

Détection de l'activité télomérasique par méthode semi-quantitative et in situ et quantification de l'expression de la sous-unité hTERT dans les tumeurs vésicales

Elisabeth LONGCHAMPT (1, 2, 3), Thierry LEBRET (3), Vincent MOLINIE (2), Ivan BIECHE (1), Henry BOTTO (3), Rosette LIDEREAU (1)

(1) Laboratoire d'Oncogénétique, INSERM E0017, Saint-Cloud, France, (2) Service d'Anatomopathologie,

(3) Service d'Urologie, Hôpital Foch, Suresnes, France

RESUME

Buts : Plusieurs études ont rapporté l'importance de la télomérase, enzyme qui maintient la longueur des télomères, au cours de la cancérogénèse. Le but de notre étude a été de détecter l'activité de la télomérase par méthodes semi-quantitatives et in situ et quantifier l'expression de sa sous-unité hTERT dans un groupe de carcinomes vésicaux afin d'évaluer son intérêt diagnostique et pronostique.

Matériel et Méthodes : L'activité télomérasique (AT) a été détectée par la méthode de TRAP ("Telomeric repeat amplification protocol") sur une série de 29 carcinomes vésicaux et sur 3 muqueuses saines. Les niveaux d'expression du gène hTERT ont été étudiés par RT-PCR quantitative en temps réel. La détection in situ de l'AT a été réalisée en utilisant le même kit que la méthode TRAP, appliqué sur coupes tissulaires congelées uniquement sur les cas discordants entre la détection de l'AT et celle d'ARNm hTERT.

Résultats : Une AT a été détectée par TRAP dans 15 des 29 carcinomes. De l'ARNm hTERT a été détecté et quantifiable dans la totalité des échantillons tumoraux. Il existait une association significative entre l'AT et les niveaux d'expression d'ARNm hTERT. La détection in situ de l'AT a mis en évidence une hétérogénéité de l'AT au sein du tissu tumoral. Il existait une corrélation significative entre le niveau d'expression d'ARNm hTERT et les grades et stades histologiques tumoraux.

Conclusion : La détection d'ARNm par RT-PCR quantitative en temps réel semble être une méthode sensible dans le diagnostic du carcinome vésical avec une bonne corrélation au grade et au stade tumoral. Ainsi, l'évaluation quantitative de l'ARNm hTERT pourrait être un marqueur de progression tumorale utile dans le diagnostic précoce et le suivi des carcinomes de vessie.

Mots clés : Cancer de vessie, télomérase, marqueur diagnostique, marqueur pronostique, vessie, hTERT, RT-PCR.

Le carcinome vésical est le 5ème cancer en fréquence, en Europe et représente en France la 6ème cause de mortalité par cancer chez l'homme [4]. La récurrence et la progression sont fréquentes ce qui nécessite une surveillance stricte des patients même asymptomatiques. Le suivi des patients porteurs d'un carcinome de vessie nécessiterait une méthode simple et non invasive pour permettre de dépister les récurrences urothéliales. Actuel-

lement, aucune méthode ne s'est réellement imposée. La cytologie urinaire a une bonne spécificité mais une sensibilité qui dépend de la qualité du prélèvement et de l'expérience de l'anatomopathologiste, en particulier pour la détection de tumeurs de bas grade [5]. La cytoscopie avec biopsie reste l'examen de référence mais est inconfortable pour le patient et non dénuée de

"Detection of telomerase status by semi-quantitative and in situ assays, and by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay in bladder carcinomas".

Co-publication with the British Journal of Urology International.

Accepted for publication on 12 December, 2002.

Manuscrit reçu : décembre 2002, accepté : mars 2003

Adresse pour correspondance : Dr. E. Longchampt, Service d'Urologie, Hôpital Foch, 40, rue Worth, 92151 Suresnes Cedex..

e-mail : e.longchampt@hopital-foch.org

Ref : LONGCHAMPT E., LEBRET T., MOLINIE V., BIECHE I., Prog. Urol., 2003, 13, 238-245

complications. De plus, elle ne permet pas toujours le diagnostic en cas de tumeurs débutantes de petite taille, pouvant passer inaperçues. La recherche d'un marqueur fiable pour dépister les tumeurs de vessie serait d'une grande aide diagnostique. Plusieurs marqueurs moléculaires ont été testés et proposés (p53, Ki-67, p21) mais aucun ne s'est imposé et ils sont encore en évaluation [10, 13].

Récemment, plusieurs travaux ont rapporté le rôle des structures spécialisées, les télomères, situés aux extrémités des chromosomes eucariotes, au cours de la cancérogénèse. En effet, le maintien de la longueur des télomères sous l'action d'une enzyme la télomérase serait nécessaire à l'immortalité cellulaire [17]. Les télomères humains sont des séquences d'ADN non codant constituaient de motifs hexamériques répétés. Ils jouent un rôle majeur dans la stabilité des extrémités chromosomiques en les protégeant contre les pertes, les mécanismes de fusion et les recombinaisons rendant ainsi la cellule immortelle. L'activité de la télomérase est réprimée dans la plupart de ces cellules somatiques humaines normales, alors qu'elle est exprimée dans les cellules souches à renouvellement permanent, les cellules germinales et dans la plupart des cellules tumorales humaines [17].

