



Interactions entre les cellules tumorales et stromales dans le microenvironnement du cancer de la vessie

Thèse

Cassandra Ringuette Goulet

Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

**Interactions entre les cellules tumorales et
stromales dans le microenvironnement du cancer
de la vessie**

Thèse

Cassandra Ringuette Goulet

Sous la direction de :

Stéphane Bolduc, directeur de recherche
Frédéric Pouliot, codirecteur de recherche

Résumé

Les fibroblastes associés au cancer (CAF) constituent le type cellulaire le plus abondant du microenvironnement tumoral. *In vivo*, les tumeurs les plus agressives corrélerent avec un enrichissement en CAF et une matrice extracellulaire plus dense. En effet, les interactions dynamiques et réciproques entre les cellules cancéreuses et les CAF favoriseraient la progression tumorale. Cependant, les molécules impliquées dans ces interactions ainsi que leurs effets sur le devenir de la tumeur et sur le remodelage du microenvironnement sont mal connus. Or, mieux définir et comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans cette interaction est crucial afin de pouvoir développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, nous avons étudié les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales dans le microenvironnement du cancer de la vessie.

Les exosomes sont une classe de vésicules extracellulaires d'origine endocytaire de 30 à 200 nm de diamètre. Ils sont sécrétés par tous les types cellulaires et constituent, entre autres, un moyen de communication intercellulaire en transportant protéines, lipides et ARN d'une cellule à l'autre. Les cellules cancéreuses sécrètent une grande quantité d'exosomes et ces derniers joueraient un rôle dans la modulation du microenvironnement tumoral, notamment en activant les fibroblastes sains en CAF.

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de démontrer que les exosomes sécrétés par les cellules cancéreuses sont internalisés par les fibroblastes vésicaux sains et qu'ils favorisent la prolifération de ces derniers. De plus, les exosomes dérivés de cellules cancéreuses activent les fibroblastes sains en CAF grâce au TGF β qu'ils contiennent. La neutralisation du TGF β par des anticorps spécifiques confirme ces résultats. Une fois activés, les CAF augmentent la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses via une sécrétion soutenue de la molécule IL-6. D'ailleurs, le blocage de la voie de signalisation de l'IL-6 renverse les effets observés sur les cellules cancéreuses. Nous avons également démontré que les CAF diminuent la sensibilité des cellules cancéreuses à la mitomycine C. Enfin, les CAF remodelent la matrice extracellulaire du microenvironnement tumoral notamment par une sécrétion accrue des protéines oncofœtales ténascine C et EDA-fibronectine, ainsi qu'une activité LOX-1 et MMP augmentée. Par ailleurs, la matrice extracellulaire générée par les CAF favorise la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules urothéliales saines en inhibant le marqueur épithélial E-cadhérine au profit du marqueur mésenchymateux N-cadhérine.

Ainsi, une communication étroite et complexe entre les cellules cancéreuses et les CAF favorise la progression tumorale. En sécrétant des facteurs solubles à activité pro-tumorale et des protéines de la matrice extracellulaire, les CAF favorisent la prolifération, l'invasion et la chimiorésistance des cellules cancéreuses. Globalement, nos travaux soutiennent l'idée que l'inhibition de la transdifférenciation des fibroblastes sains en CAF est une cible thérapeutique de choix dans le développement de nouveaux anticancéreux.

Abstract

Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are the most abundant cell type of the tumor microenvironment. *In vivo*, aggressive tumors correlate with an enrichment of CAFs and a denser extracellular matrix. Indeed, the dynamic and reciprocal interactions between tumor cells and CAFs promote tumor progression. However, the molecules involved in these interactions, as well as their effects on the fate of the tumor and the remodeling of the microenvironment are poorly known. However, better define and understand the molecular mechanisms of this interaction is crucial to develop new treatments. Thus, we studied interactions between tumor cells and stromal cells in the microenvironment of bladder cancer.

Exosomes are a class of extracellular vesicles with of endocytic origin measuring 30 to 200 nm in diameter. They are secreted by all types of cells and constitute, among others, a means of intercellular communication by transporting proteins, lipids and RNA from one cell to another. Cancer cells secrete a large amount of exosomes and these exert a role in the modulation of the tumor microenvironment, notably by activating healthy fibroblasts in CAFs.

