

> Le cancer de la vessie se présente sous deux formes différentes: la forme superficielle et la forme infiltrante. La forme superficielle se caractérise par une fréquence élevée de pertes (totales ou partielles) du chromosome 9, notamment du bras long. Ces observations suggèrent la présence de gènes suppresseurs de tumeur (GST) dans cette région. Nous présentons le gène *PATCHED*, localisé en position 9q22.3, déjà impliqué dans le carcinome basocellulaire de la peau, comme un GST potentiel dans le cancer superficiel de la vessie. <

## La voie de signalisation PATCHED/Sonic Hedgehog dans le cancer superficiel de la vessie

Hélène LaRue, Maryse Simoneau, Tahar O. Aboukassim, Patricia Lemieux, Johanne Girard, Sahar Hamed, Hélène Hovington, Lucie Jeannotte, Yves Fradet



Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, CHUQ-L'Hôtel-Dieu de Québec, 10, rue MacMahon, G1R 2J6 Québec, Canada. [yves.fradet@crhdq.ulaval.ca](mailto:yves.fradet@crhdq.ulaval.ca)

Le cancer de la vessie se situe au cinquième rang, en terme d'incidence, dans les sociétés occidentales. Son étiologie est principalement associée à la présence de produits carcinogènes dans l'environnement, notamment ceux de la fumée de cigarette et des émanations d'origine industrielle. Lors du diagnostic initial, 75 à 80 % des patients présentent un cancer superficiel papillaire (stade TA ou T1) et pour plus de 60% de ces patients, l'évolution sera marquée par des récives parfois fréquentes avec progression vers l'infiltration musculaire dans 10% des cas. Le reste des patients présentent un cancer d'emblée infiltrant (stade T2-T4) dérivant d'un carcinome *in situ* (CIS) de grade élevé et d'une dysplasie. Bien que la mortalité associée au cancer de la vessie soit due aux tumeurs infiltrantes, la morbidité provient principalement des tumeurs superficielles récidivantes et de leur traitement par résection transurétrale et chimiothérapie ou immunothérapie intravésicale.

### Anomalies du chromosome 9 dans le cancer de la vessie

Les différentes expressions cliniques des cancers de la vessie ont pu être associées à des voies moléculaires distinctes [1]. Alors que l'on retrouve souvent des

mutations du gène *p53* dans les CIS et les tumeurs infiltrantes, des anomalies du chromosome 9 sont fréquentes dans les tumeurs superficielles. Diverses études ont montré des pertes d'hétérozygotie (LOH, *loss of heterozygosity*) sur ce chromosome dans plus de la moitié des cancers de vessie et il s'agit souvent de l'unique altération génétique observée dans les tumeurs à un stade peu avancé. Ces données suggèrent la présence d'un ou plusieurs gènes suppresseur de tumeur (GST) sur le chromosome 9, intervenant dans les phases précoces de la cancérogenèse vésicale. Plusieurs études ont suggéré que les locus en 9p22-23, 9p21-22, 9p11-13, 9q12-13, 9q21-22, 9q31, 9q33 et 9q34 seraient susceptibles de porter des GST [1-4]. Lors d'une recherche de LOH au niveau de 28 marqueurs microsatellites du chromosome 9 dans 139 tumeurs initiales de stade TA ou T1, nous avons répertorié 67 tumeurs (48%) présentant une ou plusieurs LOH sur le chromosome 9, ce qui nous a conduit à proposer 4 locus au niveau du bras 9q, 9q22.3, 9q31-32, 9q33 et 9q34 comme étant des sites potentiels de GST [2]. Quelques GST candidats ont été associés à certains locus du chromosome 9 tels *CDKN2A* à 9p21,

*PATCHED* (*PTC*) à 9q12-31, *DBCCR1* à 9q32-33 et *TSC1* à 9q34 [1, 4]. La présence de LOH sur le chromosome 9 a de plus été associée à un risque élevé de récurrence [5] et nous avons observé que des patients porteurs des tumeurs superficielles contenant des délétions dans les régions 9ptr-p22, 9q22.3, 9q33 et 9q34 avaient une survie sans récurrence significativement plus courte que des patients dont les tumeurs étaient exemptes de délétions (Figure 1) [6], ce qui est compatible avec la présence de GST au niveau de ces locus.