En 1994, KIM et al ont mis au point la méthode TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) [11]. Par cette technique, dans des travaux récents s'intéressant aux tumeurs vésicales, l'activité télomérasique a été détectée dans 78 à 100% des cas [5, 14, 12]. Ces études suggèrent que l'activité télomérasique pourrait jouer un rôle majeur dans l'immortalisation des cellules vésicales tumorales et dans la carcinogénèse urothéliale.

La télomérase humaine est constituée principalement de 2 sous-unités : d'une part, d'une composante ARN (hTR) qui sert de matrice à l'élongation des télomères et d'une sous-unité catalytique protéique (hTERT) dont les gènes ont été récemment identifiés [17]. Même si les mécanismes d'activation de la télomérase sont encore peu connus, une corrélation entre l'expression de la sous-unité hTERT avec l'activité télomérasique a été mise en évidence dans la plupart des cancers humains. Cette étroite relation suggère que la mesure de l'expression du gène hTERT peut être utilisée comme une alternative à la mesure de l'activité télomérasique [3, 7].

La technique TRAP est effectuée sur broyat tissulaires et teste donc une population hétérogène de cellules tumorales pouvant montrer des niveaux d'expressions variables de la télomérase. En fait ce broyat peut contenir non seulement des cellules tumorales mais également des cellules du stroma ou des cellules inflammatoires et notamment des lymphocytes qui peuvent présenter une activité télomérasique lorsqu'ils sont activés [21]. Aussi, nous a-t-il paru intéressant d'appliquer une technique de TRAP in-situ sur du tissu tumoral vésical

afin d'évaluer l'expression de la télomérase dans son contexte topographique.

Dans cette étude, l'expression tissulaire de la composante hTERT de la télomérase par une technique de RT-PCR quantitative en temps réel a été réalisée. Nous l'avons comparée avec l'activité télomérasique sur broyat tissulaire dans une série de carcinomes de vessie. En cas de discordance entre ces 2 méthodes (TRAP et hTERT) une évaluation de l'activité télomérasique a été réalisée plus spécifiquement par la méthode TRAP in-situ afin de connaître la répartition de l'expression sur les coupes de tissus. Le but final était d'analyser les corrélations existantes entre l'activité télomérasique et les principales caractéristiques anatomo-pathologiques et cliniques afin de savoir si la télomérase pouvait être utilisée comme marqueur pronostique des cancers vésicaux.

MATERIEL ET METHODE

Vingt-neuf tumeurs de vessie ont été étudiées, les prélèvements ont été obtenus soit sur pièce de cystectomie, soit sur copeaux de résection endoscopique de vessie. Trois échantillons de tissus vésicaux normaux, ont également été analysés comme témoins. Tous ces échantillons ont été immédiatement congelés dans des cryotubes secs en azote liquide à -196°C , puis stockés à -80°C . Parallèlement, une étude histologique standard des tissus tumoraux après fixation et inclusion en paraffine a été réalisée permettant l'évaluation du grade de différenciation selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les tumeurs urothéliales ont été regroupées en 3 grades (G1, G2, G3) suivant le caractère respectivement bien – moyennement – peu différencié de la tumeur. De même, une évaluation du stade pTNM des tumeurs vésicales a été effectuée selon la profondeur d'invasion pariétale [19]. La classification des tumeurs est résumée sur le tableau I.

Méthode TRAP

Le kit Télomérase PCR Elisa a été utilisé, il s'agit d'une méthode non radio-active développée par Boehringer Mannheim (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). Chacun des échantillons tissulaires a fait l'objet des 15 coupes congelées à $10\text{ }\mu\text{m}$ placées dans un cryotube contenant $200\text{ }\mu\text{l}$ de tampons de lyse. Après incubation sur glace pendant 30 minutes, le lysat a été centrifugé à $16\text{ }000\text{ g}$ pendant 20 minutes à 4°C . Le surnageant a été délicatement recueilli et transféré dans un nouveau tube. La concentration protéine a été mesurée selon la technique de réduction du cuivre par les protéines (BCA, Protein Assay kit, Pierce, Rockford, USA). Deux quantités protéiques (1 et $6\text{ }\mu\text{g}$) ont été testées pour chaque échantillon. Un contrôle positif (cellules de rein humain immortalisées fournies par le

Kit) et un contrôle négatif (eau stérile) ont été testés parallèlement. Le résultat était visualisé par la méthode colorimétrique. Les échantillons étaient considérés comme positifs pour l'activité télomérasique, lorsque la valeur différentielle d'absorbance (entre 450 et 620 nm) était supérieure à 0,2. Le contrôle positif devait avoir une valeur différentielle d'absorbance supérieure à 1,5 et le contrôle négatif une valeur différentielle d'absorbance inférieure à 0,25.