The work presented in this thesis has demonstrated that the exosomes secreted by cancer cells are internalized by vesical fibroblasts and promote their proliferation. In addition, exosomes derived from cancer cells activate healthy fibroblasts in CAFs using the TGF β that they transport. The neutralization of TGF β by specific antibodies confirms these results. Once activated, CAFs increase the proliferation, migration and invasion of cancer cells via a sustained secretion of the IL-6 molecule. Moreover, the blocking the IL-6 signaling pathway reverses the effects observed in cancer cells. We have also demonstrated that CAFs decrease the sensitivity of cancer cells to mitomycin C. Finally, CAFs remodel the extracellular matrix of the tumor microenvironment notably by an increased secretion of tenascin C and EDA-fibronectin oncofetal proteins, as well as a LOX-1 and MMP increased activity. In addition, the extracellular matrix generated by CAFs promotes the epithelio-mesenchymal transition of healthy urothelial cells by inhibiting the epithelial marker E-cadherin in favor of the mesenchymal marker N-cadherin.

Thus, a close and complex communication between the cancer cells and the CAFs increases tumor progression. By secreting soluble factors with a pro-tumor activity and extracellular matrix proteins, CAFs promote the proliferation, invasion and

chemoresistance of cancer cells. Overall, our work supports the idea that the inhibition of the transdifferentiation of healthy fibroblasts into CAFs is a therapeutic target of choice in the development of novel anticancer drugs.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations	xi
Remerciements	xiv
Avant-propos	xvi
Chapitre 1 - Introduction.....	1
Le cancer : Vue d'ensemble	1
Le cancer de la vessie	2
Épidémiologie	2
Physiopathologie	3
Traitements.....	4
Le microenvironnement tumoral.....	5
Les cellules immunitaires	6
Les cellules vasculaires	9
Les cellules stromales	10
Les vésicules extracellulaires	11
La matrice extracellulaire	21
Le TGFβ.....	26
Les CAF.....	29
Origine et marqueurs.....	29
Activation des fibroblastes sains en CAF	32
Rôles des CAF dans le microenvironnement tumoral	33
Chapitre 2 - Problématique, hypothèses et objectifs de recherche.....	41
Chapitre 3 - Les exosomes issus de cellules cancéreuses induisent la différenciation des fibroblastes en CAF via la voie de signalisation du TGFβ.	43
Résumé	44
Abstract	46
Introduction.....	47
Materials and Methods	49
Results.....	54
Discussion.....	58
Acknowledgments	61
References	62
Figures	67

Chapitre 4 - Les CAF induisent l'EMT chez les cellules cancéreuses de la vessie via la signalisation IL-6	73
Résumé	74
Abstract	77
Background	78
Methods	80
Results	85
Discussion	89
Conclusion	92
List of abbreviations	93
Declarations	94
References	96
Figures	102
Additional files	108
Chapitre 5 - Les CAF altèrent la composition de la matrice extracellulaire et induisent l'EMT des cellules urothéliales saines dans un modèle vésical 3D	109
Résumé	110
Abstract	112
Introduction	113
Materials and Methods	115
Results	121
Discussion	124
Acknowledgments	126
References	127
Figures	132
Chapitre 6 - Discussion et conclusion.....	136
Les exosomes, un véhicule de communication pour les cellules cancéreuses.....	136
Le TGFβ au cœur de la différenciation des fibroblastes en CAF	138
Le CAF, architecte du microenvironnement tumoral	140
Exosomes, CAF, récurrence et métastases	142
Bibliographie	145
Annexe 1- Développement d'un modèle humain 3D de cancer de la vessie par génie tissulaire pour l'étude de la progression tumorale et la découverte de drogues.....	163
Annexe 2- Modélisation du cancer de la vessie	164
Annexe 3 - Différentes lignées cellulaires du cancer de la vessie adaptent leur profil d'agressivité à la tension de l'oxygène.....	165
Annexe 4 - Les exosomes sécrétés par les fibroblastes dans un tissu 3D généré par génie tissulaire	166

Annexe 5 - Cellules souches adipeuses - Une source optimale pour la régénération de la voie urinaire ? 167

