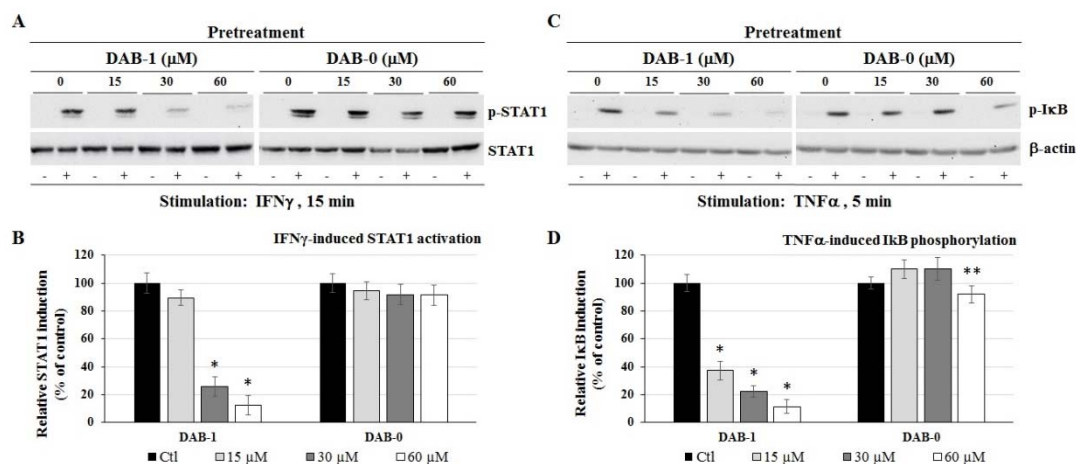


Figure 1.10 Images représentatives (A) et analyse graphique (B) de STAT1 phosphorylée (p-STAT1) dans des cellules MB49-I prétraitées pendant 30 min avec un véhicule (DMSO) ou les composés DAB-1 et DAB-0 à différentes concentrations, et activées pendant 15 minutes avec PBS ou IFN γ à 5 ng/mL. Images représentatives (C) et analyse graphique (D) d'IκB phosphorylé (pIκB) dans des cellules MB49-I prétraitées pendant 30 min avec le véhicule (DMSO) ou les composés DAB-1 et DAB-0 à différentes concentrations, et activées pendant 5 minutes avec du PBS ou du TNF α à 25 ng/mL [116].

Compte tenu l'absence des propriétés biologiques de la molécule DAB-0 par rapport à DAB-1, des études comparatives plus approfondies entre ces deux molécules ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire de thermodynamique du Dr. Heidar-Ali Tajmir-Riahi (UQTR, Département de chimie, biochimie et physique). Plus spécifiquement, ces études ont porté sur les interactions des DAB-0 et DAB-1

avec des protéines sériques de transport, soit la β -lactoglobuline et l'albumine [116], l'ADN [117], et les ARN de transfert (ARNt) [118]. Il a été découvert, d'une part, que les deux composés se lient aux protéines sériques via des contacts ioniques avec la β -lactoglobuline formant des conjugués plus stables qu'avec l'albumine. De plus, la molécule active DAB-1 forme des adduits protéiques plus forts que DAB-0. Il est donc logique de proposer que les molécules DABs peuvent être transportées par ces protéines dans le sang et atteindre les différents organes et tissus du corps, incluant les tumeurs, comme nous l'avons démontré chez les souris porteuses des tumeurs MB49-I [115]. D'autre part, en utilisant diverses méthodes spectroscopiques, combinées à une analyse thermodynamique, il a été montré que les deux DABs se lient à l'ADN et à l'ARNt par des contacts ioniques, et que le DAB-1 forme des complexes d'ADN et d'ARNt plus forts que DAB-0. Aucune altération de la conformation de l'ADN ou de l'ARNt n'a été observée lors de leur complexation avec les deux DABs. Cependant, les deux DABs utilisent des sites de liaison différents sur l'ADN et l'ARNt, ce qui révèle les différences structurelles entre DAB-0 et DAB-1. La découverte sur la capacité de DABs à s'associer efficacement avec les protéines, les molécules d'ADN double brin et l'ARNt pourra constituer les bases de futures études menant à décrire les mécanismes par lesquels DAB-1 exerce une activité anti-inflammatoire et anti-cancéreuse. Ces mécanismes peuvent inclure une inhibition des voies de signalisation en agissant sur la phosphorylation/activation de protéines de signalisation ou des facteurs de transcription, une inhibition de la transcription des gènes en agissant sur les interactions protéines/ADN ou une inhibition de la traduction des protéines en agissant sur les interactions ARNt/ARN messager ou ARNt/ARN ribosomal.

1.4 La problématique

Encore de nos jours, La problématique entourant le CVU demeure le manque important d'alternatives thérapeutiques pour le CVU et ce, aux différents stades de la maladie

[119]. Le traitement standard pour les CVU qui n'envahissent pas le muscle (stade 0/1/2a) est la résection transurétrale, suivie d'un traitement qui consiste en une instillation intravésicale du Bacillus Calmette-Guérin (BCG). Néanmoins, ce traitement :

- A une efficacité mitigée,
- Est associé à des effets toxiques, principalement cystites et infection chronique de la vessie.
- Est associé à un taux de récurrence très élevé (~ 70-80%),
- Est associé à la nécessité d'une surveillance clinique et paraclinique lourde, répétée et prolongée, ce qui en fait le cancer le plus coûteux à traiter par patient.

Pour les patients atteints d'une maladie invasive musculaire (stade 2b/3 et 4), l'approche standard nécessite une chirurgie radicale, essentiellement une ablation de la vessie suivie d'une reconstruction et d'une chimiothérapie à base de cisplatine et/ou d'une immunothérapie. Cependant, près de la moitié des patients qui subissent une chirurgie radicale développent une rechute dans les 5 ans et devraient maintenir un suivi à vie [120]. Les CVU à un stade avancé sont difficiles à guérir et la mortalité augmente de manière significative entre les stades 2b et 4. Par exemple, la survie des patients présentant une maladie métastatique ou une récurrence de la maladie après une chirurgie radicale (stade 4) n'est guère plus qu'une année [121, 122].

Récemment, l'immunothérapie avec des inhibiteurs des PCI (CTLA-4, PD-1 et PD-L1) a donné des résultats prometteurs pour de nombreux types de cancers associés à un mauvais pronostic. Cependant, selon les études actuelles, il existe encore un nombre élevé de patients ne répondant pas au BCG ou de patients atteints de CVU métastatique qui progressent ou qui ne répondent pas au traitement initial [123]. Ainsi, la chimiothérapie à base de cisplatine reste largement utilisée pour lutter contre le CVU résistant/récurrent, ainsi que le CVU à un stade avancé [124-126]. Malheureusement, les agents chimiothérapeutiques sont souvent non spécifiques et endommagent les cellules saines, provoquant des effets secondaires qui peuvent gravement

compromettre la qualité de vie des patients. De plus, une majorité de patients (30 à 60 %) ne répondent pas ou développent une résistance au traitement après une réponse initiale à la chimiothérapie [124-126]. Par conséquent, nos recherches actuelles sur les DABs se poursuivent et visent à améliorer les propriétés thérapeutiques des molécules que nous avons développées et appliquées dans une stratégie visant à cibler l'inflammation liée au cancer dans les modèles précliniques de CVU.

1.5 L'hypothèse

Il est possible d'améliorer l'activité anti-inflammatoire et anti-cancer de DAB-1 en modifiant le côté droit de sa structure, soit la fonction *tert*-butyloxycarbone. En effet, DAB-1 étant considéré comme la molécule « lead », des modifications ont été apportées au sein de celle-ci afin de l'optimiser à deux niveaux :

- 1) Une plus grande efficacité anti-inflammatoire et anti-tumorale
- 2) Une plus faible cytotoxicité

1.6 Objectifs

- 1) Modifier le côté droit de DAB-1 en évaluant la production de NO pour confirmer s'il est possible d'améliorer son activité anti-inflammatoire.
- 2) Sélectionner les meilleurs DABs en se basant sur leur activité anti-inflammatoire dans un modèle d'inflammation aiguë chez la souris.
- 3) Étudier le potentiel anti-cancer des DABs ayant les meilleures propriétés anti-inflammatoires dans un modèle préclinique du CVU.

CHAPITRE II

APPROCHES EXPÉRIMENTALES ET MÉTHODOLOGIES

2.1 Les DABs de 2^e et 3^e génération à l'étude

Les DABs de 2^e génération à l'étude comportent DAB-2-28, DAB-2-31B et DAB-2-31E, alors que les DABs de 3^e génération à l'étude sont DAB-3-27 et DAB-3-33 (Figure 2.1)

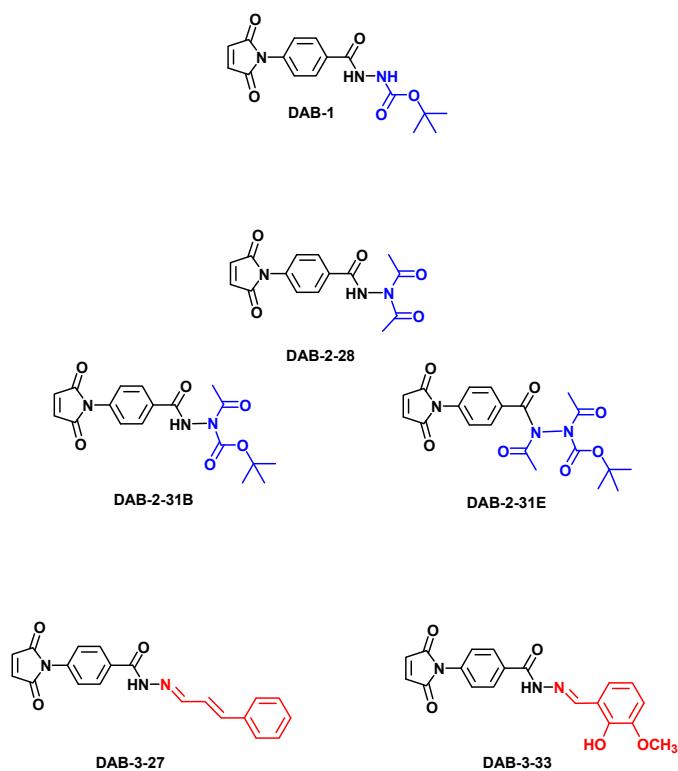
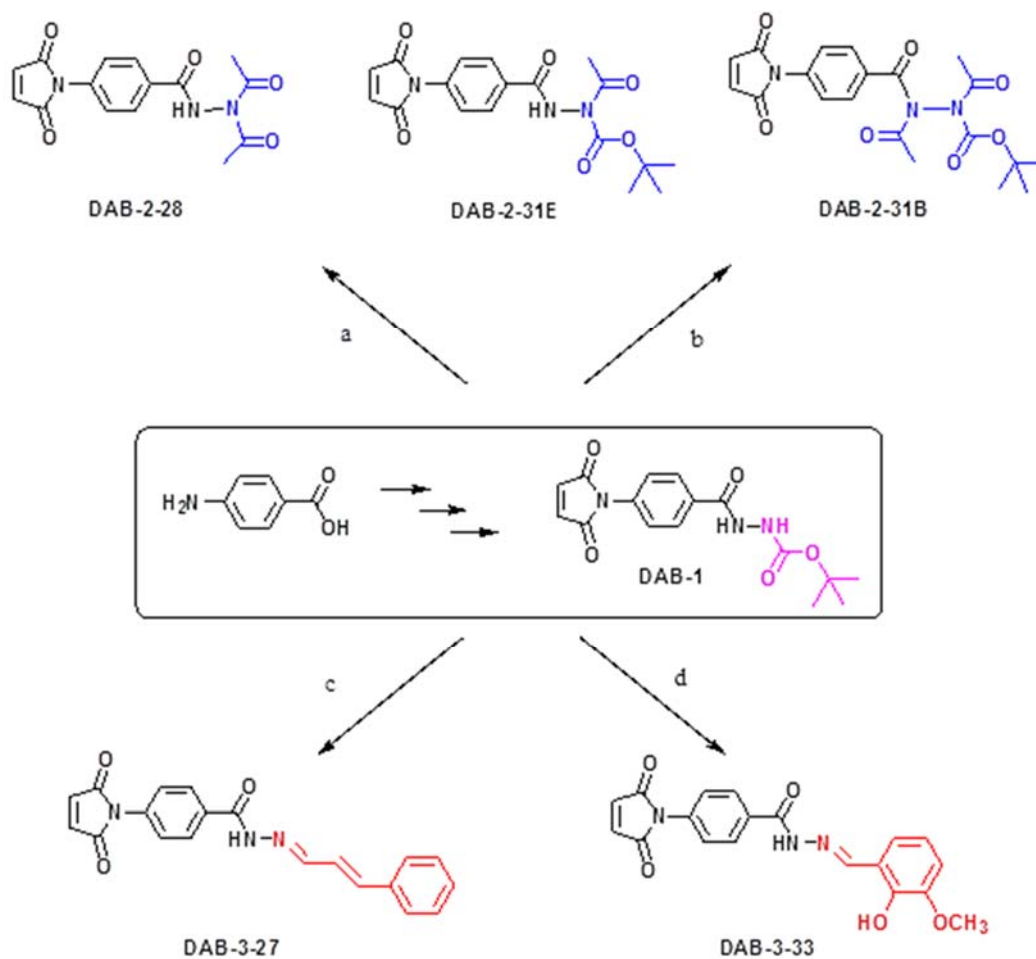


Figure 2.1 Structure des molécules DABs de 2^e et 3^e génération.

Les molécules DABs de 2^e et 3^e génération à l'étude ont été synthétisées dans le laboratoire du Dr Gervais Bérubé à partir de la molécule DAB-1, selon le schéma suivant :



- a. 1) TFA, CH₂Cl₂, 22 °C, 2 h; 2) Anhydride acétique, EtOAc, 40 °C, 0,5 h (DAB-2-28, 37%).
 b. Anhydride acétique, Et₃N, CH₂Cl₂, 22 °C, 0,5 h (DAB-2-31E, 20%) ou 60 °C, 2 h (DAB-2-31B, 57%).
 c. 1) TFA, CH₂Cl₂, 22 °C, 2 h; 2) Cinnamaldéhyde, NaHCO₃, CH₂Cl₂ (DAB-3-27, 76%).
 d. 1) TFA, CH₂Cl₂, 22 °C, 2 h; 2) 2-Hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde, NaHCO₃, CH₂Cl₂ (DAB-3-33, 89%).

Figure 2.2 Méthodes de synthèse des composés de 2^e et 3^e génération à partir de DAB-1 [106, 108].