Dans le but d'identifier le GST de la région 9q22.3, nous avons poursuivi notre cartographie du chromosome 9 en analysant 11 marqueurs microsatellites additionnels dans

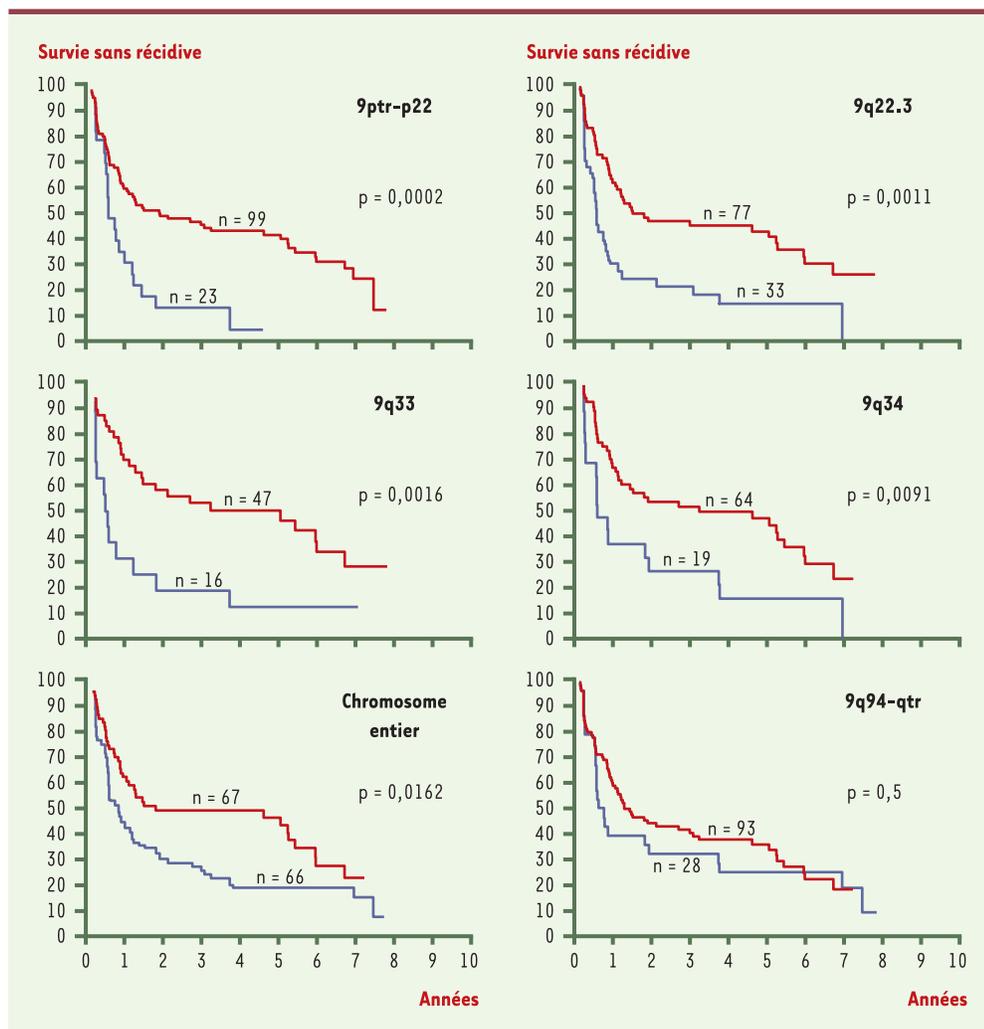
cette région, sur 139 tumeurs de stade peu avancé [7].