Annexe 6 - Les défis cliniques dans la reconstruction urétrale par génie tissulaire . 168

Liste des figures

Figure 1.1 Classification du cancer de la vessie.	4
Figure 1.2 Mécanismes moléculaires de la biogenèse des exosomes.	13
Figure 1.3 Composition globale des vésicules extracellulaires (VE).	15
Figure 1.4 Biogenèse de l'exosome, de son internalisation et de la réponse cellulaire.	16
Figure 1.5 Vue d'ensemble de la signalisation canonique de TGF β .	28
Figure 1.6 Activation en plusieurs étapes des fibroblastes.	33
Figure 1.7 Les CAF et leur sécrétome remodelent le microenvironnement tumoral.	34
Figure 3.1 Bladder cancer-derived exosomes characterization.	67
Figure 3.2 Particle size distributions and concentration of isolated exosomes.	68
Figure 3.3 Cancer-derived exosomes penetrate into HF, drive their proliferation and induce CAF markers expression.	69
Figure 3.4 Bladder cancer cell-derived exosomes contain TGF β 1 which induce SMAD2 phosphorylation in HF.	70
Figure 3.5 Exosomal localization of TGF β .	71
Figure 4.1 Healthy vesical primary fibroblasts treated with bladder cancer-derived exosomes exhibit characteristics of CAFs.	102
Figure 4.2 CM from CAFs induces EMT programming in RT4 bladder cancer cells.	103
Figure 4.3 iCAFs express IL-6 and induce activation of STAT3 pathway in RT4 bladder cancer cells.	104
Figure 4.4 CAFs-derived IL-6 enhances survival and promotes migration and invasion in RT4 bladder cancer cells.	105
Figure 4.5 <i>IL6</i> mRNA expression is up-regulated in aggressive bladder cancer patient tumor specimens, correlates with CAF marker ACTA2 expression, and is associated with poor prognosis.	106
Figure 5.1 Altered ECM protein expression in iCAFs.	132
Figure 5.2 iCAFs-derived MMP expression and activity characterization.	133
Figure 5.3 The presence of iCAFs in stroma of 3D vesical models induces urothelial cells proliferation.	134
Figure 5.4 iCAFs-derived ECM promotes an EMT state in urothelial cells.	135

Liste des abréviations

2D	deux dimensions
3D	trois dimensions
α SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
BCG	bacille de Calmette-Guérin
CAF	fibroblaste associé au cancer
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CXCL12	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 12</i>
EGF	facteur de croissance épidermique
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	transition épithéliale-mésenchymateuse
ESCRT	<i>endosomal sorting complexes required for transport</i>
FAP	<i>fibroblast activation protein alpha</i>
FGF	facteur de croissance des fibroblastes
FSP1	<i>fibroblast-specific protein 1</i>
GAG	glycosaminoglycanes
HF	fibroblaste sain
HGF	facteur de croissance hépatocellulaire
iCAF	CAF induit
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
ILV	vésicule intra-luminale
LAP	<i>latency-associated protein</i>
LOX-1	lysyl oxidase 1
LTBP	<i>latency TGFβ binding protein</i>
MBV	corps multi-vésiculaires
MDSC	cellules suppressives dérivées de myéloïdes
MEC	matrice extracellulaire
MMP	métalloprotéinase matricielle
MSC	cellules souches mésenchymateuses
NO	oxyde nitrique
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGFR α	récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes alpha
PDGFR β	récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes bêta
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RTU	résection transurétrale
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TGF β	récepteur du TGF β
TNF α	<i>tumor necrosis factor</i>
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	récepteur du VEGF

*À Marie, Claude et Corinne,
qui ont malheureusement donné un visage au cancer.*

Remerciements

Entreprendre un doctorat nécessite forcément une certaine dose de naïveté qui, au fil des ans, se transforme en persévérance et détermination, des qualités essentielles pour achever des études doctorales. Ainsi, la thèse qui vous est présentée ici a pris forme au cours des quatre dernières années de travail acharné, de collaborations fructueuses et d'amitiés précieuses. En sciences, les honneurs sont souvent individuels, mais ils résultent d'un travail d'équipe. Cet accomplissement n'aurait pu se faire si ce n'était du travail concerté de plusieurs personnes que j'ai eu le privilège de côtoyer et j'aimerais profiter de ces lignes pour leur exprimer de sincères remerciements.