2.2 Culture cellulaire

Les modèles cellulaires utilisés pour étudier à la fois l'activité anti-inflammatoire et anti-cancer des DABs sont les cellules MB49-I. Les MΦs péritonéaux ont été utilisés pour étudier *in vitro* le mécanisme d'action de l'activité anti-inflammatoire des DABs (voir sous-section 2.5). L'isolement et la mise en culture des MΦs péritonéaux de souris a été réalisé comme décrit précédemment [107]. La lignée cellulaire MB49-I provient de la lignée parentale MB49 qui a été établie à partir d'un CVU induit chimiquement dans les souris C57BL/6J [113]. La lignée MB49-I est un modèle cellulaire de CVU hautement invasif et tumorigène, qui a été développé par des passages successifs *in vivo* de tumeurs primaires MB49 [113]. Les cellules ont été maintenues dans du milieu RPMI supplémenté de 50 mg/mL de gentamicine, 10 % de sérum bovin fœtal inactivé à la chaleur (FBS) et contenant 1 mM de pyruvate de sodium, 10 mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-1-éthanesulfonique (HEPES). Les cellules ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée et contenant 5 % de CO₂. Les cellules sont passées lorsqu'elles atteignent 70 % de confluence soit au 2-3 jours.

2.3 Évaluation de la production de NO par le test de réactif de Griess

Les cellules MB49-I ont été cultivées et prétraitées pendant 30 min avec le véhicule (0.1% DMSO dans le PBS), DAB-1 ou les DABs de 2^e ou 3^e génération à différentes concentrations et ensuite, activées pour produire du NO pendant une période de 24 h en réponse aux cytokines INF γ (10 ng/mL) et TNF α (25 ng/mL). La production de NO a été mesurée en utilisant la méthode du réactif de Griess [107, 108]. Dans l'essai, le nitrite est réduit en oxyde d'azote à l'aide du réactif I de Griess. Ensuite, l'oxyde d'azote réagit avec le réactif II de Griess en formant un produit stable qui peut être détecté par son absorbance à 548 nm. En effet, le milieu des puits a été récolté et mélangé avec un volume égal d'une solution contenant de l'acide sulfanilique et d'une solution de N-(1-

naphthyl)ethylenediamine (Réactif de Griess; Life technologies). Ce réactif se couple à l'ion nitrite (NO_2) présent dans le surnageant, qui est obtenu lors de l'oxydation spontanée de NO, et produit une coloration rosée qui a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Biotek, synergy HT) à 548 nm.

2.4 Évaluation de la viabilité/prolifération cellulaire par le test de MTT

L'essai MTT permet de mesurer l'activité mitochondriale des cellules vivantes et est donc souvent utilisé comme test de viabilité. Il est basé sur la capacité des enzymes oxydoréductases cellulaires dépendantes du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) à réduire le colorant tétrazolium 3,[4,5-diméthylthiazol2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT) sous forme de cristaux de formazan insolubles, qui donne une coloration pourpre après solubilisation dans un solvant acidifié [107, 108]. Les cellules (50×10^3 /puit) ont été cultivées dans des plaques de 96 puits pendant 24 h afin de leur permettre d'adhérer adéquatement. Dans une première série d'expériences, les cellules MB49-I ont été prétraitées pendant 60 min avec le véhicule, DAB-1 ou les DABs de 2^e génération à différentes concentrations et ensuite incubées dans un milieu de culture RPMI 10 % FBS pendant 24 h. Dans une deuxième série d'expériences, les cellules MB49-I ont été prétraitées avec le véhicule, DAB-1 ou les DABs de 3^e pendant 30 min avant de les activer avec l'IFN γ à 10 ng/mL et du TNF α à 25 ng/mL. Pour évaluer la viabilité de chaque puits, 10 μL d'une solution à 5 mg/mL de sel de tétrazolium MTT ont été ajoutés à chaque puits. Le réactif a alors été réduit par les oxydoréductases des mitochondries en formazan. Après 3 h d'incubation à 37 °C, le milieu de culture a été aspiré et remplacé par 100 μL d'une solution à base d'isopropanol afin de solubiliser le précipité de formazan. La densité optique a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre (Biotek, synergy HT) à 580 nm.

2.5 Évaluation du niveau d'activation des voies de signalisation intracellulaire

Les études de signalisation intracellulaire ont été réalisées par immunodétection des protéines d'intérêt, notamment celles liées aux voies de signalisation pro-inflammatoire et pro-tumorale IL6/STAT3 et TNF α /NF κ B dans les cellules tumorales de CVU murin MB49-I [107, 108]. Pour étudier l'effet régulateur des différentes molécules DABs sur les cellules du CVU activées par des cytokines, les cellules MB49-I (50×10^3 cellules/puits dans des plaques à 24 puits) ont été prétraitées pendant 30 min avec le véhicule, DAB-1 ou les DABs de 2^e ou 3^e génération à différentes concentrations (10, 15, 20 ou 30 μ M). Par la suite, les cellules ont été stimulées avec le véhicule (PBS), le TNF α (25 ng/mL, 5 min) ou l'IL6 (100 ng/mL, 15 min) afin de quantifier les niveaux protéiques relatifs des protéines I κ B et STAT3 (voir **Figure 1.2**).

Une étude de signalisation a aussi été réalisée pour déterminer et comparer les effets des DABs sur l'expression d'iNOS et de COX-2 en utilisant les M Φ s péritonéaux de souris CD-1. Dans cette série d'expériences, les M Φ s péritonéaux (50×10^3 cellules/puits) ont été prétraitées avec le véhicule, DAB-1, DAB-2-28 ou DAB-3-33 à 15 μ M pendant 30 minutes, lavées et ensuite activées avec du PBS (témoin) ou une combinaison de 100 ng/mL de LPS avec 10 ng/mL d'IFN γ pendant 24 h.

À la fin des études de signalisation, les cellules ont été lysées et analysées par immunobuvardage de type western. En bref, les protéines des échantillons ont été séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) et transférées sur une membrane PVDF. Pour la détection de p-I κ B et p-STAT3, les membranes ont été incubées, dans un premier temps, avec des anticorps de souris polyclonaux contre p-I κ B (Cell Signal #9246, dilution 1:2000) des anticorps de lapin polyclonaux contre p-STAT3 (Cell Signal #9145, dilution 1:2000) pendant toute la nuit à 4 °C. Dans un deuxième temps, les membranes ont été réincubées avec

des anticorps de chèvre anti-souris et anti-lapin (dilution 1 :3000) conjugués à la HRP pendant 1 heure à température pièce. Dans les deux cas, les protéines ont été visualisées à l'aide d'un kit de détection par chimiluminescence (Thermo Fisher Scientific). Les mêmes membranes ont été décapées puis sondées avec des anticorps contre STAT3 et β -actine (tous deux à une dilution 1:1000). L'immunodétection des protéines iNOS et COX-2 a été réalisée comme décrit précédemment, à l'aide des anticorps de lapin polyclonaux anti-iNOS (Cell Signal #13120, dilution 1:400) et anti-COX-2 (Cell Signal #12282, dilution 1:1000), tous les deux couplés à la HRP.

2.6 Évaluation de l'activité inflammatoire à l'aide d'un modèle d'inflammation aiguë chez la souris

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée *in vivo*, par la méthode de l'œdème de la patte de souris induite par la carraghénane [127, 128]. Un total de 20 souris femelles CD-1 ont reçu une injection de 50 μ L de carraghénane à 1 % v/v au niveau de la voûte sous-plantaire des pattes gauches arrières des souris. Les souris CD-1 ont ensuite été réparties de façon aléatoire en 4 groupes (n = 5) d'animaux traités par des injections par voie intrapéritonéale (IP), de 100 μ L de véhicule (0.1% DMSO dans le PBS; groupe 1), de DAB-1 (groupe 2), de DAB-2-28 (groupe 3) et de DAB-3-33 (groupe 4). Le véhicule et les molécules DABs, à 150 μ M, ont été administrées 24 h et 1 h avant et 2 h, 4 h, 24 h, 36 h, 48 h et 60 h après l'injection sous-plantaire de carraghénane. Pour vérifier la présence d'un œdème, l'épaisseur de la patte a été mesurée à l'aide d'un micromètre 1 h avant et après l'injection de carraghénane aux temps t = 2 h, t = 4 h, t = 24 h, t = 48 h et t = 72 h. L'augmentation de l'épaisseur de la patte et le pourcentage d'inhibition ont été calculés et comparés avec le groupe témoin.

2.7 Modèle de tumeur de cancer murin de la vessie

Le modèle ectopique du cancer murin de la vessie avec la lignée MB49-I a déjà été développé dans nos laboratoires [107, 108]. Ce modèle permet d'étudier l'évolution des tumeurs et de tester de nouveaux agents thérapeutiques contre le cancer. La technique utilisée pour établir ce modèle implique l'injection des cellules du cancer de la vessie murin MB49-I (5×10^4 dans 100 μ L de PBS) par voie sous-cutanée au niveau du flanc des souris mâles C57BL/6J. Les traitements avec nos molécules ont débuté 7 jours après que les tumeurs aient été implantées. Trois groupes de 8 souris portant des tumeurs MB49-I ont reçu chacun, par voie IP, une injection d'une solution de véhicule (DMSO 0.1 % dans le PBS), de DAB-1 ou de DAB-2-28 à une concentration de 150 μ M, comme décrit [107, 108]. Les injections ont été répétées tous les 2 jours. Le volume des tumeurs, mesuré à l'aide d'un micromètre, et les mesures du poids des souris ont été effectués tous les 2 jours. Les souris ont été sacrifiées 21 jours après l'inoculation des cellules MB49-I.

2.8 Analyse statistique

Les données obtenues à partir d'expériences *in vitro* ou *in vivo* sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism, version 3.03 (GraphPad). Les moyennes des données d'expériences *in vitro* proviennent d'au moins trois expériences indépendantes réalisées en triple et la différence entre les groupes a été analysée par un test ANOVA à une voie suivie d'un post-test de Tukey. Pour les études *in vivo* réalisées avec 8 souris par groupe, la différence entre les groupes a été évaluée par un test ANOVA bidirectionnelle suivie d'un test de comparaison multiple de Benferroni. Les différences statistiques ont été considérées comme significatives à une valeur de $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Étude sur la relation structure–activité des molécules DABs de 2^e génération

Afin d'atteindre notre premier objectif, soit celui de produire des dérivés ayant une cytotoxicité réduite tout en ayant une activité anti-inflammatoire et anti-cancer supérieure à DAB-1, nos laboratoires ont généré une série de molécules de 2^e génération en modifiant la fonction *tert*-butyloxycarbone du côté droit de DAB-1 (**Figure 2.2**).

Pour évaluer les activités cytotoxique et anti-inflammatoire de ces nouvelles molécules, les cellules MB49-I ont d'abord été prétraitées pendant 60 min avec le véhicule ou avec DAB-1, DAB-2-28, DAB-2-31B ou DAB-2-31E à des doses de 15, 30, 60 et 90 μM . Les cellules ont été lavées et incubées pendant 24 h et préparées pour les essais de MTT (**Figure 3.1A**). Les résultats indiquent que les molécules DAB-1 et les DABs de 2^e génération ont toutes un effet négatif sur la viabilité des cellules MB49-I dont les taux d'inhibition varient en moyenne de 5 % \pm 1 % à 15 μM , de 11 % \pm 2 % à 30 μM , de 23 % \pm 3 % à 40 μM et de 42 % \pm 3 % à 50 μM . Par contre, les analyses statistiques indiquent que, par rapport à DAB-1, DAB-2-28 exerce un effet moins négatif sur la viabilité cellulaire que DAB-1 : 3 % vs 8 % à 15 μM , 6 % vs 11 % à 30 μM , 17 % vs 26 % à 40 μM et 36 % vs 44 % à 50 μM (**Figure 3.1A**). Les analyses graphiques et statistiques démontrent aussi que les molécules DAB-2-31B et DAB-2-31E ont un effet similaire à celui de DAB-1 pour inhiber la viabilité cellulaire.

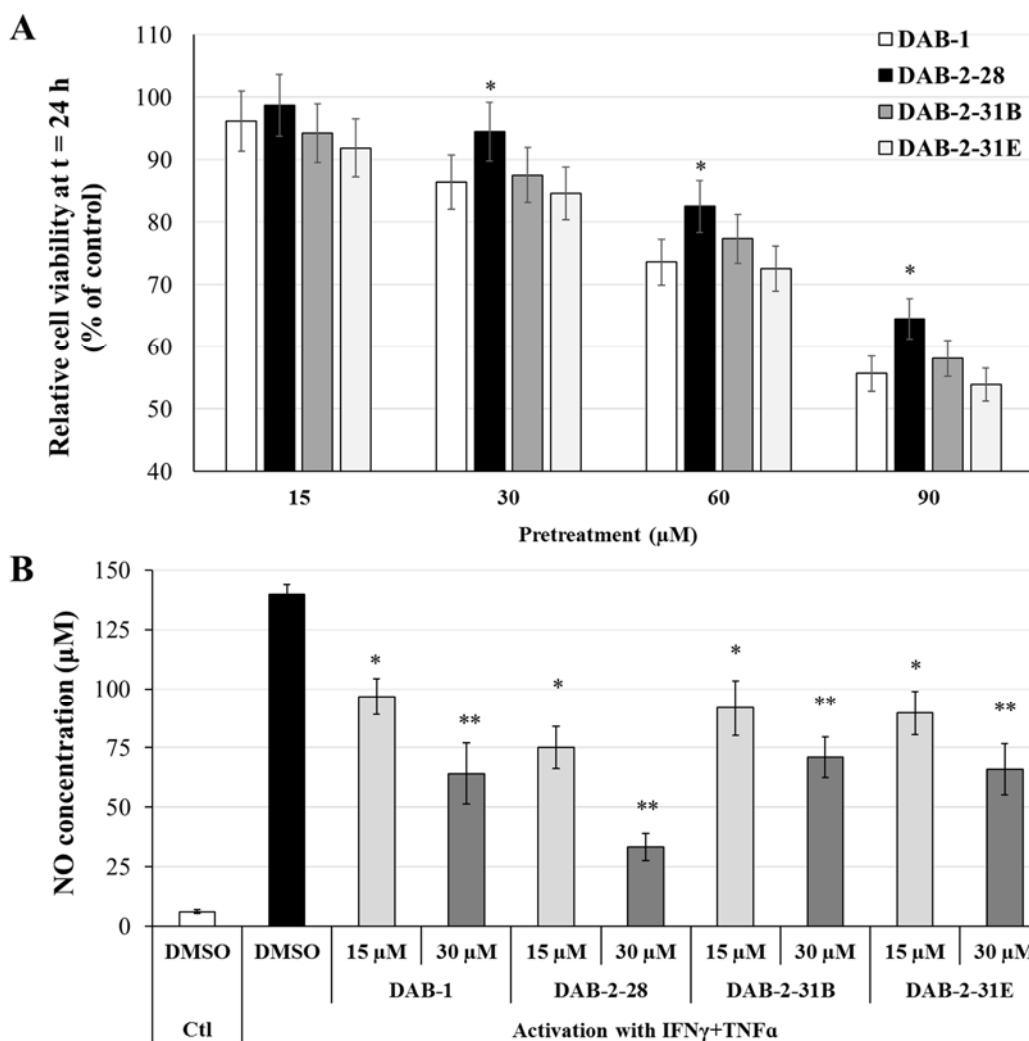


Figure 3.1 Évaluation de l'activité cytotoxique et anti-inflammatoire de DAB-1 et les DABs de 2^e génération dans les cellules MB49-I. **(A)** Représentation graphique de la viabilité cellulaire relative 24 h après un prétraitement avec du DMSO ou des DABs aux doses indiquées. * $p < 0.05$ par rapport à DAB-1 à chaque dose indiquée. **(B)** Représentation graphique de la production de NO des cellules prétraitées avec du DMSO ou les DABs à 15 ou 30 μM pendant 60 minutes et ensuite activées avec du PBS ou de l' $\text{IFN}\gamma$ à 10 ng/mL et $\text{TNF}\alpha$ à 25 ng/mL . Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ par rapport aux cellules prétraitées avec le DMSO et activées avec l' $\text{IFN}\gamma$ et le $\text{TNF}\alpha$. Analyse statistique : test ANOVA à une voie suivie d'un post-test de Tukey.