Méthode RT-PCR quantitative en temps réel

L'ARN total était extrait des échantillons congelés en utilisant la méthode de l'acide phenol-guanidinium. La qualité des ARN extraits a été déterminée par électrophorèse sur gel d'Agarose à 0,7% avec marquage au bromure d'éthidium. Les bandes d'ARN ribosomal 28S et 18S étaient visualisées après exposition du gel à la lumière ultraviolette. La synthèse cDNA était obtenue par réaction de transcription reverse. La transcription reverse des ARN était effectuée en prenant le volume idéal pour chaque échantillon de façon à obtenir 1 µg d'ARN total par prélèvement, soit 4 µl des solutions d'ARN à la concentration finale de 0,25 µg/µl. Seize µl d'un mélange réactionnel (250 mmol/L TRIS-HCl, pH 8,3, 15 mmol/L MgCl₂, 375 mmol/L KCl), 500 µmol/L chaque dNTP, 20 unités d'inhibiteur de RNase (Promega Corp, Madison, WI), 10 mmol/L de dithiothreitol, 100 unités de Superscript II RNase H- reverse transcriptase (Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD), 1,5 µmol d'hexamères (Pharmacia, Uppsala, Sweden) et 1 µg de RNA. Les échantillons étaient ensuite incubés à 25°C pendant 10 minutes, puis 42°C pendant 30 minutes et enfin, 99°C pendant 5 minutes pour inactiver la reverse transcriptase. Toutes les réactions PCR ont été réalisées en utilisant un ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA). Pour cette amplification PCR, 2 couples d'amorces avec sondes étaient utilisés successivement pour les gènes étudiés RPLPO et hTERT. La séquence des amorces et des sondes ainsi que la taille des amplicons correspondants sont rapportés dans le tableau II. Les amorces choisies avaient été précédemment validées et rapportées dans une étude précédente [1]. Sept contrôles positifs ont été inclus systématiquement lors de chaque expérimentation. Le contrôle négatif a été effectué par omission d'ADNc dilué dans le mélange PCR.

Méthode TRAP in-situ

L'activité télomérase in-situ a été testée en utilisant le même kit PCR Elisa. Chaque prélèvement congelé tumoral et non tumoral a fait l'objet de 2 coupes tissulaires congelées au cryostat de 7 µm d'épaisseur et ont été entourées de Dakopen puis stockées à -80°C. Après bref séchage des lames à température ambiante, 60 µL de la solution prête à l'emploi comportant

l'amorce oligonucléotique biotinylée, les amorces sens P1-TS biotinylées et antisens P2-CX, les nucléotides, la Taq polymérase et le tampon TRIS ont été déposés sur les coupes tissulaires. Les lames ont ensuite subi une étape d'amplification dans un appareil de PCR in situ (Gene Amp In Situ, PCR System 1000, Perkin Elmer) avec tout d'abord élongation de l'amorce oligonucléotique biotinylée pendant 30 minutes à 25°C, puis inactivation de la télomérase pendant 5 minutes à 94°C.

Révélation Elisa : Cinquante µl de réactif dénaturant étaient ensuite déposés sur chaque coupe tissulaire avec incubation à température ambiante pendant 10 minutes. Après un bref rinçage dans l'eau stérile, les coupes étaient recouvertes par 80 µl de tampon d'hybridation puis recouvertes d'une lamelle et incubées pendant une nuit à 37°C en chambre humide. Les coupes étaient ensuite lavées à 3 reprises par 80 µl de tampon de lavage fourni dans le kit. L'anticorps anti-digoxigénine marqué à la fluorescéine (Anti-digoxigenin-fluorescein Fab fragments, Boehringer Mannheim) dilué au 1/10^{me} dans du tampon PBS, était ensuite appliqué avec un volume de 80 µl par coupe, les coupes incubant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. Les coupes étaient ensuite rincées à 2 reprises dans un tampon PBS, puis montées dans un milieu de montage pour examen en fluorescence (Shandon-Immumount, Pittsburgh). Les lames étaient ensuite lues au microscope à fluorescence et interprétées de façon semiquantitative de la façon suivante : - absence de signal, + signal nucléaire présente dans moins de 10 % des cellules, ++ signal nucléaire présent dans 10 à 50 % des cellules, +++ signal nucléaire présent dans plus de 50 % des cellules.

Une coupe de parenchyme testiculaire sain a été utilisée comme contrôle positif (présence d'une activité télomérasique au sein des cellules germinales). Pour chaque série de coupes techniques le même contrôle positif a été systématiquement inclus. Seules les cellules ayant un noyau à fluorescence positive ont été considérés comme ayant une activité télomérasique.

Analyses statistiques

Les corrélations entre la présence d'une activité télomérasique et les principales caractéristiques anatomopathologiques (stade et grade) des tumeurs de vessie ont été évaluées par le test du CHI² (différence significative pour p<0,05). Ce même test a été utilisé pour comparer la détection de l'activité télomérasique par les méthodes de TRAP et TRAP in situ. Les moyennes des niveaux d'expression relatifs au gène hTERT ont été comparées pour des groupes de tumeurs de stade ou de grade différent en utilisant le test de Mann-Whitney U-test.