Cette étude a permis de définir une région minimale de délétion de 0,5Mb incluant, le gène *PTC*, candidat GST précédemment proposé. Dans 46% de l'ensemble des tumeurs analysées, nous avons observé la perte d'un marqueur microsatellite situé dans l'intron 1 du gène *PTC* [7]. Ces données nous ont conduit à proposer que *PTC* soit effectivement un GST candidat de la région 9q22.3 dont la délétion serait un événement précoce de la cancérogenèse vésicale.

### Voie de signalisation *PTC/Hedgehog* chez la drosophile

Le gène *PTC* humain est l'orthologue du gène *ptc* de la drosophile, d'abord identifié comme étant un gène important au cours du développement

embryonnaire [8]. Chez la mouche, le gène *ptc* joue un rôle dans l'élaboration de l'axe antéro-postérieur des embryons et dans la polarité des segments. Il code pour une protéine possédant 12 domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires et un domaine intracellulaire. Cette protéine agit comme récepteur de la protéine sécrétée *hedgehog* (*hh*) (Figure 2). En l'absence de *hh*, *ptc* inhibe la voie de signalisation en formant un complexe avec une seconde protéine membranaire, *smoothed* (*smo*), et en réprimant l'activité de cette dernière. D'autres protéines engagées dans cette voie de signalisation ont également été décrites chez la drosophile, la protéine *costal-2* (*cos-2*), la sérine-thréonine kinase *fused* (*fu*), le suppresseur de *fused* (*su[fu]*) et le facteur de transcription à doigts de zinc *cubitus interruptus* (*ci*). Ces protéines forment un complexe cytoplasmique lié aux microtubules. Lorsque la voie est inactive, *ci* subit un clivage qui libère un fragment amino-termi-



**Figure 1.** Analyse de survie sans récurrence par la méthode de Kaplan-Meier, selon la présence de délétions dans les régions 9ptr-p22, 9q22.3, 9q33, 9q34 et 9q34-qtr et pour le chromosome 9 entier. La présence de délétions de marqueurs microsatellites est associée à un risque plus élevé de récurrence dans les régions susceptibles de porter des GST bien qu'on ne retrouve aucune association ailleurs sur le chromosome (9q34-qtr). Le nombre de tumeurs dans chaque catégorie est indiqué au-dessus de la courbe; les cas non informatifs sont exclus de cette analyse. En bleu: courbe de survie avec LOH; en rouge: courbe de survie sans LOH (d'après [6]).

nal de 75 kDa. Ce fragment pénètre dans le noyau où il agit comme répresseur transcriptionnel. La liaison de hh à ptc libère smo, ce qui entraîne une dissociation du complexe cytoplasmique et l'inhibition du clivage de ci. La protéine ci intacte subit alors une maturation qui la transforme en un activateur transcriptionnel labile de divers gènes dont *ptc*, *decapentaplegic (dpp)*, un membre de la famille TGF $\beta$ , et *wingless (wg)*, orthologue des gènes *Wnt* des vertébrés [9].