Ensuite, afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire, nous avons comparé l'efficacité des différents DABs de 2^e génération à inhiber la production de NO par les cellules

MB49-I. Les cellules ont d'abord été prétraitées pendant 60 min avec le véhicule ou avec DAB-1, DAB-2-28, DAB-2-31B ou DAB-2-31E à des doses de 15 ou 30 μM (**Figure 3.1B**). Par la suite, les cellules ont été activées avec de l'IFN γ à 10 ng/mL et du TNF α à 25 ng/mL. Les résultats rapportés à la **Figure 3.1B** indiquent, d'une part, que les molécules DAB-2-31B ou DAB-2-31E ont une efficacité similaire à celle de DAB-1 pour inhiber la production en NO, même à une dose de 30 μM . D'autre part, les analyses statistiques indiquent que la molécule DAB-2-28 inhibe significativement la production de NO de manière plus efficace que DAB-1 à une dose de 30 μM .

L'évaluation de l'activité anti-tumorale de DAB-1 par rapport aux DABs de 2^e génération a été effectuée en mesurant la capacité de ces différentes molécules à inhiber les voies de signalisation IL6/STAT3 (**Figure 3.2**) et TNF α /NF κ B (**Figure 3.3**) dans les cellules murines de CVU MB49-I. Pour éliminer l'effet de toxicité, seulement les doses de 15 et 30 μM ont été utilisées.

Les résultats rapportés à la **Figure 3.2** montrent, d'une part, que les molécules DAB-2-28, DAB-2-31B et DAB-2-31E ont une efficacité similaire à celle de DAB-1 à inhiber l'augmentation de la phosphorylation de la protéine STAT-3 (p-STAT3) induit par l'IL6. D'autre part, les analyses statistiques indiquent que la molécule DAB-2-28 est plus efficace que DAB-1, DAB-2-31B et DAB-2-31F à inhiber la signalisation induite par l'IL6 à une dose de 30 μM (**Figure 3.2B**). Enfin, ces résultats démontrent que DAB-2-31F est la molécule DAB la moins efficace à diminuer le niveau de phosphorylation de STAT3 à des doses de 15 et 30 μM (**Figure 3.2B**).

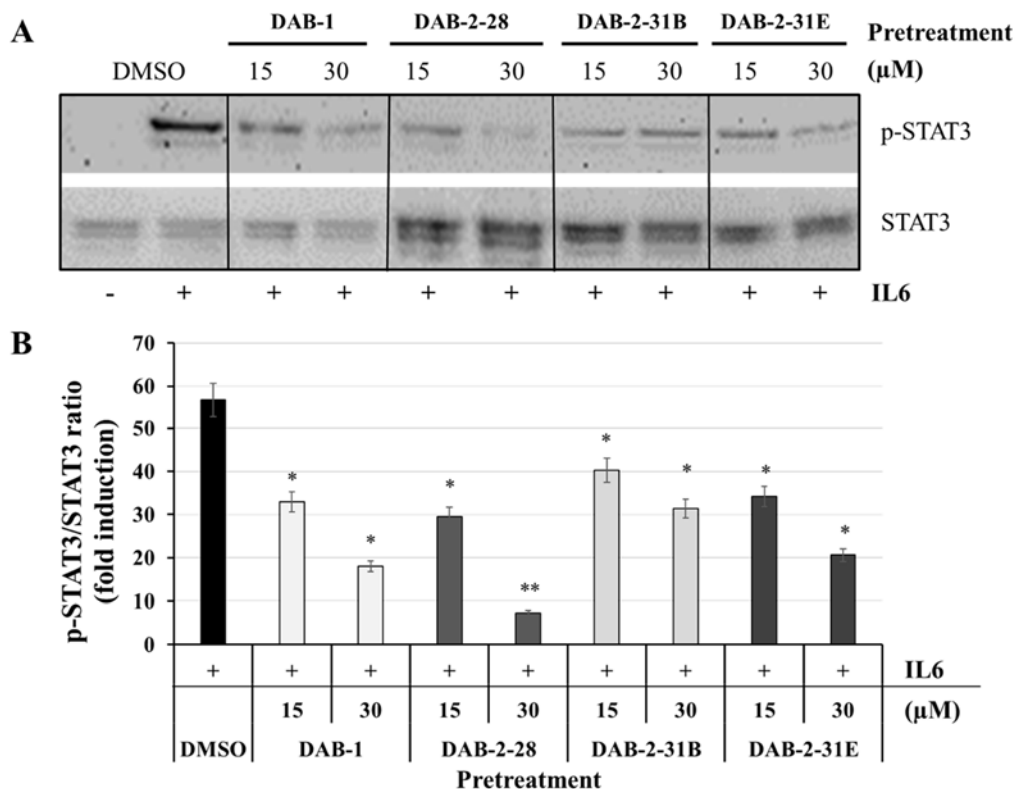


Figure 3.2 Évaluation de la capacité de DAB-1 et les DABs de 2^e génération à inhiber la voie de signalisation IL6/STAT3 dans les cellules MB49-I. Images représentatives (**A**) et analyse graphique (**B**) de STAT3 phosphorylée (p-STAT3) dans des cellules MB49-I prétraitées pendant 30 min avec du DMSO ou les DABs à 15 et 30 μM, et activées pendant 15 minutes avec du PBS ou du IL6 à 25 ng/mL. * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$ par rapport aux cellules prétraitées avec le DMSO et activées avec l'IL6. Analyse statistique : test ANOVA à une voie suivie d'un post-test de Tukey.

Les analyses graphique et statistique du niveau de phosphorylation de la protéine IκB (p-IκB) dans les cellules MB49-I prétraitées avec le véhicule ou les composés DABs démontrent, d'une part, que DAB-2-28 est plus efficace que DAB-1, DAB-2-31B et DAB-2-31E à inhiber la signalisation induite par TNFα, et ce, même à des doses de 15 et 30 μM (**Figure 3.3B**). D'autre part, ces résultats démontrent que DAB-2-31B et DAB-2-31E sont moins efficaces que DAB-1 et DAB-2-28 à diminuer le niveau de phosphorylation de la protéine IκB induit par TNFα à une dose de 15 μM (**Figure 3.3B**).

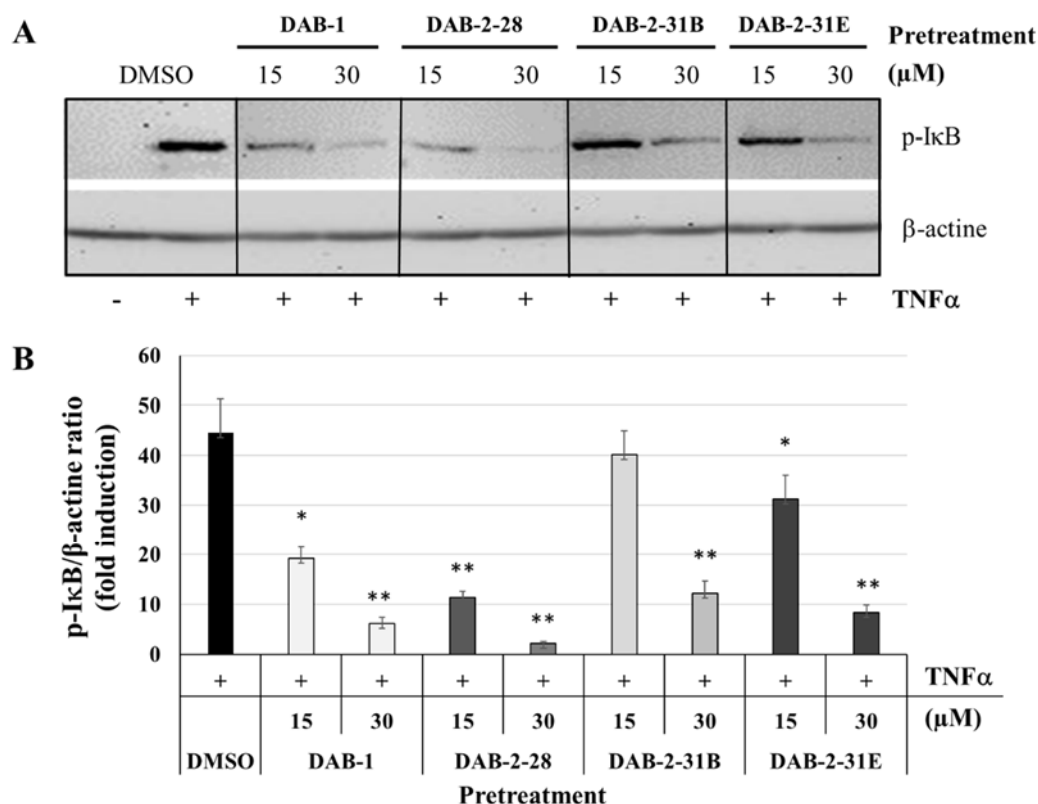


Figure 3.3 Évaluation de la capacité de DAB-1 et les DABs de 2^e génération à inhiber la voie de signalisation TNF α /NF κ B dans les cellules MB49-I. Images représentatives (A) et analyse graphique (B) de I κ B phosphorylée (p-I κ B) dans des cellules MB49-I prétraitées pendant 30 min avec du DMSO ou les DABs à 15 et 30 μM , et activées pendant 5 minutes avec du PBS ou du TNF α à 25 ng/mL. * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$ par rapport aux cellules prétraitées avec le DMSO et activées avec le TNF α . Analyse statistique : test ANOVA à une voie suivie d'un post-test de Tukey.

En conclusion, ces études sur la relation structure–activité de DAB-1 et les DABs de 2^e génération ont révélé que DAB-2-28 a une activité cytotoxique *in vitro* moindre que la molécule DAB-1 et, qu'à faibles doses, DAB-2-28 est plus efficace que DAB-1 pour inhiber autant la production de NO induite par la combinaison IFN γ /TNF α que les voies de signalisation pro-inflammatoires et pro-tumorales IL6/STAT3 et TNF α /NF κ B dans les cellules de CVU MB49-I.

3.2 Étude sur la relation structure–activité des molécules DABs de 3^e génération

Afin de poursuivre la caractérisation de nouveaux dérivés ayant une activité cytotoxique réduite tout en ayant une activité anti-inflammatoire et anti-cancer supérieure à DAB-1 et DAB-2-28, nos laboratoires ont généré une série de molécules de 3^e génération en modifiant encore la fonction tert-butyloxycarbonyle du côté droit de DAB-1 (**Figure 2.2**). Dans le but de mieux statuer à la fois sur les activités anti-cancer et anti-inflammatoire des nouvelles molécules DABs, nous avons comparé la capacité de deux molécules de 3^e génération, DAB-3-27 et DAB-3-33, à réguler l'activation des voies de signalisation IL6/STAT3 et TNF α /NF κ B et la production de NO par les cellules MB49-I.

Dans une première série d'expériences, nous avons comparé la capacité de DAB-1, DAB-3-27 et DAB-3-33 à réguler l'activation des voies de signalisation IL6/STAT3 (**Figure 3.4**) et TNF α /NF κ B (**Figure 3.5**). Tel que rapporté à la **Figure 3.4**, la molécule DAB-3-27 est moins efficace que les molécules DAB-1 et DAB-3-33 à inhiber le niveau de phosphorylation de la protéine STAT3 (p-STAT3) induit par l'IL6. D'autre part, les analyses statistiques indiquent que la molécule DAB-3-33 est plus efficace que DAB-1 à inhiber la signalisation induite par l'IL6 et ce, à des doses de 20 et 30 μ M (**Figure 3.4B**). De façon similaire à la voie de signalisation IL6/STAT3, les résultats rapportés à la **Figure 3.5** démontrent, d'une part, que DAB-3-27 est moins efficace que DAB-1 et DAB-3-33 à inhiber la signalisation induite par TNF α (**Figure 3.5B**). Par contre, l'analyse statistique démontre que DAB-3-33 est aussi efficace que DAB-1 à inhiber le niveau de phosphorylation de la protéine I κ B (p-I κ B) dans les cellules MB49-I à une dose de 30 μ M (**Figure 3.5B**). De ces premières études, il est possible de conclure que l'activité anti-cancer de DAB-3-33 serait supérieure à celle de DAB-1.

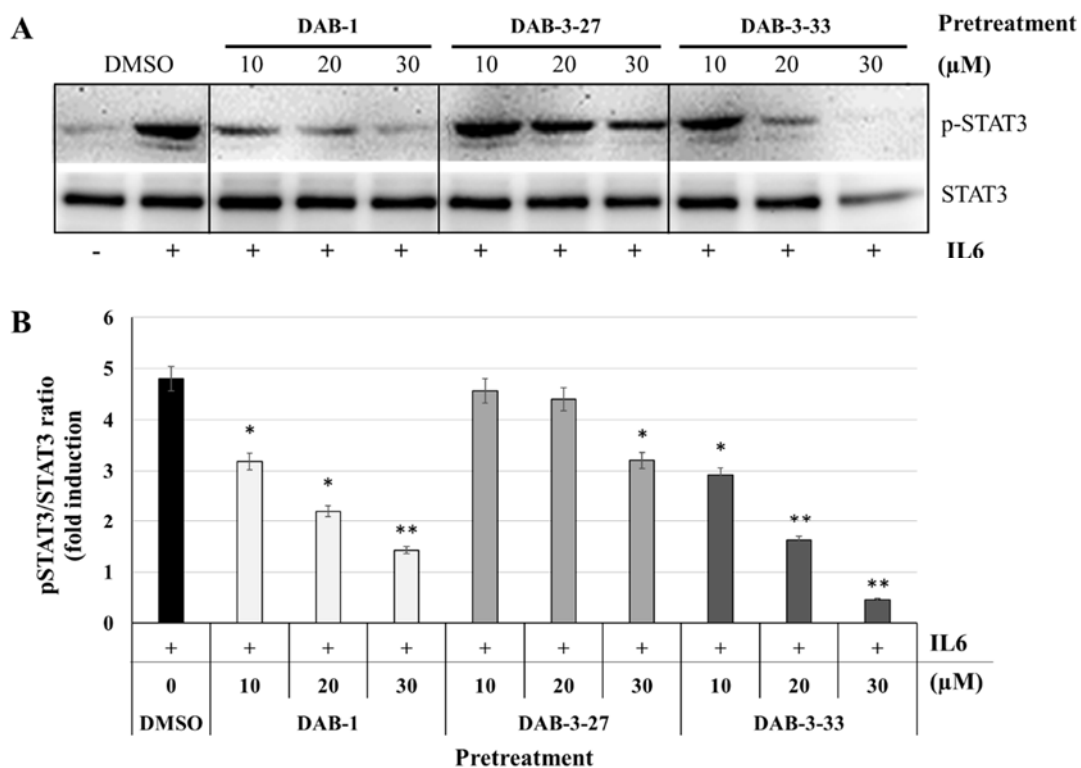


Figure 3.4 Évaluation de la capacité de DAB-1 et les DABs de 3^e génération à inhiber la voie de signalisation IL6/STAT3 dans les cellules MB49-I. Images représentatives (A) et analyse graphique (B) de STAT3 phosphorylée (p-STAT3) dans des cellules MB49-I prétraitées pendant 30 min avec du DMSO ou les DABs à 15 et 30 μM, et activées pendant 15 minutes avec du PBS ou du IL6 à 25 ng/mL. * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$ par rapport aux cellules prétraitées avec le DMSO et activées avec l'IL6. Analyse statistique : test ANOVA à une voie suivie d'un post-test de Tukey.