RESULTATS

L'activité télomérasique a été positive pour 15 des 29 carcinomes de vessie (52 %) ; les 3 échantillons provenant de vessies normales étaient négatifs (Tableau I). L'activité télomérasique est corrélée de manière significative avec le grade histologique ($p = 0,042$), mais aucune corrélation n'a été retrouvée entre l'activité télomérasique et le stade histologique (Tableau III).

Expression du gène hTERT par RT-PCR quantitative

L'ARNm hTERT a été détecté dans la totalité des échantillons tumoraux inclus dans l'étude. Parmi ces tumeurs, des différences majeures dans les niveaux d'expression relatifs du gène hTERT ont été observées (de 1,0 à 365,5).

- 18 tumeurs avaient un niveau haut d'ARNm hTERT (> 10) et ont été considérées comme surexprimant le gène hTERT.

- 11 tumeurs avaient des taux bas d'ARNm hTERT (< 10).

- Les 3 tissus provenant de vessies normales avaient un taux d'ARNm hTERT très bas, simplement détectable par RT-PCR. Sur ces échantillons de vessies normales, le taux d'ARNm hTERT était nettement inférieur à celui du taux de la plus faible expression de la tumeur T9 du tableau I.

Les relations entre les variables histo-pathologiques de ces tumeurs de vessie et le taux d'ARNm hTERT ont été étudiées sur le tableau III. Le taux moyen d'expression de l'ARNm hTERT dans les 13 tumeurs de bas grade, était nettement inférieur à celui des 16 tumeurs de haut grade (grade 3). De la même manière, la valeur de hTERT dans les 16 carcinomes superficiels de vessie (pTa/pT1) était significativement inférieure aux 13 tumeurs avec invasion musculaire (pT2/pT3/pT4). La corrélation entre l'activité télomérasique et le taux d'expression d'ARNm hTERT a été excellent : sur les 11 tumeurs avec une faible expression hTERT, 10 avaient un TRAP négatif ; sur les 18 patients qui avaient un hTERT, 14 avaient un TRAP positif ($p < 0,001$).

Détection de l'activité télomérasique par TRAP in situ

La technique du TRAP in situ a été réalisée sur les 5 tumeurs où il y avait une discordance entre les 2 méthodes (TRAP et hTERT), sur le cas contrôle (T21) et sur les échantillons de vessies normales (Tableau I).

Sur les 5 cas de tumeurs à expression discordante, 4 (T8, T13, T19, T25) avaient un haut taux d'ARNm hTERT (> 10) associé à une absence de détection de

l'activité télomérasique par la méthode TRAP. Un cas (T26) avait une faible expression hTERT (< 10) avec une activité télomérasique positive par la méthode TRAP. L'activité télomérasique a été détectée par la méthode TRAP in situ dans les 4 premiers cas (T8, T13, T19, T25). Cette expression a été révélée par une fluorescence nucléaire dans les cellules épithéliales malignes (Figures 1 et 2). A l'opposé, aucune activité n'a été décelée dans le cas T26 où il y avait une faible expression de l'ARNm hTERT avec un TRAP positif. L'évaluation semi-quantitative du pourcentage de cellules positives a donné les résultats suivants : 1 cas avec une expression $> 50\%$, 1 cas entre 10 et 50%, 2 cas $< 10\%$ de cellules positives.

Aucun marquage nucléaire n'a été retrouvé sur les cellules urothéliales normales. Dans les cellules du stroma, un signal nucléaire a été retrouvé sur quelques lymphocytes, dans la vessie normale et dans les tissus carcinomateux; les résultats sont synthétisés sur le Tableau I.

DISCUSSION

Dans cette étude, en utilisant la méthode TRAP, l'activité télomérasique a été mise en évidence pour 15 des 29 tumeurs de vessie, mais n'a jamais été notée sur les prélèvements de vessies normales. Parallèlement, sur l'ensemble des échantillons tumoraux, cette activité télomérasique a toujours été retrouvée (à des taux variables) par détection de l'ARNm hTERT. La sensibilité de la méthode TRAP dans ce travail a donc été de 52% ce qui est nettement inférieure à celle rapportée dans la littérature. En effet, la sensibilité de la méthode TRAP varie entre 78 et 100% [5, 14, 12, 20]. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces différences.

- La première est que les kits TRAP peuvent varier d'une étude à l'autre. Certaines équipes utilisent des variantes commerciales de la méthode TRAP avec des amorces tantôt marquées avec des radio-isotopes, tantôt avec des fluoro-chromes, et parfois avec détection des produits d'élongation secondairement amplifiés par migration sur gel d'électrophorèse [14, 6, 15, 18]. De même, d'autres équipes ont utilisé des seuils de positivité différents [23, 20, 18]. La seule équipe qui a travaillé avec les mêmes seuils et la même technique a observé une sensibilité plus proche de celle de notre étude (78%), il s'agissait d'une petite série de 14 carcinomes vésicaux [12].

- Les différences de sensibilité peuvent également être dues aux différences entre les populations de tumeurs de vessie étudiées, en particulier la distribution histologique en stade et en grade des tumeurs de vessie étudiées sont souvent très différentes d'une étude à l'autre.