Je voudrais d'abord remercier mes directeurs, Dr Bolduc et Dr Pouliot, pour m'avoir accordé, dès les tous débuts, leur pleine confiance en me permettant de mener mes recherches avec une grande liberté. Cet espace a forgé mon autonomie et ma pensée critique pour me faire grandir scientifiquement. Je vous en serai éternellement reconnaissante.

La qualité d'un laboratoire est directement proportionnelle à celle de ses membres. Merci à Stéphane Chabaud pour toutes ces conversations enrichissantes, autant scientifiques que philosophiques. Ta façon de voir la science est singulière et tu m'as appris à ne pas me conforter dans les idées reçues, à toujours questionner le sens d'une découverte et à relativiser l'impact biologique réel d'un résultat. Merci à Geneviève Bernard pour ton aide précieuse au labo et également pour ton écoute dans les meilleurs comme dans les pires moments. L'expérience acquise à tes côtés a forgé en moi une volonté de bien faire les choses et une rigueur scientifique que je n'aurais pu développer autrement. À Stéphane et Geneviève, merci d'avoir offert votre soutien, avec cœur, à la science que j'ai produite, mais aussi à la scientifique que je suis devenue.

Plusieurs autres membres de l'équipe 'Uro' ont été des collègues dont j'ai eu beaucoup de plaisir à côtoyer. Merci à Amélie Morissette pour l'accueil chaleureux quand je suis arrivée, pour ton franc parler, pour ta disponibilité et pour ton flair à diagnostiquer une grossesse. Merci à Alexandre Rousseau de m'avoir légué ton précieux projet cancer, j'espère ne pas t'avoir déçu. Merci à Ingrid Saba pour ta générosité dans tes nombreux conseils professionnels et personnels. Merci à Weronika Jakubowska pour ta bonne humeur

contagieuse, tes histoires rocambolesques et ton impressionnante persévérance culinaire. Merci à mes stagiaires, Amélie Couture, Alexandre Langlois, Sarah Tremblay et Dominique Vandal d'avoir donné de la couleur à mes étés.

Certains collègues de laboratoire sont devenus de véritables amis. Isabelle Lorthoïs et Bastien Paré, merci d'avoir été là et d'avoir fait en sorte qu'il fût, même dans les moments plus difficiles, toujours agréable de venir au laboratoire. Une grande part du plaisir que j'ai eu à réaliser cette thèse vous est attribuable. À Isabelle, merci pour ton humour, ton écoute et tes conseils ; tu seras à tout jamais ma Française préférée. À Bastien, merci d'avoir été un partenaire de paillasse de si bonne compagnie ; tu m'as fait grandir scientifiquement et humainement. Surtout, merci de m'avoir toujours soutenue pour aller manger tôt le midi. Seule avec Isabelle, je serais certainement morte de faim plusieurs fois.

Quatre ans dans un laboratoire, c'est aussi beaucoup de moments passés avec des gens fantastiques. C'est beaucoup de bienvenues et autant d'aurevoirs. À tous mes collègues du LOEX, je vous dis merci.

Mes remerciements vont aussi à ma famille et mes amis qui, avec cette question récurrente, « quand est-ce que tu fini ? », bien qu'angoissante, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final. Merci à ma mère, pour m'avoir appris ce qu'est vraiment la persévérance. Merci à ma grand-mère, première scientifique que j'ai côtoyé, pour m'avoir enseigné, au travers le récit de sa vie, qu'il fut un temps où rien n'était facile et que dans la vie, ce sont les petits bonheurs que l'on apprécie le plus. Merci à Audrée, Anne, Doum et Marie-eve pour votre incroyable écoute et votre support indéfectible. Merci à Benoit, pour avoir pu supporter le fameux : « j'finis une manip, j'arrive dans 1 heure » et pour tout le reste. Enfin, merci à mes filles Jade et Zoé sans qui j'aurai eu du mal à décrocher. Vous m'avez permis de revoir mes priorités. Vous m'avez permis de m'ancrer dans ce qui est véritablement important dans la vie.