### Voie de signalisation PTC/SHH chez les vertébrés

Des homologues de plusieurs membres de cette voie ont été identifiés chez les vertébrés où celle-ci, bien que présentant un niveau plus élevé de complexité, semble fonctionner de façon similaire à celle de la drosophile [10, 11]. Deux homologues de *ptc*, PTC1 et PTC2, ont été décrits comme pouvant tous les deux interagir avec HH et smo [9, 11]. Cependant, bien que PTC1, dont le gène est situé sur le chromosome 9, soit bien caractérisé, on connaît peu le rôle de PTC2. Trois homologues de hh ont également été identifiés, *Sonic (SHH)*, *Indian (IHH)* et *Desert (DHH) Hedgehog* [9]. Ces trois ligands utilisent la même voie de signalisation. Un seul homologue de smo a été identifié jusqu'à présent, mais trois facteurs de transcription à doigts de zinc, GLI-1, GLI-2 et GLI-3 occupent la position de ci [8, 12]. GLI-1 semble agir essentiellement comme activateur et serait le principal effecteur transcriptionnel de cette voie tandis que GLI-2 et GLI-3 possèdent des domaines activateurs et répresseurs de la transcription et sont modifiées par clivage protéolytique comme ci. Cependant, des incertitudes importantes subsistent quant à la transduction du signal SHH par les protéines GLI et la plupart des études suggèrent un équilibre complexe entre des fonctions divergentes. Une seule protéine cytoplasmique agissant en amont de GLI, l'homologue de *su(fu)*, a été identifiée dans des cellules humaines [11].

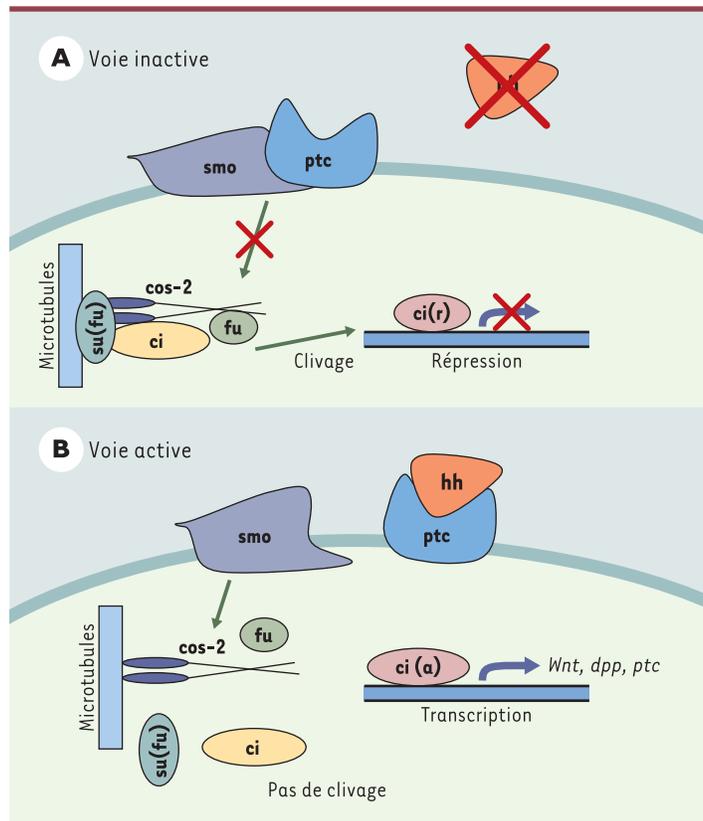
### Voie de signalisation PTC/SHH et prolifération cellulaire

Bien que les mécanismes sous-jacents au fonctionnement de la voie PTC/SHH demeurent encore mal compris, il apparaît que son activation se traduit principalement par une prolifération accrue. Le haut degré de conservation de cette voie chez la drosophile et les vertébrés permet de supposer que l'activation de la prolifération implique la participation des membres des familles TGF $\beta$  et WNT, ces dernières possédant un large spectre de fonctions. De plus, des données récentes ont permis d'établir un lien direct entre l'activation par hh et l'augmentation de la transcription des cyclines D et E, pro-

téines directement engagées dans l'activation du cycle cellulaire [13]. Enfin, la transfection de cellules rénales de rat avec le gène *Gli-1* entraîne des modifications du profil génique compatibles avec un accroissement de la prolifération par des voies diverses comme l'augmentation de la division cellulaire, la diminution de l'adhérence cellulaire et de l'apoptose. Des sites de reconnaissance de la protéine Gli-1 dans le promoteur d'au moins quatre des gènes modulés (cycline D2, IGFBP-6, osteopontine et plakoglobine) ont pu être identifiés [14].