- Plusieurs études ont également souligné la présence

Tableau I : Mesure de l'activité télomérasique par les méthodes TRAP, TRAP in-situ et hTERT par RT-PCR quantitative (ARNm), dans les tumeurs de vessie et dans la vessie normale.

Cas	Histologie ^a	Grade	Stade	TRAP	TRAP in situ	hTERT
Tumeur de vessie						
T1	Epi	G3	pT3	+		12.2
T2	TCC	G1	pTa	+		10.2
T3	TCC	G3	pT2	-		2.2
T4	TCC	G3	pT1	+		56.3
T5	TCC	G1	pTa	-		1.8
T6	TCC	G2	pT1	+		58.0
T7	TCC	G3	pT4	+		49.7
T8	TCC	G3	pT2	-	++	104.6
T9	TCC	G1	pTa	-		1.0
T10	TCC	G3	pT3	+		160.8
T11	TCC	G3	pT4	+		56.3
T12	TCC	G1	pTa	-		9.7
T13	TCC	G1	pTa	-	+	27.5
T14	TCC	G3	pT2	+		127.5
T15	TCC	G3	pT1	+		21.6
T16	TCC	G1	pTa	-		7.6
T17	TCC	G1	pTa	-		7.8
T18	TCC	G3	pT4	+		41.9
T19	TCC	G3	pT2	-	+	320.4
T20	TCC	G1	pTa	-		7.5
T21	TCC	G2	pTa	+	+++	184.7
T22	TCC	G3	pTa	+		55.9
T23	Adeno	G3	pT3	-		6.4
T24	TCC	G1	pTa	-		3.1
T25	TCC	G3	pT2	-	+++	92.2
T26	TCC	G2	pTa	+	-	2.5
T27	TCC	G1	pTa	-		2.5
T28	TCC	G3	pT3	+		33.6
T29	TCC	G3	pT2	+		365.5
Vessie normale						
N1				-	-	Neg
N2				-	-	Neg
N3				-	-	Neg

^a TCC, carcinome transitionnel de vessie ; Adeno, adenocarcinome ; Epi, carcinome épidermoïde

Tableau II. Amorce et sonde des séquences d'oligonucléotide utilisées.

Gene	Amorce et sonde	Taille de la séquence cible (paires de bases)	Sequence
RPLPO	- Sens - Antisens - Sonde	149	5'-GGCGACCTGGAAGTCCAACCT-3' 5'-CCATCAGCACCACAGCCTTC-3' 5'-ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA-3'
hTERT	- Sens -Antisens - Sonde	95	5'-TGACACCTCACCTCACCCAC-3' 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTTCAC-3' 5' ACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG-3'

Tableau III Relation entre l'activité télomérasique (TA), le taux moyen hTERT et le stade/grade histopathologique.

	Grade 1/2	Grade 3	pTa/pT1	pT2/pT3/pT4
TA +	4	11	7	8
TA -	9	5	9	5
p*	0,042			
Taux moyen hTERT	24,92	94,19	28,6	105,6
p§	0,005		0,015	

* : χ^2

§ Mann-Whitney U-test. NS, non significatif.

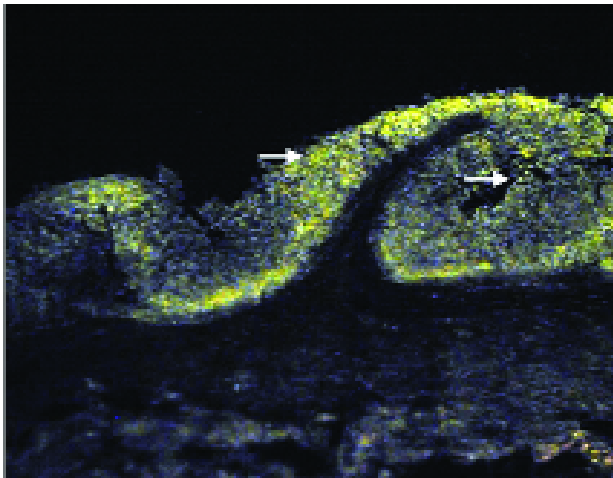
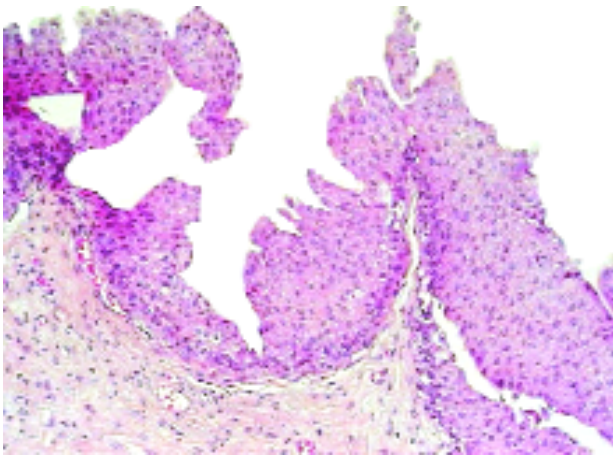


Figure 1. Tumeur urothéliale superficielle (pTaG1) :
a- tumeur urothéliale coloration HES (hematoxylin et eosine-saffron, x 25) **b-** intense positivité nucléaire et/ou cytoplasmique des cellules tumorales par méthode TRAP in situ.

possible d'inhibiteurs de PCR et notamment de la Taq polymérase au sein d'échantillons tissulaires. Plusieurs auteurs ont montré qu'un excès de protéines pouvait interférer avec l'amplification par PCR [8, 25].