Bonne lecture !

Avant-propos

Les principaux résultats de cette thèse ont fait l'objet de publications dans des journaux avec comité de lecture. Ils seront donc présentés sous la forme de manuscrits scientifiques en trois chapitres, les chapitres 3, 4 et 5. Les trois articles, dont je suis la première auteure, sont reproduits avec l'autorisation des coauteurs et dans le respect des licences de diffusion.

Chapitre 3 : Les exosomes issus de cellules cancéreuses induisent la différenciation des fibroblastes en CAF via la voie de signalisation du TGF β .

Ce chapitre reproduit l'article *Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-associated Fibroblasts through TGF β Signaling* qui a été publié dans le journal *Molecular Cancer Research* (IF : 4,9) le 10 avril 2018.

Les auteurs de cet article sont **Cassandra Ringuette Goulet**, Geneviève Bernard, Sarah Tremblay, Stéphane Chabaud, Stéphane Bolduc & Frédéric Pouliot.

J'ai participé à la conception des expériences, à leur réalisation, à la conception des méthodes d'analyse, à l'analyse des résultats, à la conception et à la préparation des tableaux et des figures. J'ai rédigé l'ensemble de la première version du manuscrit et participé au peaufinage de la version finale. La participation de tous les coauteurs est explicitée dans l'article original.

Chapitre 4 : Les CAF induisent l'EMT chez les cellules cancéreuses de la vessie via la signalisation IL-6.

Ce chapitre reproduit l'article *Cancer-associated Fibroblasts Induce Epithelial-Mesenchymal Transition of Bladder Cancer Cells Through Paracrine IL-6 Signaling* qui a été publié journal *BMC Cancer* le 2 février 2019.

Les auteurs de cet article sont **Cassandra Ringuette Goulet**, Audrey Champagne, Geneviève Bernard, Dominique Vandal, Stéphane Chabaud, Frédéric Pouliot & Stéphane Bolduc.

J'ai participé à la conception des expériences, à leur réalisation, à la conception des méthodes d'analyse, à l'analyse des résultats, à la conception et à la préparation des tableaux et des figures. J'ai rédigé l'ensemble de la première version du manuscrit et participé au peaufinage de la version finale. La participation de tous les coauteurs est explicitée dans l'article original.

Chapitre 5 : Les CAF altèrent la composition de la matrice extracellulaire et induisent l'EMT des cellules urothéliales saines dans un modèle vésical 3D.

Ce chapitre reproduit le manuscrit *Cancer-associated fibroblast alters extracellular matrix composition and promotes EMT of urothelial cells in a 3D vesical model* qui a été soumis au journal *Carcinogenesis* le 15 août 2018.

Les auteurs de cet article sont **Cassandra Ringuette Goulet**, Geneviève Bernard, Stéphane Chabaud, Frédéric Pouliot & Stéphane Bolduc.

J'ai participé à la conception des expériences, à leur réalisation, à la conception des méthodes d'analyse, à l'analyse des résultats, à la conception et à la préparation des tableaux et des figures. J'ai rédigé l'ensemble de la première version du manuscrit et participé au peaufinage de la version finale. La participation de tous les coauteurs est explicitée dans l'article original.

Au cours de mes études doctorales, j'ai eu l'opportunité de prendre part à d'autres projets du laboratoire, ayant comme objectif d'approfondir la compréhension du rôle du microenvironnement tumoral, mais déviant du sujet précis de cette thèse (Annexes 1 à 3) ou encore des projets qui m'ont permis d'élargir mes connaissances en science (Annexes 4 à 6). Les résumés de ces articles sont présentés en annexe de cette thèse.

Annexe 1 : Développement d'un modèle humain 3D de cancer de la vessie par génie tissulaire pour l'étude de la progression tumorale et la découverte de drogues.

Cette annexe présente l'article *Tissue-engineered human 3D model of bladder cancer for invasion study and drug discovery* qui a été publié dans le journal *Biomaterials* (IF : 8,4) en août 2017.

Annexe 2 : Modélisation du cancer de la vessie.

Cette annexe présente la revue de littérature *Modeling human bladder cancer* qui a été publiée dans le journal *World Journal of Urology* (IF : 2,7) en mai 2018.