### Voie de signalisation PTC/SHH et cancer

Le rôle du gène *PTC* en tant que GST a été initialement démontré pour le carcinome basocellulaire de la peau [9]. En effet, des mutations du gène *PTC* sont fréquem-



**Figure 2. Modèle proposé pour la voie de signalisation *ptc/hh* chez la drosophile, d'après les données les plus récentes.** **A.** La voie est inactive lorsque *ptc* (*Patched*) se lie à la protéine *smo* (*smoothened*) et en inhibe l'activité. Un complexe de protéines cytoplasmiques liées aux microtubules amène le clivage de *ci* (facteur de transcription *cubitus interruptus*) en un répresseur transcriptionnel qui exerce son action dans le noyau. **B.** Voie active: la liaison du ligand *hh* (*hedgehog*) à *ptc* libère *smo* de l'action répressive de cette dernière, ce qui entraîne la dissociation du complexe cytoplasmique. *ci* ne subit pas de clivage et agit comme activateur de la transcription de divers gènes dont *ptc* lui-même. *cos-2*: protéine costal-2; *fu*: sérine-thréonine kinase *fused*; *su(fu)*: suppresseur de *fused*.

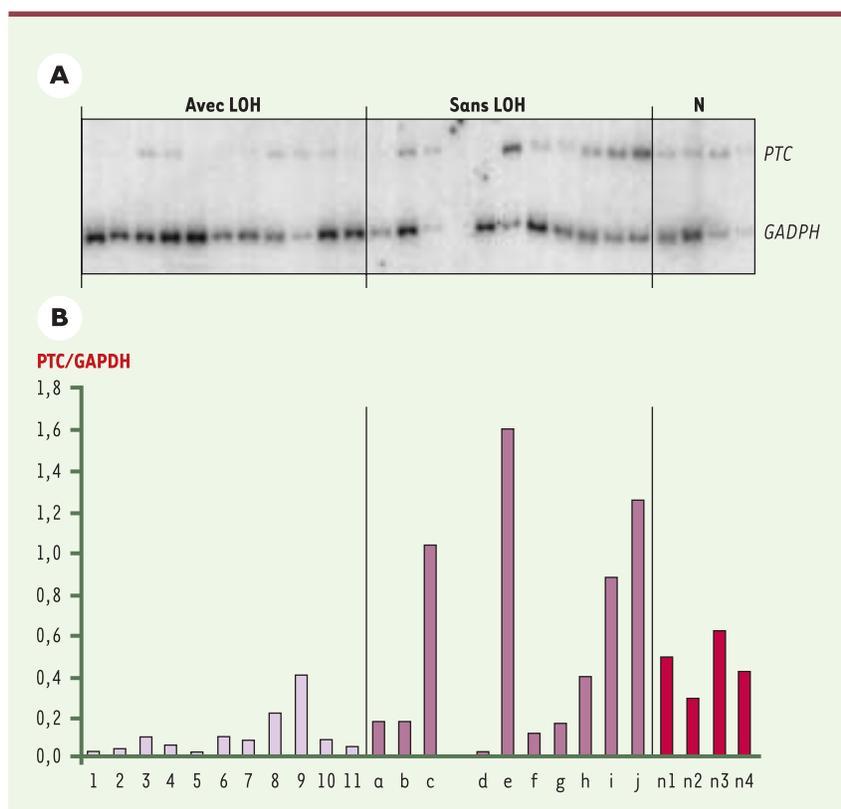
ment détectées, tant pour la forme familiale que pour la forme sporadique de ces carcinomes. En outre, comme pour les tumeurs superficielles de la vessie, on observe une perte d'hétérozygotie de marqueurs du locus *PTC* dans la région 9q dans environ 50% des carcinomes basocellulaires. La surexpression de *GLI-1*, ainsi que la présence de mutations dans les gènes *SHH* ou *Smo* peuvent aussi induire un carcinome basocellulaire, suggérant que toute anomalie menant à une surexpression de *GLI-1* dans des cellules de la couche basale de la peau peut induire un carcinome [8, 9]. La capacité de *GLI-1* à transformer des cellules en coopération avec le gène *E1A* de l'adénovirus a d'ailleurs confirmé sa nature oncogénique [12]. Des mutations des gènes *PTC* et *Smo* ont également été identifiées dans des médulloblastomes et des tumeurs primitives neuroectodermes [8]. Finalement, des souris porteuses d'un allèle inac-