Comme plusieurs auteurs l'avaient déjà montré avec la méthode TRAP [6, 15, 26], aucune activité télomérasique n'a été retrouvée sur les échantillons de vessies normales. Seule cette activité est retrouvée sur les cellules épithéliales tumorales qui en témoignent par leur accroissement illimité. Parallèlement, nous avons détecté de l'ARNm hTERT par RT-PCR quantitative dans 100% des échantillons tumoraux avec des niveaux d'expression relativement variables selon les échantillons. Ce taux d'ARNm hTERT était détectable mais infime pour les échantillons de vessie saine et s'accroissait proportionnellement au stade et au grade avec une bonne corrélation. Cette corrélation du taux d'ARNm hTERT avec le grade et le stade est en accord avec les précédentes études publiées avec une excellente sensibilité et spécificité [3, 24]. Si l'on compare les

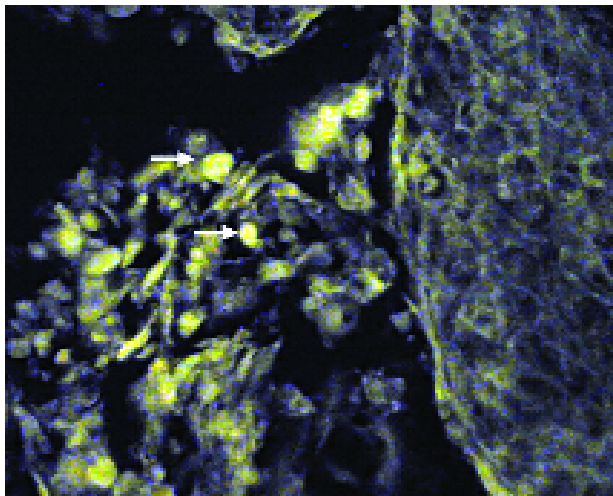
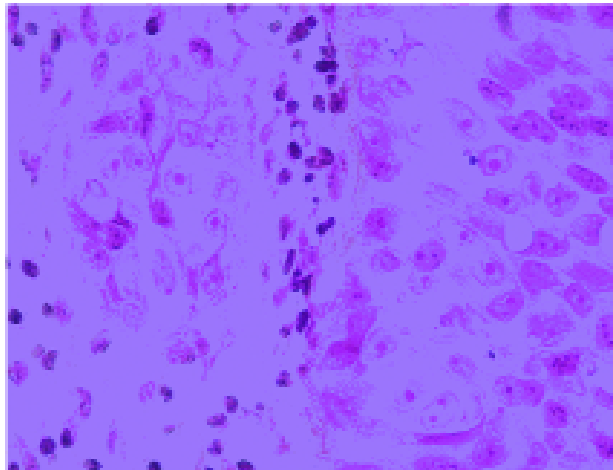


Figure 2. Tumeur urothéliale infiltrante (pT3 G3) a- tumeur urothéliale coloration HES (hematoxylin et eosine-saffron, x 400) **b-** intense positivité nucléaire des cellules tumorales par méthode TRAP in situ.

résultats des 2 méthodes : RT-PCR quantitative en temps réel et méthode TRAP, on observe une corrélation significative entre l'activité enzymatique et le taux d'ARNm hTERT exprimé dans les échantillons étudiés. Parmi tous ces échantillons, seulement 5 avaient des résultats discordants ; 4 étaient TRAP négatifs avec un haut taux de hTERT. Ces résultats ont permis de montrer une meilleure sensibilité de la méthode semi-quantitative par RT-PCR dans les tumeurs de vessie, par rapport à la méthode TRAP, généralement utilisée. La principale hypothèse pour expliquer les faux négatifs avec la méthode TRAP provient probablement de l'hétérogénéité de l'activité télomérasique dans les tissus carcinomateux, comme l'ont suggéré précédemment MAYFIELD et al [18]. En fait, le TRAP et la méthode semi-quantitative par RT-PCR ont été utilisés sur des broyats cellulaires et testent une population hétérogène de cellules malignes mélangées avec des cellules normales. Afin de confirmer cette hypothèse nous

avons appliqué le méthode TRAP in situ sur les 5 tumeurs dont les résultats étaient discordants entre ces 2 méthodes. Cela a permis une étude topographique de l'activité télomérasique. L'activité télomérasique in situ était concordante avec le taux d'ARNm hTERT par la méthode RT-PCR en temps réel, alors qu'elle était discordante avec la méthode TRAP. A notre connaissance, seulement 3 séries publiées précédemment ont validé cette méthode in situ sur des matériels cytologiques [21, 2, 22]. OHYASHIKI et al [22] ont montré que l'avantage de cette méthode in situ par rapport à la méthode TRAP traditionnelle était de détecter des faibles populations de cellules tumorales. Dans notre étude, l'évaluation semi-quantitative du nombre de cellules positives a montré une importante hétérogénéité dans les signaux exprimés par les différentes cellules tumorales. Ainsi, un telle hétérogénéité peut partiellement expliquer les 4 cas discordants (TRAP négatifs et TRAP in situ positifs). Cette hétérogénéité peut contribuer à augmenter le nombre de faux négatifs avec la méthode TRAP. Pour certains, l'expression de la télomérase peut également ne pas être uniforme dans les clones de populations cellulaires et certains pensent que l'activité télomérasique peut varier en type "on" ou "off" [21].