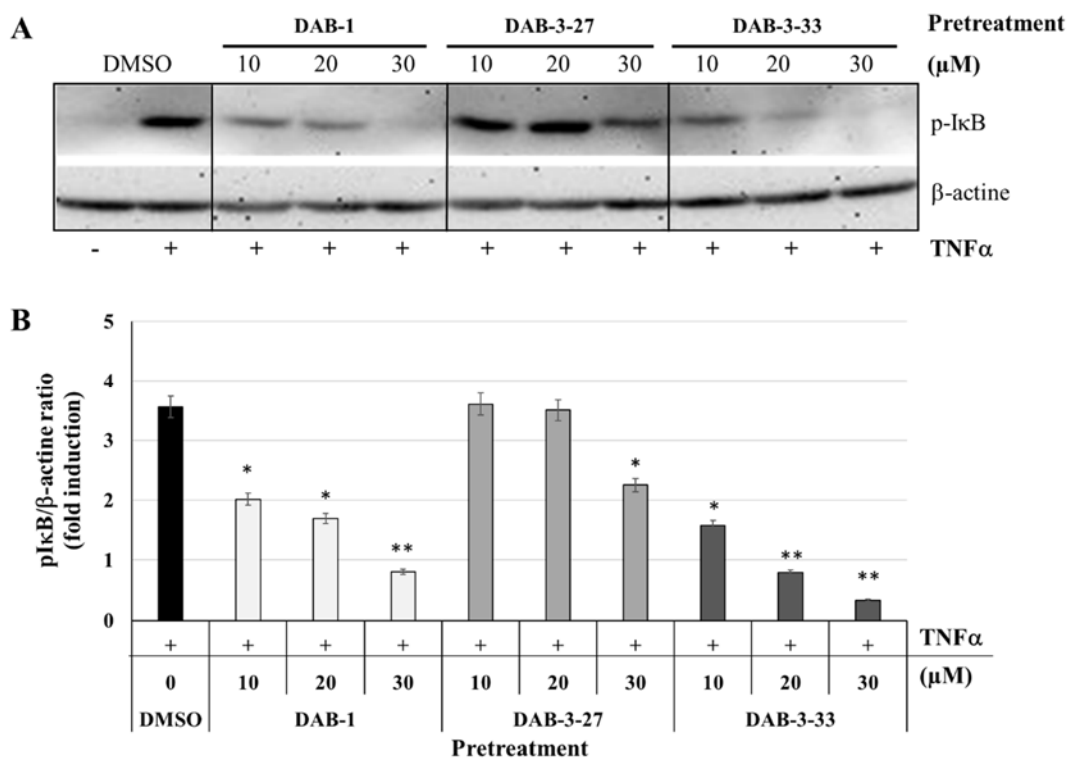


Figure 3.5 Évaluation de la capacité de DAB-1 et les DABs de 3^e génération à inhiber la voie de signalisation TNFα/NFκB dans les cellules MB49-I. Images représentatives (A) et analyse graphique (B) de IκB phosphorylée (p-IκB) dans des cellules MB49-I prétraitées pendant 30 min avec du DMSO ou les DABs à 15 et 30 μM, et activées pendant 5 minutes avec du PBS ou du TNFα à 25 ng/mL. * p < 0.05 et ** p < 0.01 par rapport aux cellules prétraitées avec le DMSO et activées avec le TNFα. Analyse statistique : test ANOVA à une voie suivie d'un post-test de Tukey.

Afin de déterminer si les molécules de 3^e génération ont une activité anti-inflammatoire supérieure tout en étant moins toxiques, nous avons utilisé une dose à 30 μM et une autre à 60 μM de DAB-1, DAB-2-28, DAB-3-27 et DAB-3-33 pour prétraiter les cellules pendant 30 minutes avant de les activer avec l'IFNγ à 10 ng/mL et du TNFα à 25 ng/mL. Les cellules et leur surnageant correspondant ont été préparés pour évaluer à la fois l'effet sur la viabilité des cellules avec le test MTT et la production de NO par le test de Griess. Afin de normaliser les valeurs de concentration en NO et de prolifération obtenues à chaque expérience, et tenir compte de cette variabilité, nous avons considéré la production en NO ou la prolifération des cellules témoins activées

comme le point de référence en lui attribuant la valeur de 100 %. Ainsi, les taux de production de NO et de prolifération/viabilité cellulaire ont été présentés en pourcentage par rapport au témoin.

Les résultats avec le prétraitement à une dose de 30 μ M indiquent que les molécules ont toutes un effet négatif similaire sur le taux de production de NO avec peu ou pas d'effet sur la viabilité (**Figure 3.6A**), l'inhibition normalisée en fonction de la viabilité étant en moyenne de 23 % \pm 3 % (**Figure 3.6B**). D'autre part, tel que rapporté à la **Figure 3.6**, les résultats avec le prétraitement à une dose de 60 μ M indiquent que les quatre molécules DABs semblent avoir toutes un effet négatif similaire sur le taux de production de NO, le taux de production de NO étant en moyenne de 34 % \pm 2 % (**Figure 3.6C**). Cependant, l'analyse statistique démontre que comparativement à DAB-2-28, le prétraitement avec les molécules DAB-1, DAB-2-27 et DAB-3-33 a un impact négatif important sur la viabilité cellulaire, le taux moyen de viabilité par rapport au témoin pour ces traitements étant de 54 % \pm 3 % alors que le le taux de viabilité par rapport au témoin est de 96 % dans les cellules prétraitées avec DAB-2-28 (**Figure 3.6C**). Ainsi, les taux d'inhibition de la production de NO normalisée en fonction de la viabilité sont respectivement de 26 %, 65 %, 34 % et 47 % pour les celluls prétraitées avec DAB-1, DAB-2-28, DAB-2-27 et DAB-3-33 (**Figure 3.6D**). Ces résultats suggèrent que la régulation à la baisse des DABs de 3^e génération sur la production de NO est causée par un effet sur la viabilité de cellules MB49-I, DAB-2-28 et DAB-3-33 ayant un effet négatif moins important sur la viabilité cellulaire que DAB-1 et DAB-3-27.

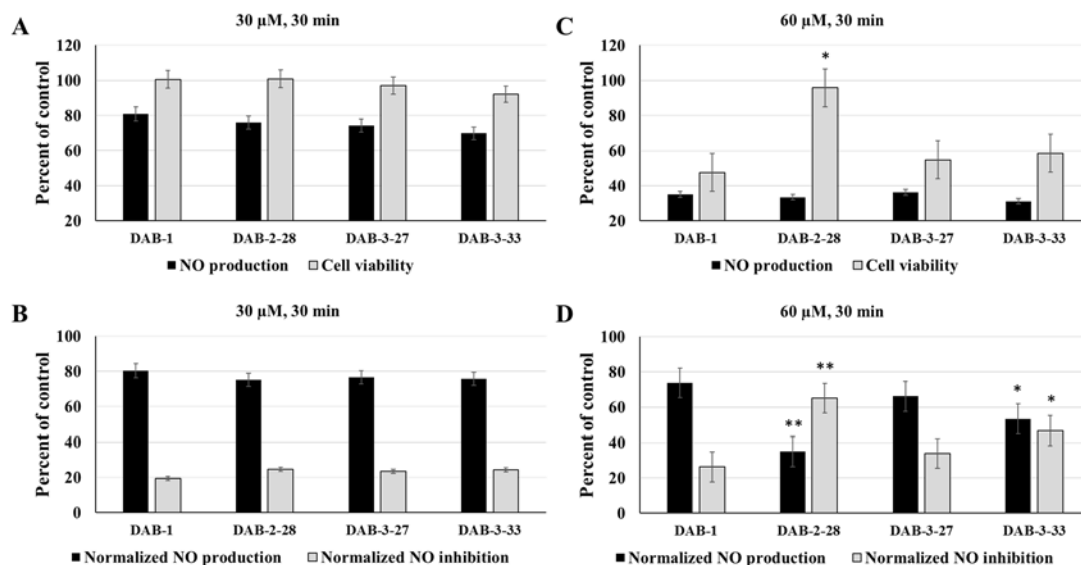


Figure 3.6. Effets des DABs sur la production d'oxyde nitrique (NO) en fonction de la viabilité cellulaire. Les cellules MB49-I ont été prétraitées avec du DMSO (contrôle) et différents DABs à 30 et 60 µM pendant 30 min, puis lavées et activées avec du PBS ou une combinaison de l'IFN γ à 10 ng/mL et TNF α à 25 ng/mL pendant 24 heures. Les tests MMT et les mesures de NO ont été réalisés après 24 h d'incubation. Pour la viabilité et la production de NO, les données sont présentées en pourcentage du contrôle (A et C) alors que la production de NO et le taux d'inhibition de NO ont été normalisés par rapport à un taux de viabilité de 100 % (B et D). * $p < 0,01$ par rapport à DAB-1. Analyse statistique : test ANOVA à une voie suivie d'un post-test de Tukey.

3.3 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire des DABs dans un modèle d'inflammation aiguë chez la souris

Pour mieux évaluer l'activité anti-inflammatoire de DAB-1, DAB-2-28 et DAB-3-33, le modèle *in vivo* d'inflammation aiguë induite par une injection sous-cutanée de carraghénane chez la souris CD-1 a été utilisé. Ce modèle d'inflammation est très largement utilisé dans la recherche sur les AINS. Cette injection permet d'induire un œdème, une inflammation et une hyperalgésie à son point d'injection propice à tester les effets anti-inflammatoires et analgésiques des AINS [127, 128]. Le processus de formation d'un œdème plantaire induit avec la carraghénane est biphasique, la première

phase entre 2 h et 48 h implique la système iNOS/NO et la deuxième phase, entre 48 h et 72 h, le système COX-2/prostaglandines [127, 128].

Les molécules DABs ont été injectées par voie IP, 24 h et 1 h avant et 2 h, 4 h, 24 h, 36 h, 48 h et 60 h après l'injection de carraghénane au niveau de la voûte sous-plantaire des pattes gauches des souris. Les mesures de l'épaisseur de la patte (œdème) ont été effectuées avant ($t = 0$ h) et après ($t = 2$ h, 4 h, 24 h, 48 h et 72 h) l'injection de carraghénane. Cette série d'expérience indique que les molécules DAB-2-28 et DAB-3-33 ont des effets anti-inflammatoires similaires à ceux du DAB-1 pendant la première phase du processus inflammatoire induit par la carraghénane (c'est-à-dire à la phase iNOS/NO), les deux étant efficaces à $t = 2$ h, $t = 4$ h et $t = 24$ h (**Figure 3.7A**). De plus, les trois molécules sont aussi efficaces à réduire l'œdème sous-plantaire à la deuxième phase du processus inflammatoire induit par la carraghénane (c'est-à-dire à la phase COX-2/prostaglandines entre 48 h et 72 h). Cependant, l'analyse statistique des données sur le taux d'inhibition de l'œdème de la patte a indiqué que par rapport au DAB-1 et au DAB-2-28, le DAB-3-33 présente un effet anti-inflammatoire moins robuste à $t = 24$ h, c'est-à-dire à la fin de la phase l'iNOS/NO du processus inflammatoire induit par la carraghénane (**Figure 3.7B**). Comme le montre la **figure 3.7C**, les injections répétées de molécules DAB ne semble pas avoir d'effet sur la santé globale des souris car la moyenne du gain de poids corporel n'était pas significativement différente entre les groupes de souris tout au long des traitements avec les DABs.