tivé du gène *Ptc* développent fréquemment des rhabdomyosarcomes [8].

### Voie de signalisation PTC/SHH et cancer de la vessie

Il semble donc bien établi que des altérations de la voie PTC/SHH peuvent induire divers cancers. Les délétions fréquentes observées au locus 9q22 dans des tumeurs de la vessie par diverses équipes, dont la nôtre, amènent naturellement à suspecter le gène *PTC* comme un élément clé dans la progression conduisant au cancer de la vessie. Afin de vérifier cette hypothèse, la présence de mutations dans le gène *PTC* a été recherchée dans des tumeurs de la vessie. McGarvey *et al.* ont détecté des mutations du locus *PTC* dans deux tumeurs infiltrantes sur 54 tumeurs analysées [15]. Par ailleurs, dans cette étude, l'expression des gènes *PTC*, *Smo* et *GLI-3* dans l'urothélium normal et dans des

lignées cellulaires vésicales a permis de conclure que la voie PTC/SHH pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la prolifération urothéliale et contribuerait à la genèse d'au moins un sous-groupe de carcinomes transitionnels de la vessie. En revanche, aucune mutation n'a été trouvée dans trois autres études [16-18]. Étant donné que le modèle initialement admis pour un GST suppose l'inactivation des deux allèles du gène, souvent par délétion d'une copie et mutation de l'autre, nous avons séquencé l'ADNc de 15 tumeurs TA ou T1 ayant perdu un allèle de *PTC*, sans trouver la moindre mutation [7]. La perte d'une copie d'un GST sans altération de l'autre copie ou haploinsuffisance, a été récemment rapportée comme suffisante pour promouvoir le cancer. Diverses études ont, en effet, rapporté l'haploinsuffisance du gène *PTEN* dans le carcinome rénal à cellules claires [19], du gène *SMAD4* dans des cancers gastriques [20], du gène *p27* dans divers cancers [21] et du gène *PTC* lors de l'induction de médulloblastome chez la souris [22]. Nous avons analysé l'expression du gène *PTC* par la technique de RT-PCR semi-quantitative dans 21 tumeurs superficielles de la vessie et 4 échantillons d'urothélium normal humain et avons observé une diminution significative de l'expression de ce gène dans les tumeurs ayant perdu une copie de *PTC* par rapport



**Figure 3.** Analyse de l'expression du gène *PTC* dans des tumeurs vésicales avec perte d'hétérozygotie (LOH) du marqueur *PTC*, sans LOH détectée sur le chromosome 9, et dans des urothéliums normaux (N). L'expression du gène a été analysée par la technique de RT-PCR semi-quantitative en présence d'un précurseur radioactif. **A.** Photographie d'un gel d'électrophorèse montrant la migration des fragments amplifiés pour le gène *PTC* et pour un gène témoin (glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH)). **B.** Histogramme montrant le rapport de l'intensité des bandes obtenues pour *PTC* et *GAPDH* pour les divers échantillons analysés (d'après [7]). On observe une diminution significative de l'expression du gène dans les tumeurs ayant perdu une copie de *PTC*.