La technique de RT-PCR en temps réel a montré une très bonne corrélation avec toutes les variables histopathologiques, alors que la méthode TRAP n'est corrélée qu'au grade cytologique. A notre connaissance, seules deux études avaient rapporté des résultats semblables [3, 15]. Ceux-ci suggèrent que la progression tumorale dans les cancers de vessie est associée à un taux accru d'expression du gène hTERT.

Cette étude a montré que la détection de l'ARNm hTERT par RT-PCR permettait d'obtenir une excellente sensibilité et spécificité de diagnostic des cellules tumorales dans le tissu vésical. Elle ouvre le chemin à des applications cliniques prochaines et surtout permet d'espérer une étude de l'activité télomérasique sur les cellules exfoliées dans les urines (cytologie). En particulier, l'analyse en TRAP in-situ associée à l'étude par RT-PCR en temps réel sur la cytologie urinaire pourrait être évaluée comme marqueur diagnostique. Si une bonne sensibilité est retrouvée et si les coûts économiques de cette technique diminuent, elle pourrait être proposée comme marqueur diagnostique en particulier dans le dépistage des récidives tumorales. Sur le plan pronostique, l'expression du gène hTERT pourrait également être étudiée comme marqueur de la progression tumorale. Toutes ces études devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation et la régulation de la télomérase, ce qui permettrait d'améliorer l'approche thérapeutique avec des inhibiteurs de la télomérase.

REFERENCES

1. BIECHE I., NOGUES C., PARADIS V., OLIVI M., BEDOSSA P., LIDEREAU R. ET AL. : Quantification of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin. Cancer Res.*, 2000 ; 6 : 452-459.
2. DEJMEK A., YAHATA N., OHYASHIKI K., EBIHARA Y., KAKIHANA M., HIRANO T. ET AL. : In situ telomerase activity in pleural effusions : a promising marker for malignancy. *Diagn. Cytopathol.*, 2000 ; 24 : 11-15.
3. DE KOK J.B., SCHALKEN J.A., AALDERS T.W., RUERS T.J.M., WILLEMS H.L., SWINKELS D.W. : Quantitative measurement of telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in urothelial cell carcinomas. *Int. J. Cancer*, 2000 ; 87 : 217-220.
4. FERLAY J., BRAY F., PISANI P., PARKIN D.M. : GLOBOCAN 2000 : Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. IARC Cancerbase No.5. Lyon, IARC Press, 2001.
5. GELMINI S., CRISCI A., SALVADORI B., PAZZAGLI M., SELLIC., ORLANDO C. : Comparison of telomerase activity in bladder carcinoma and exfoliated cells collected in urine and bladder washings, using a quantitative assay. *Clin. Cancer Res.*, 2000 ; 6 : 2771-2776.
6. HEINE B., HUMMEL M., MÜLLER M., HEICAPPELL R., MILLER K., STEIN H. : Non-radioactive measurement of telomerase activity in human bladder cancer, bladder washings, and in urine. *J. Pathol.*, 1998 ; 184 : 71-76.
7. HISATOMI H., NAGAO K., KANAMARU T., END H., TOMIMATSU M., HIKIJI K. : Levels of telomerase catalytic subunit mRNA as a predictor of potential malignancy. *Int. J. Oncol.*, 1999 ; 14 : 727-732.
8. HOU M., XU D., BJÖRKHOLM M., GRUBER A. : Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. *Clin. Chem.*, 2001 ; 47 : 519-524.
9. ITO H., KYO S., KANAYA T., TAKAKURA M., KOSHIDA K., NAMIKI M. ET AL. : Detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA in voided urine samples as a useful diagnostic tool for bladder cancer. *Clin. Cancer Research*, 1998 ; 4 : 2807-2810.
10. KAUSCH I., BÖHLE A. : Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur. Urol.*, 2002 ; 41 : 15-29.
11. KIM N.W., PIATYSZEK M.A., PROWSE K.R., HARLEY C.B., WEST M.D., HO P.L.C. ET AL. : Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994 ; 266 : 2011-2015.
12. LANCELIN F., ANIDJAR M., VILETTE J.M., SOLIMAN A., TEILLAC P., LE DUC A. ET AL. : Telomerase activity as a potential marker in preneoplastic bladder lesions. *B.J.U. Int.* 2000 ; 85 : 526-531.
13. LEBRET T., BECETTE V., HERVE J.M., MOLINIE V., BARRE P., LUGAGNE P.M. ET AL. : Prognostic value of MIB-1 antibody labeling index to predict response to bacillus Calmette-Guérin therapy in a high-risk selected population of patients with stage T1 grade G3 bladder cancer. *Eur. Urol.*, 2000 ; 37 : 654-659.
14. LEE D.H., YANG S.C., HONG S.J., CHUNG B.H., KIM I.Y. : Telomerase : a potential marker of bladder transitional cell carcinoma in bladder washes. *Clin. Cancer Res.*, 1998 ; 4 : 535-538.
15. LIN Y., MIYAMOTO H., FUJINAMI K., UEMURA H., HOSAKA M., IWASAKI Y. ET AL. : Telomerase activity in human bladder cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1996 ; 2 : 929-932.