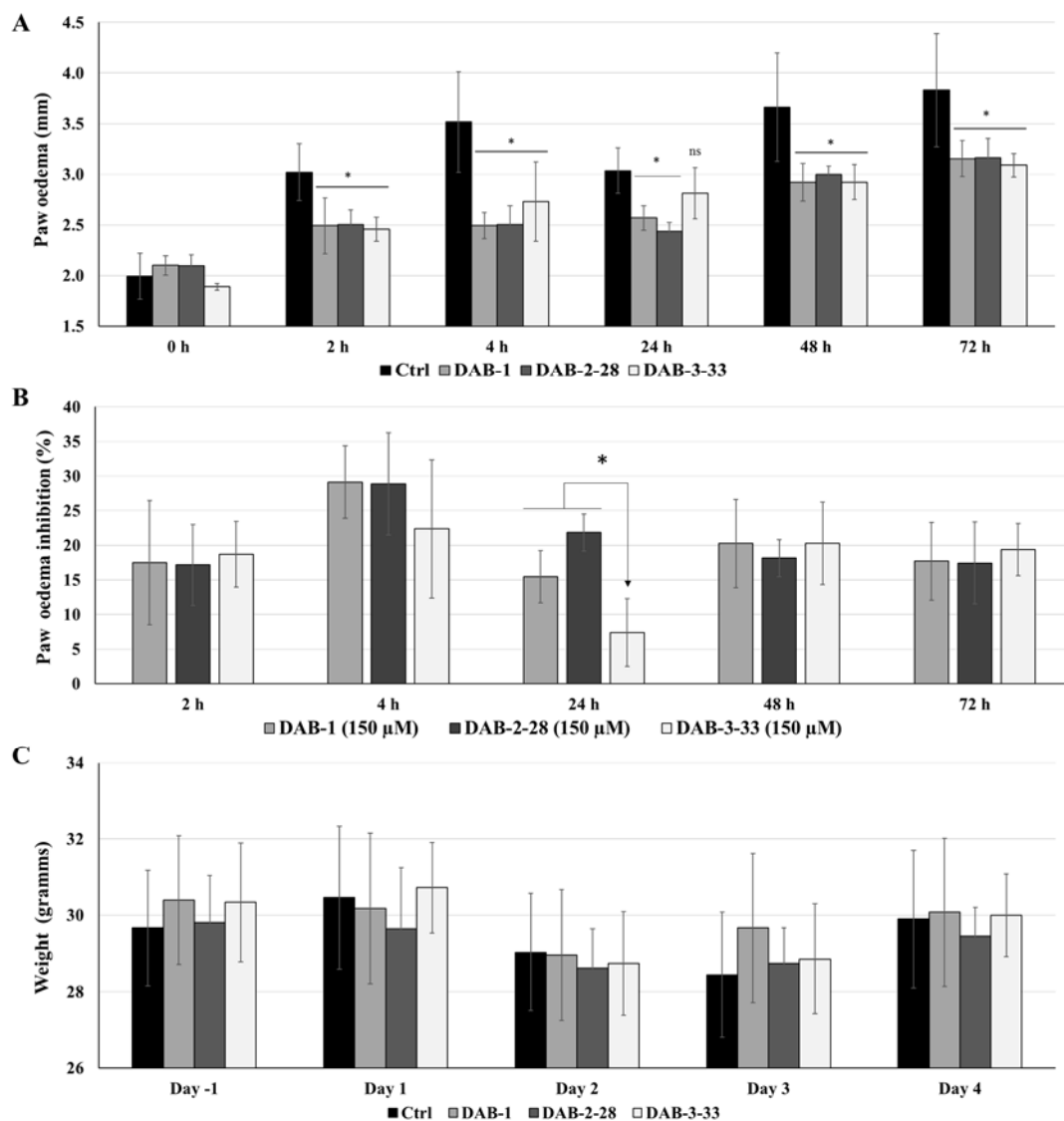


Figure 3.7 Effet anti-inflammatoire de DAB-1, DAB-2-28 et DAB-3-33 dans un modèle d'inflammation aiguë chez la souris. **A)** Des souris CD-1 mâles (5 souris/groupe) ont reçu une injection intrapéritonéale (i.p.) de DAB-1, DAB-2-28 et DAB-3-33 avant (24 h et 1 h) et après (2 h, 4 h, 24 h, 36 h, 48 h et 60 h) l'injection de carraghénane. La carraghénane a été injectée au jour 1 dans les pattes gauche des souris. Les mesures de l'épaisseur des pattes (œdème) ont été enregistrées à $t = 0$ h et après l'injection sous-plantaire de carraghénane, à $t = 2$ h, $t = 4$ h, $t = 24$ h, $t = 48$ h et $t = 72$ h. * $p < 0,05$ par rapport au contrôle. **B)** L'effet de DABs sur l'inflammation induite par la carraghénane a été exprimé en pourcentage d'inhibition sur l'induction de l'œdème intraplantaire. * $p < 0,05$ par rapport à DAB-1 et DAB-2-28. **C)** Le poids de souris a été mesuré au jour -1, jour 1, jour 2, jour 3 et jour 4 de l'expérimentation. Analyse statistique : test ANOVA bidirectionnelle suivie d'un test de comparaison multiple de Benferroni.

3.4 Effets des DABs sur l'expression des enzymes iNOS et COX-2 par des macrophages péritonéaux isolés de souris CD-1

Les études dans le modèle d'inflammation aiguë chez la souris ayant démontré que les effets anti-inflammatoires de DABs sont biphasiques et agissent comme inhibiteurs des systèmes iNOS/NO et COX-2/prostaglandines, des études *in vitro* ont été réalisées pour déterminer et comparer les effets des DABs sur l'expression d'iNOS et de COX-2. Pour ce faire, les MΦs péritonéaux de souris CD-1 ont été isolés et prétraités pendant 30 min avec le véhicule, DAB-1, DAB-2-28 ou DAB-3-33 à une dose de 30 µM et les niveaux d'expression des enzymes iNOS et COX-2 ont été évalués par western blot après 24 h d'incubation dans le milieu de culture contenant 100 ng/mL de LPS et 10 ng/mL d'IFNγ pendant 24 h (**Figure 3.8**).

L'analyse par densitométrie révèle que dans les MΦs péritonéaux prétraités avec le véhicule, une activation par la combinaison LPS + IFNγ induit une forte augmentation de l'expression des enzymes iNOS et COX-2 et une diminution significative de leur expression après prétraitement avec les molécules DABs (**Figure 3.8A**). Parmi les trois molécules DABs à l'étude, DAB-2-28 est la seule à inhiber complètement l'expression des enzymes iNOS et COX-2. De plus, l'analyse statistique démontre que le prétraitement des MΦs péritonéaux avec les molécules DAB-1 et DAB-3-33 a un impact négatif similaire sur l'expression de l'enzyme iNOS (88 % versus 89 %) alors que DAB-1 est plus efficace que DAB-3-33 pour inhiber l'expression de l'enzyme COX-2 (69 % versus 45 %) (**Figure 3.8B**).

En conclusion, l'ensemble des études *in vitro* sur la relation structure–fonction de DABs ont révélé que, parmi les différentes molécules DABs à l'étude, DAB-2-28 a une moindre activité cytotoxique *in vitro* avec une plus grande efficacité que DAB-1 pour inhiber : 1) la production de NO induite par la combinaison IFNγ/TNFα; 2) les voies de signalisation IL6/STAT3 et TNFα/NFκB; et 3) l'expression des enzymes

iNOS et COX-2 induite par la combinaison IFN γ /LPS. Subséquemment, des études précliniques ont été entreprises pour étudier l'efficacité d'une thérapie moléculaire de DAB-2-28 sur la croissance tumorale des cellules MB49-I implantées par voie sous-cutanée (ectopiques) dans les souris C57Bl/6.

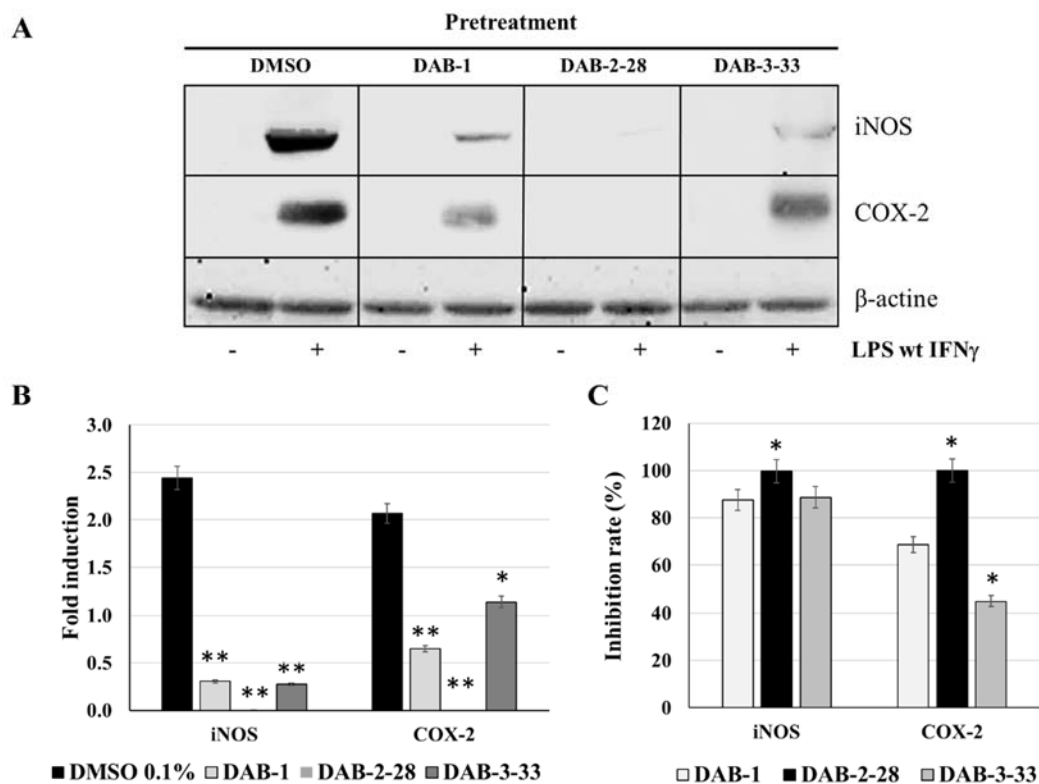


Figure 3.8 Images représentatives (A) et analyse graphique (B et C) montrant l'influence de DAB-1, DAB-2-28 et DAB-3-33 sur l'expression d'iNOS et de COX-2 par des macrophages péritonéaux isolés de souris CD-1. Les cellules prétraitées avec des DABs à une dose de 30 μ M pendant 30 min ont été lavées et activées avec du LPS et de l'IFN γ . Des lysats cellulaires ont été préparés à partir de cultures cellulaires après 24 h d'incubation. **A**, Des tests Western blot ont été réalisés en utilisant des anticorps spécifiques. Une image représentative de trois expériences indépendantes est présentée. **B**, L'effet des DABs sur l'expression des protéines a été exprimé en nombre de fois d'induction. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ dénote des différences significatives par rapport au groupe DMSO 0.1% pour chaque protéine analysée. **C**, Les données sont présentées en pourcentage d'inhibition des DABs sur l'expression des protéines iNOS et COX-2. * $p < 0,05$ dénote des différences significatives par rapport au groupe DAB-1. **B** et **C**, Analyse statistique : test ANOVA à une voie suivie d'un post-test de Tukey.

3.5 Cinétique de croissance des tumeurs MB49-I en réponse à DAB-2-28

Pour étudier l'efficacité *in vivo* du DAB-1 et DAB-2-28 contre les tumeurs sous-cutanées issues de cellules MB49-I, 30 souris C57Bl/6 porteuses de tumeurs ont été divisées au hasard pour recevoir un traitement par voie IP avec 100 μ L de véhicule (0.1 % DMSO dans le PBS ; groupe témoin) ou des solutions de DAB-1 à 150 μ M et DAB-2-28 à 150 μ M. Les molécules ont été injectées 7 jours suivant l'inoculation des cellules cancéreuses.

L'analyse de la cinétique de croissance des tumeurs a montré que les tumeurs des souris du groupe témoin se développaient significativement plus vite que les tumeurs des souris traitées avec DAB-1 et DAB-2-28 (**Figure 3.9A**). Les souris ont été sacrifiées le 20^{ème} jour après l'inoculation. En effet, les tumeurs ont formé des ulcères et ils ont atteint leurs points limites. Les résultats obtenus aux jours 18 et 20 post-implantation montrent que DAB-1 et DAB-2-28 diminuent significativement la croissance des tumeurs par rapport au groupe témoin. En effet, à la fin des expérimentations, nous avons constaté une diminution allant jusqu'à 3 fois et 4 fois pour DAB-1 et DAB-2-28 respectivement, par rapport au groupe témoin (**Figure 3.9A**) sans affecter le poids corporel de souris tout au long de la thérapie (**Figure 3.9B**).

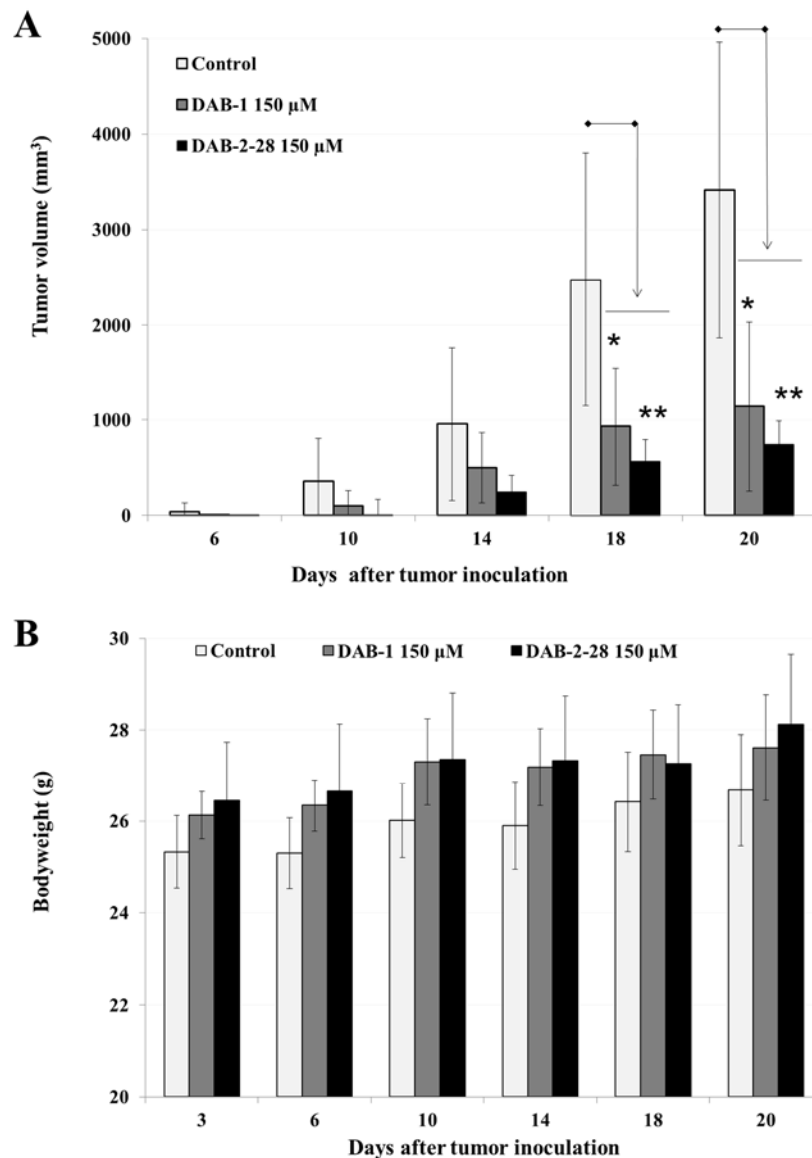


Figure 3.9 Croissance tumorale des cellules MB49-I ectopiques en réponse à la thérapie moléculaire DAB-1 et DAB-2-28. **A**, représentation graphique montrant les effets du DAB-1 et du DAB-2-28 sur le développement des tumeurs MB49-I implantées par voie sous-cutanée chez des souris mâles ($n = 8$) ; le volume est exprimé en mm^3 et correspond à la moyenne pour chaque groupe de souris. **B**, mesures du poids corporel dans les sous-groupes de souris mâles témoins (0,1 % de DMSO dans du PBS) et traitées au DAB-1 ; les données sont exprimées en grammes et correspondent à la moyenne de chaque groupe de souris. Les barres d'erreur représentent \pm SEM. **A et B**, analyse statistique : * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ par test ANOVA bidirectionnelle suivie d'un test de comparaison multiple de Benferroni.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Analyse critique des études proposées

Au cours des dernières décennies, malgré l'amélioration de la survie dans la majorité des cancers à forte incidence, les taux de survie des patients atteints de CVU sont restés statiques. La RTU de la tumeur est le traitement de première intention pour les patients atteints de NMIBC. Malheureusement, le taux élevé de récurrence et de progression après la RTU nécessite l'utilisation de traitements adjuvants. Cela implique l'instillation d'agents chimiothérapeutiques, généralement de la mitomycine-C, ou d'agents immunothérapeutiques tels que le BCG, seuls ou en association. Le BCG intravésical est le traitement standard des NMIBC de haut grade, et doit être administré selon un programme de suivi. Malheureusement, certains patients ne peuvent pas tolérer les effets secondaires, et/ou sont réfractaires au traitement au BCG. Pour les patients atteints d'un MIBC, l'approche standard est la cystectomie radicale. Cependant, ce traitement est associé à des effets néfastes sur le bien-être et la qualité de vie des patients [129].