à son expression dans l'urothélium normal (Figure 3) [7]. Des fluctuations marquées de l'expression de *PTC* sont aussi constatées dans les tumeurs possédant les deux allèles de *PTC* suggérant que des mécanismes autre que l'haplo-insuffisance pourraient également contribuer à l'altération de l'expression de ce gène. Des données préliminaires suggèrent la diminution de l'expression d'autres gènes de la voie PTC/SHH.

## Conclusions

L'ensemble de ces données est compatible avec l'hypothèse de la perturbation de la voie de signalisation PTC/SHH au cours des phases précoces de la cancérogenèse vésicale, possiblement en rapport, dans environ la moitié des cas, avec la perte d'une copie du gène *PTC*. Les carcinomes basocellulaires de la peau et les carcinomes papillaires superficiels de la vessie partageant plusieurs caractéristiques comme une croissance locale, une induction par des carcinogènes environnementaux et un faible potentiel métastatique, il est plausible que des altérations génétiques semblables soient retrouvées dans ces deux types de cancers. Une

étude plus approfondie des mécanismes en cause permettra éventuellement l'élaboration de thérapies permettant de ralentir et même de bloquer la prolifération des cellules cancéreuses dans la vessie. ♦

## SUMMARY

### The PATCHED/Sonic Hedgehog signalling pathway in superficial bladder cancer

Superficial bladder cancer shows a high frequency of total or partial chromosome 9 losses. Loss of heterozygosity at position 9q22.3 is one of the most frequent and is associated with highly recurrent tumours. The *PATCHED* gene, ortholog of a gene first described in the drosophila as a segment polarity gene, is located at 9q22.3. It is a member of a signal transduction pathway and a tumour suppressor gene (TSG), involved in basal cell carcinoma. We propose *PATCHED* as a TSG candidate in superficial bladder cancer. ♦

## RÉFÉRENCES

- Knowles MA. The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application. *BJU Int* 1999; 84: 412-27.
- Simoneau M, Aboukassim TO, Larue H, Rousseau F, Fradet Y. Four tumor suppressor loci on chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two novel candidate regions at 9q22.3 and 9q31. *Oncogene* 1999; 18: 157-63.
- Czerniak B, Chaturvedi V, Li L, et al. Superimposed histologic and genetic mapping of chromosome 9 in progression of human urinary bladder neoplasia: implications for a genetic model of multistep urothelial carcinogenesis and early detection of urinary bladder cancer. *Oncogene* 1999; 18: 1185-96.
- Williams SV, Sibley KD, Davies AM, et al. Molecular genetic analysis of chromosome 9 candidate tumor-suppressor loci in bladder cancer cell lines. *Genes Chrom Cancer* 2002; 34: 86-96.
- Bartlett JMS, Watters AD, Ballantyne SA, Going JJ, Grigor KM, Cooke TG. Is chromosome 9 loss a marker of disease recurrence in transitional cell carcinoma of the urinary bladder? *Br J Cancer* 1998; 77: 2193-8.
- Simoneau M, Larue H, Aboukassim TO, Meyer F, Moore L, Fradet Y. Chromosome 9 deletions and recurrence of superficial bladder cancer: identification of four regions of prognostic interest. *Oncogene* 2000; 19: 6317-23.
- Aboukassim TO, Larue H, Lemieux P, Rousseau F, Fradet Y. Alteration of the *Patched* locus in superficial bladder cancer. *Oncogene* 2003; 22: 2967-71.
- Wicking C, Smyth I, Bale A. The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene* 1999; 18: 7844-51.
- Bale AE, Yu KP. The hedgehog pathway and basal cell carcinomas. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 757-62.
- Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse *patched* gene by Hedgehog. *Genes Dev* 1996; 10: 301-12.
- Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1047-54.
- Altaba A. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* 1999; 126: 3205-16.
- Duman-Scheel M, Weng L, Xin S, Du W. Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing cyclin D and cyclin E. *Nature* 2002; 417: 299-304.