16. LINN J.F., LANGO M., HALACHMI S., SCHOENBERG M.P., SIDRANSKY D. : Microsatellite analysis and telomerase activity in archived tissue and urine samples of bladder cancer patients. *Int. J. Cancer*, 1997 ; 74 : 625-629.
17. MATHON N.F., LLOYD A.C. : Cell senescence and cancer. *Nature*, 2001 ; 1 : 203-213.
18. MAYFIELD M.P., SHAH T., FLANNIGAN G.M., HAMILTON STEWART P.A., BIBBY M.C. : Telomerase activity in malignant and benign bladder conditions. *Int. J. Mol. Med.*, 1998 ; 1 : 835-840.
19. MOSTOFI F.K., DAVID C., SESTERHENN I. : Histologic typing of urinary bladder tumors. World health organization. Berlin : Springer-Verlag (1999).
20. MULLER M., KRAUSE H., HEICAPPELL R., TISCHENDORF J., SHAY J.W., MILLER K. : Comparison of human telomerase RNA and telomerase activity in urine for diagnosis of bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* 1998 ; 4 : 1949-1954.
21. OHYASHIKI K., OHYASHIKI J.H., NISHIMAKI J., TOYAMA K., EBIHARA Y., KATO H. ET AL. : Cytological detection of telomerase activity using an in situ telomeric repeat amplification protocol assay. *Cancer Res.*, 1997 ; 57 : 2100-2103.
22. OHYASHIKI K., YAHATA N., OHYASHIKI J., IWAMA H., HAYASHI S., ANDO K. ET AL. : A combination of semiquantitative telomerase assay and in-cell telomerase activity measurement using exfoliated urothelial cells for detection of urothelial neoplasia. *Cancer*, 1998 ; 83 : 2554-2560.
23. RAHAT M.A., LAHAT N., GAZAWI H., RESNICK M.B., SOVA Y., BEN-ARI G. ET AL. : Telomerase activity in patients with transitional cell carcinoma. A preliminary study. *Cancer*, 1999 ; 85 : 919-924.
24. SUZUKI T., SUZUKI Y., FUJIOKA T. : Expression of the catalytic subunit associated with telomerase gene in human urinary bladder cancer. *J. Urol.*, 1999 ; 162 : 2217-2220.
25. WU Y-Y., HRUSZKEWYCZ A.M., DELGADO R.M., YANG A., VORTMEYER A.O., MOON Y-W. ET AL. : Limitations on the quantitative determination of telomerase activity by the electrophoretic and ELISA based TRAP assays. *Clin. Chim. Acta*, 2000 ; 293 : 199-212.
26. YOSHIDA K., SUGINO T., TAHARA H., WOODMAN A., BOLODEOKU J., NARGUND V. ET AL. : Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer*, 1997 ; 79 : 362-369.

SUMMARY

Semiquantitative in situ detection of telomerase activity and quantification of hTERT subunit expression in bladder tumours.

Objectives: Several studies have reported the important role played by telomerase, an enzyme which maintains the length of telomeres, during carcinogenesis. The objective of this study was to detect telomerase activity by semiquantitative in situ methods and to quantify expression of the hTERT subunit in a group of bladder cancers in order to assess its diagnostic and prognostic value.

Material and Methods: Telomerase activity (TA) was detected by the TRAP method ("telomeric repeat amplification protocol") on a series of 29 bladder cancers and 3 samples of healthy mucosa. Levels of expression of the hTERT gene were studied by real-time quantitative RT-PCR. In situ detection of TA was performed by using the same kit as the TRAP method, applied to frozen tissue sections exclusively for cases with discordant results between TA detection and hTERT mRNA.

Results: TA was detected by TRAP in 15 of the 29 bladder cancers. hTERT mRNA was detected and quantified in all tumour samples. A significant correlation was observed between TA and the level of hTERT mRNA expression. In situ detection of TA demonstrated heterogeneous TA in tumour tissue. A significant correlation was observed between the level of hTERT mRNA expression and tumour histological grades and stages.

Conclusion: hTERT mRNA detection by real-time quantitative RT-PCR appears to be a sensitive method for the diagnosis of bladder cancer with a good correlation with tumour grade and stage. Quantitative evaluation of hTERT mRNA could therefore be a useful marker of tumour progression for the early diagnosis and follow-up of bladder cancers.

Key-Words: bladder cancer, telomerase, prognostic marker, diagnostic marker, bladder.