Au fait, le traitement du CVU de type NMIBC est problématique compte tenu de l'histoire naturelle variable de la maladie. Bien que les options de traitement contemporaines soient limitées, de nouvelles cibles et de nouvelles approches sont à l'étude pour prévenir la récurrence et la progression du CVU. Parmi ceux-ci, les protéines

iNOS et COX-2 constituent des cibles prometteuse car elles jouent un rôle important dans la carcinogenèse urothéliale [92, 114].

Pour les inhibiteurs de l'enzyme iNOS, il a été démontré qu'ils inhibent efficacement le développement et la croissance tumorale, dans les modèles de CVU *in vitro* et *in vivo* [92, 114]. Cependant, leur utilisation comme agents anticancer est encore au stade préclinique et aucun essai clinique est en cours pour traiter le CVU. La raison la plus probable est qu'il a été démontré que le NO est à la fois tumoricide et promoteur de tumeurs, bien que cela soit controversé [137]. Cependant, des concentrations élevées de NO et de cytokines inflammatoires se retrouvent dans une pléthore de conditions, ce qui prouve que la voie iNOS/NO peut être essentiel pour certains effets pathogènes, notamment dans les différents stades du développement de CVU [92, 114].

Pour les inhibiteurs de COX-2, une étude clinique pilote sur le célécoxib a récemment été proposée pour prévenir les récurrences chez les patients atteints de NMIBC à risque intermédiaire ou élevé [105]. Les résultats de l'essai clinique indiquent qu'il n'a pas été démontré que le célécoxib réduisait le risque de récurrence chez les patients NMIBC à risque intermédiaire ou élevé, bien que le célécoxib ait été associé à un retard de récurrence chez les patients atteints de NMIBC pT1 [105]. Toutefois, selon les conclusions et recommandation des auteurs, le risque accru d'événements cardiovasculaires ne justifie pas l'utilisation du célécoxib comme thérapie de remplacement actuel pour les cas de CVU de type NMIBC.

L'un des principaux défis que pose le développement de nouveaux schémas thérapeutiques pour le traitement de CVU est la démographie des patients qui en sont atteints. La population cible est âgée et présente souvent des comorbidités, dont certaines sont liées au tabagisme, comme un dysfonctionnement rénal et un état de santé précaire. Ces caractéristiques nécessitent le développement de régimes bien tolérés. L'utilisation de nouvelles thérapies ciblées dans le traitement de CVU a pour

but d'éliminer la tumeur, avec moins d'effets secondaires systémiques que la chimiothérapie cytotoxique conventionnelle. Les traitements émergents prometteurs comprennent l'immunothérapie anti-PCI avec les inhibiteurs des protéines immunomodulatrices PD1 et PD-L1. L'inhibition des protéines PD1 et PD-L1 a permis d'obtenir des réponses durables chez les patients atteints de MIBC avancé, qui avaient déjà reçu une chimiothérapie à base de platine. Bien que la thérapie anti-PD1/PDL1 ait montré une efficacité impressionnante dans le traitement des tumeurs solides, la sensibilité durable n'est apparue que chez une petite proportion de patients. Certains patients qui répondaient initialement à la thérapie ont fini par développer une résistance acquise. En plus, l'immunothérapie anti-PCI est extrêmement coûteuse et la plupart des patients atteints de CVU ne tirent pas des bénéfices significatifs de leur utilisation [130].

Par conséquent, nos recherches actuelles sur les DABs se poursuivent et visent à améliorer les propriétés thérapeutiques des molécules que nous avons développées et appliquées dans une nouvelle stratégie visant à cibler l'inflammation liée au cancer dans les modèles précliniques de CVU. Des résultats très prometteurs ont été obtenus dans la perspective d'utilisation des DABs comme traitement alternatif contre le CVU avec la molécule DAB-1. La présente étude avait donc pour but de vérifier s'il est possible d'améliorer l'activité anti-inflammatoire et anti-cancer et de réduire la toxicité de DAB-1 en modifiant la fonction tert-butyloxycarbonyle de son côté droit. Pour valider cette hypothèse, de nouvelles molécules DABs de 2^e et 3^e génération ont été synthétisées et caractérisées dans nos laboratoires.

Premièrement, une étude sur la relation structure-activité des molécules DABs de 2^e génération a été effectuée. Le but étant de produire des dérivés ayant une activité cytotoxique réduite tout en ayant une activité anti-inflammatoire et anti-cancer supérieure à DAB-1. De nombreuses études montrent que le cancer de la vessie est caractérisé par une production intensifiée de NO. Les RNS, semblables aux ROS peuvent causer des dommages oxydatifs et nitrosatifs à l'ADN et ont la capacité de

modifier les protéines de manière post-traductionnelle. Contrairement aux ROS, dont la surproduction résulte de l'exposition à des xénobiotiques cancérigènes, le NO est produit en grande quantité aux sites d'inflammation tissulaire. L'activité soutenue de l'enzyme iNOS joue donc un rôle important dans la carcinogenèse associée à la réponse inflammatoire, caractéristique également du cancer de la vessie. Donc, afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire des DABs, nous avons comparé leurs efficacités à inhiber la production de NO dans les cellules MB49-I, un modèle murin de CVU hautement invasif. Les résultats indiquent que les molécules de 2^e génération DAB-2-31B et DAB-2-31E ont une efficacité similaire à celle de DAB-1 pour inhiber la production en NO. D'autre part, la molécule DAB-2-28 inhibe significativement la production de NO de manière plus efficace que DAB-1.

L'évaluation de l'activité anti-tumorale des DABs de 2^e génération par rapport au DAB-1 a été effectuée en mesurant la capacité de ces différentes molécules à inhiber les voies de signalisation IL6/STAT3 et TNF α /NF κ B dans les cellules murines de CVU MB49-I. L'activation et l'interaction entre STAT3 et NF- κ B jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la communication entre les cellules cancéreuses et les cellules inflammatoires. Les facteurs de transcription STAT3 et NF κ B sont deux facteurs majeurs qui contrôlent la capacité des cellules prénéoplasiques et malignes à résister à la surveillance tumorale basée sur l'apoptose et qui régulent l'angiogenèse et l'invasivité des tumeurs. Donc, dans le cas de CVU, les voies de signalisation STAT3 et NF κ B constituent de cibles majeures en raison de leurs implications dans l'initiation, la promotion de la prolifération et de l'invasion, ainsi que dans la médiation de la chimiorésistance tumorales. Cette étude a révélé que DAB-2-28 est plus efficace que DAB-1, DAB-2-31B et DAB-2-31E à inhiber les voies de signalisation IL6/STAT3 et TNF α /NF κ B dans les cellules murines de CVU MB49-I. D'autre part, ces résultats démontrent que DAB-2-31B et DAB-2-31E sont moins efficaces que DAB-1 et DAB-2-28 à inhiber les voies de signalisation IL6/STAT3 et TNF α /NF κ B.

L'évaluation cytotoxique des molécules de 2^e génération, effectuée avec le test MTT, avait pour but de trouver une nouvelle molécule avec une activité cytotoxique moindre que la molécule DAB-1. Les résultats indiquent que les molécules DAB-1 et les DABs de 2^e génération ont toutes un effet négatif sur la viabilité des cellules MB49-I. Les résultats indiquent que les molécules DAB-1 et les DABs de 2^e génération ont toutes un effet négatif sur la viabilité des cellules RAW 264.7. Par contre, par rapport à DAB-1, DAB-2-28 exerce un effet moins négatif sur la viabilité cellulaire à fortes doses. Les analyses démontrent aussi que les molécules DAB-2-31B et DAB-2-31E ont un effet similaire à celui de DAB-1 pour inhiber la viabilité cellulaire. Toutefois, le principe du test de viabilité utilisé repose sur l'utilisation d'un sel de térazolium qui est réduit en formazan par certains enzymes intracellulaires des cellules vivantes. La quantité de formazan produite est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules [131]. Cependant, l'utilisation du test MTT pour mesurer la viabilité de nos cellules présente plusieurs limites et ne permet pas de faire une différence entre la viabilité et la cytotoxicité [131]. En plus, le réactif MTT présente des effets cytotoxiques, et l'ajout de ce réactif pour estimer la viabilité cellulaire peut en fait endommager ou même tuer des cellules au cours d'une expérience [131]. En revanche, il existe d'autres tests alternatifs mesurent différents marqueurs qui sont moins critiques pour la survie des cellules. En effet, l'ApoTox-Glo™ Triplex Assay (Promega) permet de mesurer la viabilité, la cytotoxicité et l'apoptose dans le même puits d'échantillon. Ce test est beaucoup plus sensible que le MTT et permet de faire une différence entre la viabilité et la cytotoxicité et aussi de déterminer avec précision le mécanisme de mort cellulaire en moins de temps et avec moins d'échantillons. Cependant, nos études précédentes ont montré que les effets négatifs du DAB-1 sur la viabilité cellulaire ne seraient pas causés par une augmentation de la mortalité cellulaire mais plutôt par l'arrêt de la prolifération cellulaire [107, 108]. Ainsi, il est possible de proposer que, *in vitro*, DAB-2-28 a une activité anti-proliférative ou cytotoxique moindre que la molécule DAB-1 et, qu'à faibles doses, DAB-2-28 est plus efficace que DAB-1 pour inhiber autant la production

de NO induite par la combinaison $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ que les voies de signalisation pro-inflammatoires et pro-tumorales IL6/STAT3 et $\text{TNF}\alpha/\text{NF}\kappa\text{B}$ dans les cellules de CVU MB49-I. Donc, la modification apportée au niveau de la branche droite de DAB-1 pour produire DAB-2-28 semble améliorer son activité anti-inflammatoire et anti-cancer avec une cytotoxicité réduite. Par contre, les groupements acétyles ajoutés pour produire les autres molécules de 2^e génération (DAB-2-31-B et DAB-2-31E) semblent n'avoir aucun effet sur l'amélioration du potentiel de DAB-1.

En ayant déterminé que DAB-2-28 était la molécule de 2^e génération la plus efficace parmi les autres DABs, on a comparé son activité anti-inflammatoire, anti-cancer et cytotoxique avec les molécules de 3^e génération : DAB-3-27 et DAB-3-33. Afin de vérifier si ces molécules de 3^e génération ont une activité anti-inflammatoire supérieure tout en étant moins toxiques, nous avons traité les cellules avec deux doses : 30 et 60 μM . Les résultats du traitement avec 30 μM indiquent que les molécules ont toutes un effet négatif similaire sur le taux de production de NO avec peu d'effet sur la viabilité. D'autre part, les résultats du traitement à une dose de 60 μM montrent aussi que les molécules semblent avoir toutes un effet négatif similaire sur le taux de production de NO. Par contre, comparativement à DAB-2-28, les prétraitements avec les molécules DAB-1, DAB-3-27 et DAB-3-33 ont un impact important sur la viabilité cellulaire. Ainsi, le taux d'inhibition de la production de NO a été normalisé en fonction de la viabilité. À une dose de 60 μM , DAB-2-28 est la molécule la plus efficace à inhiber la production de NO. Par la suite, on retrouve DAB-3-33 qui semble être plus efficace que DAB-1 et DAB-3-27. Dans le but de comparer la capacité anti-tumorale des deux molécules de 3^e génération, nous avons évalué la capacité de DAB-3-33 et DAB-3-27 à réguler l'activation des voies de signalisation IL6/STAT3 et $\text{TNF}\alpha/\text{NF}\kappa\text{B}$. La molécule DAB-3-27 est moins efficace que DAB-1 et DAB-3-33 à inhiber les voies IL6/STAT3 et $\text{TNF}\alpha/\text{NF}\kappa\text{B}$. D'autre part, DAB-3-33 est plus efficace que DAB-1 à inhiber la voie de signalisation IL6/STAT3. Par contre, DAB-3-33 est aussi efficace

que DAB-1 à inhiber la voie $\text{TNF}\alpha/\text{NF}\kappa\text{B}$. Donc, il est possible de conclure que l'activité anti-cancer de DAB-3-33 est supérieure à celle de DAB-1 et que parmi les molécules de 3^e génération, DAB-3-33 est la plus efficace.

Deuxièmement, afin de mieux évaluer l'activité anti-inflammatoire des molécules choisies (DAB-1, DAB-2-28 et DAB-3-33) pour les études de thérapie moléculaire dans le modèle préclinique de CVU murin MB49-I, le modèle *in vivo* d'inflammation aiguë induite par la carraghénane chez la souris CD-1 a été utilisé. Ce modèle permet une évaluation rapide de la capacité d'un composé à fournir une activité anti-inflammatoire. Cette étude indique que les molécules DAB-2-28 et DAB-3-33 ont des effets anti-inflammatoires similaires à ceux du DAB-1 pendant la première et la deuxième phase du processus inflammatoire induit par la carraghénane (iNOS et COX-2).

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des DABs, on a comparé l'effet des DABs sur l'expression des enzymes iNOS et COX-2 des MΦs péritonéaux. Les résultats indiquent que DAB-1, DAB-2-28 et DAB-3-33 sont capables de diminuer l'expression des enzymes iNOS et COX-2 induite par la combinaison LPS et $\text{IFN}\gamma$. Ces résultats confirment les résultats observés avec le modèle murin d'inflammation de la patte induite par la carraghénane dans lequel l'enflure est due, dans la première phase, à l'expression de l'enzyme iNOS et dans la seconde, à l'expression de l'enzyme COX-2. En effet, nous avons constaté que toutes les DABs à l'étude réduisent significativement l'œdème pendant les premières 24 h mais aussi à 48 h et 72 h après l'injection de carraghénane. Ces résultats contrastent avec ceux *in vitro* indiquant que DAB-2-28 est plus efficace que DAB-1 et DAB-3-33 à inhiber les niveaux d'expression des enzymes iNOS et COX-2, alors que les trois molécules diminuent l'œdème des deux phases d'inflammation de façon semblable. Cette divergence pourrait être expliquée par le fait que les mesures des œdèmes au niveau de la voûte plantaire de souris ont été prises à l'aide d'un micromètre. Bien que cet outil soit

pertinent pour ce genre d'études, il existe des instruments capables de prendre des mesures plus précises de l'enflure des patte de souris. Parmi ces instruments, le pléthysmomètre aurait pu être utilisé car il a été conçu spécifiquement pour mesurer précisément et de manière reproductible, le volume de la patte chez les rongeurs [132]. Il permet d'afficher le volume exact de la patte et des petites différences sont détectées par un transducteur [132]. Donc, il est possible que nos mesures ne soient pas assez précises pour détecter des différences de l'effet de nos molécules et confirmer si DAB-2-28 aurait un effet anti-inflammatoire supérieur à DAB-1 et DAB-3-33.

Enfin, pour atteindre notre troisième objectif, nous avons étudié le potentiel anti-cancer du meilleur dérivé de DAB-1, soit DAB-2-28, dans un modèle préclinique de CVU. Pour y arriver, nous avons étudié l'efficacité de DAB-1 et DAB-2-28 contre les tumeurs sous-cutanées issues de cellules MB49-I implantées ectopiquement dans les souris mâles C57Bl/6. La lignée cellulaire de tumeur invasive de la vessie MB49-I est très agressive et a été obtenue après plusieurs passages *in vivo* consécutifs de la tumeur primaire obtenue par inoculation sous-cutanée de cellules de tumeur de la vessie MB49 des souris mâles C57Bl/6 [113]. L'analyse de la cinétique de croissance des tumeurs a montré que les tumeurs des souris du groupe témoin se développaient significativement plus vite que les tumeurs des souris traitées avec DAB-1 et DAB-2-28. Les analyses statistiques démontrent que DAB-2-28 diminue plus significativement la taille des tumeurs que DAB-1.

L'ensemble de nos résultats nous a permis de confirmer l'hypothèse qu'il est possible d'améliorer l'activité anti-inflammatoire et anti-cancer de DAB-1. La molécule DAB-2-28 a démontré une plus grande efficacité anti-inflammatoire et anti-tumorale *in vitro* et *in vivo* avec un effet amélioré sur la viabilité cellulaire *in vitro*. Toutefois, la molécule DAB-3-33 est aussi à considérer car elle possède des activités anti-inflammatoire et anti-cancer supérieure à DAB-1 *in vitro*. Par contre, DAB-3-33 a une activité anti-proliférative ou cytotoxique supérieure à DAB-1.

4.2 Perspectives d'une thérapie du cancer de la vessie avec les DABs

Dans le modèle utilisé pour comparer l'activité anti-cancer de nos molécules, les tumeurs proviennent d'un animal de la même espèce. Les lignées de cellules tumorales murines MB49 et MB49-I ont été obtenues à partir de tumeurs chimio-induites. L'avantage principal de ce modèle est d'utiliser des souris immunocompétentes permettant ainsi l'étude des relations complexes entre cancer et système immunitaire et l'évaluation de l'efficacité des thérapies immunomodulatrices. Cependant, il existe une faible corrélation entre l'activité thérapeutique des molécules évaluées dans les modèles syngéniques et leur efficacité chez l'homme, probablement en raison de l'utilisation de cellules tumorales murines, très différentes biologiquement de leurs équivalents humains. Il serait donc intéressant d'évaluer l'activité anti-cancer des DABs dans un modèle de xénogreffe ectopique et orthotopique avec des lignées des tumeurs humaines de CVU. En effet, des études avec les xénogreffes ectopiques ou orthotopiques de CVU serait la prochaine étape pour étudier nos nouveaux agents thérapeutiques *in vivo*. Le modèle orthotopique, en particulier, est plus souvent difficile à produire, mais il permet d'observer l'effet des agents thérapeutiques sur le microenvironnement tumoral et le plus souvent, selon l'agressivité des cellules tumorales utilisées, celui sur l'envahissement métastatique. Ainsi, une nouvelle technique, moins invasive, a été développée par le département des sciences urologiques de l'Université de la Colombie-Britannique en utilisant un guidage échographique [133]. Cette technique consiste à inoculer par voie percutanée des lignées cellulaires du CVU grâce à un guidage par ultrasons. Tout d'abord, une seringue de 1,0 ml remplie de PBS et reliée à une aiguille 30G x 3/4" a été amenée sur la peau juste au-dessus de l'os pubien à un angle de 30°. Après détection de l'aiguille sur l'écran d'échographie, elle a été passée à travers la peau et les muscles de la paroi abdominale. L'extrémité a été insérée dans la paroi de la vessie sans pénétrer dans la muqueuse. Par la suite, du PBS a été injecté entre la couche musculaire et la muqueuse

afin de créer un espace et l'aiguille a été retirée. Finalement, une deuxième seringue de 1,0 mL (remplie de cellules cancéreuses) avec une aiguille 30G x 3/4", a été guidée dans le même espace et la suspension cellulaire a été injectés dans cet espace. En effet, l'équipe de recherche de l'Université de la Colombie-Britannique a réussi à inoculer par voie percutanée les lignées cellulaires UM-UC1, UM-UC3 et UM-UC13 du CVU à 50 souris nude athymiques. Ils ont pu démontrer que cette approche est rapide, précise et sûre. La croissance de la tumeur est surveillée à intervalles réguliers par imagerie (bioluminescence et ultrasons) [133]. Il serait donc intéressant d'utiliser cette nouvelle approche pour évaluer la capacité des DABs à inhiber la croissance tumorale dans un modèle de xéno greffe orthotopique de CVU. D'autre part, il serait aussi intéressant de comparer l'activité anti-tumorale des DABs avec les traitements actuels comme la chimiothérapie intravésicale et le BCG à l'aide du même modèle.

De plus, la question de coût est particulièrement importante pour le diagnostic et la gestion du CVU. De tous les cancers, c'est le CVU qui entraîne le coût de traitement le plus élevé par patient [134]. La pénurie de BCG a également eu un impact significatif sur le coût total du traitement et les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire qui améliorent les résultats par rapport à la chimiothérapie sont également très coûteux [135, 136]. Cependant, les DABs sont des petites molécules très faciles à synthétiser et dont le coût de fabrication en grande quantité serait une fraction du prix des médicaments actuels et donc accessibles et abordables pour la population en général.

CONCLUSION

Le DAB-1 a été récemment identifié comme une molécule présentant une activité anti-inflammatoire et anticancéreuse [115]. Dans cette étude, nous avons caractérisé cinq analogues dérivés du DAB-1 dans le but d'améliorer le potentiel biologique de ce type de molécule.. Les cinq molécules synthétisées ont été testées *in vitro* pour leur potentiel biologique, notamment leur activité anti-inflammatoire et antiproliférative. En conséquence, nos différentes études *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* sur la relation structure-activité des DAB ont révélé que le DAB-2-28 a une activité cytotoxique plus faible avec une plus grande efficacité que le DAB-1 pour inhiber significativement : 1) la production de NO induite par la combinaison IFN γ /TNF α ; 2) les voies de signalisation IL6/STAT3 et TNF α /NF κ B ; 3) l'expression des enzymes iNOS et COX-2 induite par la combinaison IFN γ /LPS ; et 4) la croissance des tumeurs MB49-I sous-cutanées hautement invasives. Par conséquent, ce composé simple pourrait être intéressant en tant que dérivé anti-inflammatoire non toxique pour étudier le rôle de l'inflammation dans le CVU et d'autres cancers à l'avenir. D'autres études utilisant un modèle humain *in vivo* d'invasion et de métastase du CVU sont actuellement en cours pour démontrer les effets anticancéreux de cette nouvelle molécule anti-inflammatoire.

BIBLIOGRAPHIE

1. *Canadian Cancer Statistics*. 2019.
2. Ribal, M.J., *Bladder Cancer Epidemiology*, in *Bladder Tumors: Molecular Aspects and Clinical Management*, V.B. Lokeshwar, A.S. Merseburger, and S.H. Hautmann, Editors. 2011, Humana Press: Totowa, NJ. p. 1-22.
3. Zeegers, M.P., et al., *The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies*. *Cancer*, 2000. **89**(3): p. 630-9.
4. Kiriluk, K.J., et al., *Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures*. *Urol Oncol*, 2012. **30**(2): p. 199-211.
5. Matanoski, G.M. and E.A. Elliott, *Bladder cancer epidemiology*. *Epidemiologic reviews*, 1981. **3**: p. 203-29.
6. Altieri, A., C. La Vecchia, and E. Negri, *Fluid intake and risk of bladder and other cancers*. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2003. **57**(2): p. S59-S68.
7. Lawson, M., et al., *Urological implications of cyclophosphamide and ifosfamide*. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 2008. **42**(4): p. 309-317.
8. Hicks, R.M., *Promotion in bladder cancer*. *Carcinog Compr Surv*, 1982. **7**: p. 139-53.
9. Grossfeld, G.D. and P.R. Carroll, *EVALUATION OF ASYMPTOMATIC MICROSCOPIC HEMATURIA*. *Urologic Clinics of North America*, 1998. **25**(4): p. 661-676.
10. Shephard, E.A., et al., *Clinical features of bladder cancer in primary care*. *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners*, 2012. **62**(602): p. e598-e604.
11. Schmidt-Hansen, M., S. Berendse, and W. Hamilton, *The association between symptoms and bladder or renal tract cancer in primary care: a systematic review*. *Br J Gen Pract*, 2015. **65**(640): p. e769-75.

12. Dodd, L.G., et al., *Endoscopic brush cytology of the upper urinary tract. Evaluation of its efficacy and potential limitations in diagnosis.* Acta Cytol, 1997. **41**(2): p. 377-84.
13. Gray Sears, C.L., et al., *Prospective comparison of computerized tomography and excretory urography in the initial evaluation of asymptomatic microhematuria.* J Urol, 2002. **168**(6): p. 2457-60.
14. Zhu, C.-Z., et al., *A review on the accuracy of bladder cancer detection methods.* Journal of Cancer, 2019. **10**(17): p. 4038-4044.
15. Hickling, D.R., T.-T. Sun, and X.-R. Wu, *Anatomy and Physiology of the Urinary Tract: Relation to Host Defense and Microbial Infection.* Microbiology spectrum, 2015. **3**(4): p. 10.1128/microbiolspec.UTI-0016-2012.
16. *American Joint Committee on Cancer* 1997.
17. Sanli, O., et al., *Bladder cancer.* Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17022.
18. Berdik, C., *Unlocking bladder cancer.* Nature, 2017. **551**(7679): p. S34-s35.
19. Knowles, M.A. and C.D. Hurst, *Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity.* Nat Rev Cancer, 2015. **15**(1): p. 25-41.
20. Fisher, M.R., H. Hricak, and E.A. Tanagho, *Urinary bladder MR imaging. Part II. Neoplasm.* Radiology, 1985. **157**(2): p. 471-477.
21. Tekes, A., et al., *Dynamic MRI of Bladder Cancer: Evaluation of Staging Accuracy.* American Journal of Roentgenology, 2005. **184**(1): p. 121-127.
22. Yeung, C., T. Dinh, and J. Lee, *The health economics of bladder cancer: an updated review of the published literature.* Pharmacoeconomics, 2014. **32**(11): p. 1093-104.
23. Stenzl, A., J. Hennenlotter, and D. Schilling, *Can we still afford bladder cancer?* Curr Opin Urol, 2008. **18**(5): p. 488-92.
24. Sylvester, R.J., et al., *Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa-pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Which Patients Benefit from the Instillation?* Eur Urol, 2016. **69**(2): p. 231-44.

25. Holmang, S. and S.L. Johansson, *Stage Ta-T1 bladder cancer: the relationship between findings at first followup cystoscopy and subsequent recurrence and progression*. J Urol, 2002. **167**(4): p. 1634-7.
26. Morales, A., D. Eidinger, and A.W. Bruce, *Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors*. J Urol, 1976. **116**(2): p. 180-3.
27. Sylvester, R.J., et al., *Long-term efficacy results of EORTC genito-urinary group randomized phase 3 study 30911 comparing intravesical instillations of epirubicin, bacillus Calmette-Guérin, and bacillus Calmette-Guérin plus isoniazid in patients with intermediate- and high-risk stage Ta T1 urothelial carcinoma of the bladder*. Eur Urol, 2010. **57**(5): p. 766-73.
28. Mostafid, A.H., et al., *Therapeutic options in high-risk non-muscle-invasive bladder cancer during the current worldwide shortage of bacille Calmette-Guérin*. Eur Urol, 2015. **67**(3): p. 359-60.
29. Guallar-Garrido, S. and E. Julián, *Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Therapy for Bladder Cancer: An Update*. ImmunoTargets and therapy, 2020. **9**: p. 1-11.
30. Pettenati, C. and M.A. Ingersoll, *Mechanisms of BCG immunotherapy and its outlook for bladder cancer*. Nature Reviews Urology, 2018. **15**(10): p. 615-625.
31. Smith, Z.L., et al., *Bladder preservation in the treatment of muscle-invasive bladder cancer (MIBC): a review of the literature and a practical approach to therapy*. BJU Int, 2013. **112**(1): p. 13-25.
32. Yin, M., et al., *Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis*. Oncologist, 2016. **21**(6): p. 708-15.
33. Nadal, R. and J. Bellmunt, *Management of metastatic bladder cancer*. Cancer Treat Rev, 2019. **76**: p. 10-21.
34. Carosella, E.D., et al., *A Systematic Review of Immunotherapy in Urologic Cancer: Evolving Roles for Targeting of CTLA-4, PD-1/PD-L1, and HLA-G*. Eur Urol, 2015. **68**(2): p. 267-79.
35. Tian, T., et al., *The origins of cancer robustness and evolvability*. Integr Biol (Camb), 2011. **3**(1): p. 17-30.
36. Palucka, K. and J. Banchereau, *Cancer immunotherapy via dendritic cells*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 265-77.

37. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. Nature, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
38. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1027-34.
39. Bellmunt, J., et al., *Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma*. New England Journal of Medicine, 2017. **376**(11): p. 1015-1026.
40. Sharma, P., et al., *Nivolumab monotherapy in recurrent metastatic urothelial carcinoma (CheckMate 032): a multicentre, open-label, two-stage, multi-arm, phase 1/2 trial*. Lancet Oncol, 2016. **17**(11): p. 1590-1598.
41. Powles, T., et al., *MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer*. Nature, 2014. **515**(7528): p. 558-62.
42. Patel, M.R., et al., *Avelumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum failure (JAVELIN Solid Tumor): pooled results from two expansion cohorts of an open-label, phase 1 trial*. Lancet Oncol, 2018. **19**(1): p. 51-64.
43. Powles, T., et al., *Efficacy and Safety of Durvalumab in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma: Updated Results From a Phase 1/2 Open-label Study*. JAMA Oncol, 2017. **3**(9): p. e172411.
44. Cheng, W., et al., *Unwrapping the genomic characteristics of urothelial bladder cancer and successes with immune checkpoint blockade therapy*. Oncogenesis, 2018. **7**(1): p. 2.
45. Snyder, A., et al., *Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma*. New England Journal of Medicine, 2014. **371**(23): p. 2189-2199.
46. Tumeh, P.C., et al., *PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance*. Nature, 2014. **515**(7528): p. 568-71.
47. Taube, J.M., et al., *Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(19): p. 5064-74.
48. Massari, F., et al., *Immune checkpoint inhibitors for metastatic bladder cancer*. Cancer Treat Rev, 2018. **64**: p. 11-20.
49. Rijnders, M., et al., *Systematic Review of Immune Checkpoint Inhibition in Urological Cancers*. Eur Urol, 2017. **72**(3): p. 411-423.

50. Marin-Acevedo, J.A., et al., *Cancer immunotherapy beyond immune checkpoint inhibitors*. J Hematol Oncol, 2018. **11**(1): p. 8.
51. O'Donnell, J.S., et al., *Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition*. Cancer Treat Rev, 2017. **52**: p. 71-81.
52. Gong, J., et al., *Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations*. J Immunother Cancer, 2018. **6**(1): p. 8.
53. Greten, F.R. and S.I. Grivennikov, *Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences*. Immunity, 2019. **51**(1): p. 27-41.
54. Grover, S., et al., *Role of inflammation in bladder function and interstitial cystitis*. Therapeutic advances in urology, 2011. **3**(1): p. 19-33.
55. Joseph, M. and D. Enting, *Immune Responses in Bladder Cancer-Role of Immune Cell Populations, Prognostic Factors and Therapeutic Implications*. Frontiers in Oncology, 2019. **9**(1270).
56. Fialkow, L., Y. Wang, and G.P. Downey, *Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(2): p. 153-64.
57. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
58. Michaud, D.S., *Chronic inflammation and bladder cancer*. Urol Oncol, 2007. **25**(3): p. 260-8.
59. Kundu, J.K. and Y.-J. Surh, *Kundu JK, Surh YJ Inflammation: gearing the journey to cancer. Mutat Res 659(1-2): 15-30*. Mutation research, 2008. **659**: p. 15-30.
60. Mantovani, A., et al., *Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment*. Lancet, 2008. **371**(9614): p. 771-83.
61. La Vecchia, C., et al., *Genital and urinary tract diseases and bladder cancer*. Cancer Res, 1991. **51**(2): p. 629-31.
62. Kantor, A.F., et al., *Urinary tract infection and risk of bladder cancer*. American journal of epidemiology, 1984. **119**(4): p. 510-5.
63. Lamm, D.L. and R.F. Gittes, *Inflammatory carcinoma of the bladder and interstitial cystitis*. J Urol, 1977. **117**(1): p. 49-51.

64. Thompson, D.B., et al., *Immunological basis in the pathogenesis and treatment of bladder cancer*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2015. **11**(2): p. 265-79.
65. Samadi, A.K., et al., *A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation*. *Semin Cancer Biol*, 2015. **35 Suppl**: p. S151-84.
66. Zhu, Z., Z. Shen, and C. Xu, *Inflammatory pathways as promising targets to increase chemotherapy response in bladder cancer*. *Mediators Inflamm*, 2012. **2012**: p. 528690.
67. Ayari, C., et al., *Bladder tumor infiltrating mature dendritic cells and macrophages as predictors of response to bacillus Calmette-Guerin immunotherapy*. *Eur Urol*, 2009. **55**(6): p. 1386-95.
68. Takayama, H., et al., *Increased infiltration of tumor associated macrophages is associated with poor prognosis of bladder carcinoma in situ after intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation*. *J Urol*, 2009. **181**(4): p. 1894-900.
69. Hanada, T., et al., *Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer*. *Int J Urol*, 2000. **7**(7): p. 263-9.
70. Dufresne, M., et al., *Pro-inflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages differentially modulate cell survival and invasion of human bladder carcinoma T24 cells*. *Mol Immunol*, 2011. **48**(12-13): p. 1556-67.
71. Andrews, B., et al., *Preoperative plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor predict disease recurrence and survival of patients with bladder cancer*. *J Urol*, 2002. **167**(3): p. 1475-81.
72. Jung, H.Y., L. Fattet, and J. Yang, *Molecular pathways: linking tumor microenvironment to epithelial-mesenchymal transition in metastasis*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(5): p. 962-8.
73. Yu, L., et al., *Tumor necrosis factor alpha induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis via NF-kappaB signaling pathway-mediated TWIST expression in hypopharyngeal cancer*. *Oncol Rep*, 2014. **31**(1): p. 321-7.
74. Rojas, A., et al., *IL-6 promotes prostate tumorigenesis and progression through autocrine cross-activation of IGF-IR*. *Oncogene*, 2011. **30**(20): p. 2345-55.
75. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* *Nature reviews. Cancer*, 2007. **7**(6): p. 415-28.

76. Lipponen, P.K. and M.J. Eskelinen, *Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer*. Journal of cancer research and clinical oncology, 1995. **121**(5): p. 303-8.
77. Urist, M.J., et al., *Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer*. Am J Pathol, 2002. **161**(4): p. 1199-206.
78. Baumgart, E., et al., *Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition expression profile in human bladder tumors*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2007. **13**(6): p. 1685-94.
79. McConkey, D., et al., *Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer*. Cancer and Metastasis Reviews, 2009. **28**(3): p. 335-344.
80. Bruyere, F., et al., *Snail expression is an independent predictor of tumor recurrence in superficial bladder cancers*. Urol Oncol, 2010. **28**(6): p. 591-6.
81. Choi, W., et al., *p63 Expression Defines a Lethal Subset of Muscle-Invasive Bladder Cancers*. PloS one, 2012. **7**(1): p. e30206.
82. Koga, F., et al., *ErbB2 and NFkappaB overexpression as predictors of chemoradiation resistance and putative targets to overcome resistance in muscle-invasive bladder cancer*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27616.
83. Aggarwal, B.B., R.V. Vijayalekshmi, and B. Sung, *Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2009. **15**(2): p. 425-30.
84. Huang, W.T., et al., *Expression of signal transducer and activator of transcription 3 and suppressor of cytokine signaling 3 in urothelial carcinoma*. The Kaohsiung journal of medical sciences, 2009. **25**(12): p. 640-6.
85. Chen, C.L., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 activation is associated with bladder cancer cell growth and survival*. Molecular cancer, 2008. **7**: p. 78.
86. Levidou, G., et al., *Clinical significance of nuclear factor (NF)-kappaB levels in urothelial carcinoma of the urinary bladder*. Virchows Arch, 2008. **452**(3): p. 295-304.
87. Fan, Y., R. Mao, and J. Yang, *NF-kappaB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer*. Protein Cell, 2013. **4**(3): p. 176-85.

88. Grivennikov, S.I. and M. Karin, *Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(1): p. 11-9.
89. Hagemann, T., et al., *"Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB*. J Exp Med, 2008. **205**(6): p. 1261-8.
90. Kortylewski, M., et al., *Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity*. Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1314-21.
91. Rayburn, E.R., S.J. Ezell, and R. Zhang, *Anti-Inflammatory Agents for Cancer Therapy*. Mol Cell Pharmacol, 2009. **1**(1): p. 29-43.
92. Fischer, S.M., E.T. Hawk, and R.A. Lubet, *Coxibs and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs in animal models of cancer chemoprevention*. Cancer Prev Res (Phila), 2011. **4**(11): p. 1728-35.
93. Roberts, H.R., et al., *Colon tumour cells increase PGE(2) by regulating COX-2 and 15-PGDH to promote survival during the microenvironmental stress of glucose deprivation*. Carcinogenesis, 2011. **32**(11): p. 1741-7.
94. Ke, J., et al., *Prostaglandin E2 (PGE2) promotes proliferation and invasion by enhancing SUMO-1 activity via EP4 receptor in endometrial cancer*. Tumour Biol, 2016. **37**(9): p. 12203-12211.
95. Barbieri, S.S. and B.B. Weksler, *Tobacco smoke cooperates with interleukin-1beta to alter beta-catenin trafficking in vascular endothelium resulting in increased permeability and induction of cyclooxygenase-2 expression in vitro and in vivo*. Faseb j, 2007. **21**(8): p. 1831-43.
96. Nakao, S., Y. Ogata, and H. Sugiya, *Nicotine stimulates the expression of cyclooxygenase-2 mRNA via NFkappaB activation in human gingival fibroblasts*. Arch Oral Biol, 2009. **54**(3): p. 251-7.
97. Song, Y., et al., *Aspirin and Its Potential Preventive Role in Cancer: An Umbrella Review*. Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 3.
98. Stopsack, K.H., et al., *A Prospective Study of Aspirin Use and Prostate Cancer Risk by TMPRSS2:ERG Status*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2018. **27**(10): p. 1231-1233.
99. Moyad, M.A., *An introduction to aspirin, NSAids, and COX-2 inhibitors for the primary prevention of cardiovascular events and cancer and their potential preventive role in bladder carcinogenesis: part II*. Semin Urol Oncol, 2001. **19**(4): p. 306-16.

100. Nath, N., et al., *Nitro-aspirin inhibits MCF-7 breast cancer cell growth: effects on COX-2 expression and Wnt/beta-catenin/TCF-4 signaling*. *Biochem Pharmacol*, 2009. **78**(10): p. 1298-304.
101. Henry, W.S., et al., *Aspirin Suppresses Growth in PI3K-Mutant Breast Cancer by Activating AMPK and Inhibiting mTORC1 Signaling*. *Cancer Res*, 2017. **77**(3): p. 790-801.
102. Pozzoli, G., et al., *Aspirin inhibits proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells via p21(Waf1) protein up-regulation and Rb1 pathway modulation*. *J Cell Mol Med*, 2019. **23**(10): p. 7078-7087.
103. Daugherty, S.E., et al., *Nonsteroidal antiinflammatory drugs and bladder cancer: a pooled analysis*. *Am J Epidemiol*, 2011. **173**(7): p. 721-30.
104. Tan, W.S., et al., *Radiofrequency-induced Thermo-chemotherapy Effect Versus a Second Course of Bacillus Calmette-Guérin or Institutional Standard in Patients with Recurrence of Non-muscle-invasive Bladder Cancer Following Induction or Maintenance Bacillus Calmette-Guérin Therapy (HYMN): A Phase III, Open-label, Randomised Controlled Trial*. *Eur Urol*, 2019. **75**(1): p. 63-71.
105. Pagliarulo, V., et al., *Celecoxib for the prevention of nonmuscle invasive bladder cancer: results from a matched control study*. *Therapeutic advances in urology*, 2015. **7**(6): p. 303-311.
106. Bérubé, G. and C. Reyes-Moreno, *Aminobenzoic acid derivatives for use as anti-inflammatory agents, anti-metastatic agents and/or anticancer agents*. Patent application submitted in Canada and in the USA on April 11th 2016. PCT application April 11th 2017, October 19th. WO2017/177316 A1., 2017.
107. Girouard, J., et al., *Molecular therapy with derivatives of amino benzoic acid inhibits tumor growth and metastasis in murine models of bladder cancer through inhibition of TNFalpha/NFKappaB and iNOS/NO pathways*. *Biochem Pharmacol*, 2020. **176**: p. 113778.
108. Hamelin-Morrisette, J., et al., *Identification of an anti-inflammatory derivative with anti-cancer potential: The impact of each of its structural components on inflammatory responses in macrophages and bladder cancer cells*. *Eur J Med Chem*, 2015. **96**: p. 259-68.
109. Jorgovanovic, D., et al., *Roles of IFN-γ in tumor progression and regression: a review*. *Biomarker Research*, 2020. **8**(1): p. 49.

110. Irey, E.A., et al., *JAK/STAT inhibition in macrophages promotes therapeutic resistance by inducing expression of protumorigenic factors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019. **116**(25): p. 12442-12451.
111. Salim, T., C.L. Sershen, and E.E. May, *Investigating the Role of TNF- α and IFN- γ Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0153289.
112. Dallagi, A., et al., *The activating effect of IFN- γ on monocytes/macrophages is regulated by the LIF-trophoblast-IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation*. Cell Mol Immunol, 2015. **12**(3): p. 326-41.
113. Lodillinsky, C., et al., *Novel invasive orthotopic bladder cancer model with high cathepsin B activity resembling human bladder cancer*. J Urol, 2009. **182**(2): p. 749-55.
114. Belgorosky, D., et al., *Inhibition of nitric oxide is a good therapeutic target for bladder tumors that express iNOS*. Nitric Oxide, 2014. **36**: p. 11-8.
115. Girouard, J., et al., *Molecular therapy with derivatives of amino benzoic acid inhibits tumor growth and metastasis in murine models of bladder cancer through inhibition of TNF α /NF κ B and iNOS/NO pathways*. Biochem Pharmacol, 2020. **176**: p. 113778.
116. Chanphai, P., et al., *Biomolecular study and conjugation of two para-aminobenzoic acid derivatives with serum proteins: drug binding efficacy and protein structural analysis*. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2021. **39**(1): p. 79-90.
117. Chanphai, P., et al., *Binding efficacy of aminobenzoic acid derivatives with DNA duplex: drug binding sites and DNA structure and dynamics*. J Biomol Struct Dyn, 2021. **39**(6): p. 2278-2283.
118. Chanphai, P., et al., *Locating the binding sites of two aminobenzoic acid derivatives on tRNA: drug binding efficacy and RNA structure*. J Biomol Struct Dyn, 2022. **40**(1): p. 130-135.
119. Canadian Cancer Statistics 2017
120. Soria, F., et al., *Characterization of Late Recurrence After Radical Cystectomy in a Large Multicenter Cohort of Bladder Cancer Patients*. Urology, 2017. **106**: p. 119-124.
121. Kawai, K., et al., *Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine*. Cancer Sci, 2013. **104**(1): p. 22-7.

122. Prasanna, T., et al., *Intravesical Gemcitabine versus Intravesical Bacillus Calmette-Guerin for the Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: An Evaluation of Efficacy and Toxicity*. *Front Oncol*, 2017. **7**: p. 260.
123. Faiena, I., et al., *Durvalumab: an investigational anti-PD-L1 monoclonal antibody for the treatment of urothelial carcinoma*. *Drug Des Devel Ther*, 2018. **12**: p. 209-215.
124. Carballido, E.M. and J.E. Rosenberg, *Optimal treatment for metastatic bladder cancer*. *Curr Oncol Rep*, 2014. **16**(9): p. 404.
125. von der Maase, H., et al., *Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study*. *Journal of clinical oncology*, 2000. **18**(17): p. 3068-3077.
126. Sternberg, C.N., et al., *Chemotherapy for bladder cancer: treatment guidelines for neoadjuvant chemotherapy, bladder preservation, adjuvant chemotherapy, and metastatic cancer*. *Urology*, 2007. **69**(1): p. 62-79.
127. Posadas, I., et al., *Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression*. *Br J Pharmacol*, 2004. **142**(2): p. 331-8.
128. Hassimotto, N.M., et al., *Inhibition of carrageenan-induced acute inflammation in mice by oral administration of anthocyanin mixture from wild mulberry and cyanidin-3-glucoside*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 146716.
129. Tyson, M.D., 2nd and D.A. Barocas, *Quality of Life After Radical Cystectomy*. *Urol Clin North Am*, 2018. **45**(2): p. 249-256.
130. Tan, W.P., W.S. Tan, and B.A. Inman, *PD-L1/PD-1 Biomarker for Metastatic Urothelial Cancer that Progress Post-platinum Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis*. *Bladder Cancer*, 2019. **5**(3): p. 211-223.
131. Ghasemi, M., et al., *The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(23).
132. Sharma, J.N., A.M. Samud, and M.Z. Asmawi, *Comparison between plethysmometer and micrometer methods to measure acute paw oedema for screening anti-inflammatory activity in mice*. *Inflammopharmacology*, 2004. **12**(1): p. 89-94.
133. Jäger, W., et al., *Ultrasound-guided intramural inoculation of orthotopic bladder cancer xenografts: a novel high-precision approach*. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e59536.

134. Sievert, K.D., et al., *Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs?* World journal of urology, 2009. **27**(3): p. 295-300.
135. Lee, S., et al., *Association of Bacillus Calmette-Guerin shortages with bladder cancer recurrence: A single-center retrospective study.* Urol Oncol, 2020. **38**(11): p. 851.e11-851.e17.
136. Kim, H., D. Liew, and S. Goodall, *Cost-effectiveness and financial risks associated with immune checkpoint inhibitor therapy.* Br J Clin Pharmacol, 2020. **86**(9): p. 1703-1710.
137. Mintz, J.; Vedenko, A.; Rosete, O.; Shah, K.; Goldstein, G.; Hare, J.M.; Ramasamy, R.; Arora, H. Current Advances of Nitric Oxide in Cancer and Anticancer Therapeutics. Vaccines 2021, 9, 94.