Annexe 3 : Différentes lignées cellulaires du cancer de la vessie adaptent leur profil d'agressivité à la tension de l'oxygène.

Cette annexe présente le manuscrit intitulé *Bladder Cancer Cell Lines Adapt their Aggressiveness Profile to Oxygen Tension* soumis à *International Journal of Oncology* en avril 2018.

Annexe 4 : Les exosomes sécrétés par les fibroblastes dans un tissu 3D généré par génie tissulaire.

Cette annexe présente le manuscrit intitulé *Fibroblast-secreted exosomes in 3D tissue-engineered tissues* soumis à *Scientific Reports* en mars 2017.

Annexe 5 : Cellules souches adipeuses - Une source optimale pour la régénération de la voie urinaire ?

Cette annexe présente le chapitre de livre intitulé *Adipose-Derived Stem Cells—Are They the Optimal Cell Source for Urinary Tract Regeneration?* qui a été publié dans le livre *Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine* en novembre 2014.

Annexe 6 : Les défis cliniques dans la reconstruction urétrale par génie tissulaire.

Cette annexe présente l'éditorial *Clinical challenges in tissue-engineered urethral reconstruction* qui a été publié dans le journal *Translational Andrology and Urology* en avril 2016.

Chapitre 1 - Introduction

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse portent sur la caractérisation des interactions entre les cellules cancéreuses et stromales du microenvironnement tumoral. Pour que le lecteur puisse pleinement profiter des résultats présentés aux chapitres deux à cinq, trois thèmes seront abordés dans ce chapitre introductif : 1) le développement et la progression tumorale dans le cadre du cancer de la vessie, 2) les acteurs du microenvironnement tumoral et leurs fonctions et enfin, 3) l'activation et le rôle des fibroblastes associés au cancer (CAF).

Le cancer : Vue d'ensemble

Le cancer se définit comme une maladie génétique où l'on retrouve des altérations dans trois types de gènes : les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes assurant la stabilité du génome. Alors que des mutations dans les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs stimulent le processus néoplasique en conférant un avantage de croissance sélectif à la cellule modifiée, la mutation d'un gène de stabilité génomique favorise une augmentation du taux global de mutations sporadiques dans l'ensemble du génome. Ces mutations peuvent avoir lieu dans les cellules somatiques ou germinales, et ainsi être acquises de façon sporadique ou héréditaire, respectivement. C'est l'addition progressive de plusieurs de ces altérations génétiques au cours d'une vie qui sera à l'origine de la conversion d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. Ces mutations confèrent à la cellule cancéreuse une capacité accrue à proliférer indépendamment des signaux provenant du milieu extérieur et en faisant fi du potentiel répliatif prédéterminé d'une cellule normale. Plus précisément, la cellule cancéreuse est caractérisée par six traits qui découlent directement de ces modifications génétiques, soit 1) une autosuffisance en signaux favorisant la croissance, 2) un potentiel répliatif infini, 3) une capacité à résister à l'apoptose, 4) une insensibilité face aux signaux inhibiteurs de la croissance, 5) une angiogenèse soutenue et 6) une invasion des tissus adjacents ou d'un organe distant qui mène à la formation de métastases. Ainsi, les cellules cancéreuses vont proliférer jusqu'à former une masse appelée tumeur qui provoque une désorganisation structurelle du tissu et une perte de fonction de l'organe où elle se trouve. Bien que l'état des connaissances sur la maladie s'améliore au fil des ans, plusieurs obstacles devront être franchis avant l'atteinte

d'un niveau suffisant de compréhension pour en faciliter la détection, en ralentir la progression et mettre au point des traitements spécifiques efficaces.

Le cancer de la vessie

Épidémiologie

Environ un Canadien sur deux développera un cancer au cours de sa vie et environ un Canadien sur quatre en mourra. En 2017, cela représente 206 200 diagnostics de cancer et 80 800 décès (Société Canadienne du Cancer 2017). Pour la même année, le cancer de la vessie a été diagnostiqué chez 8 900 Canadiens et 2 400 en sont décédés. Ce type de cancer se manifeste habituellement chez les personnes âgées de plus de 65 ans et est plus fréquent chez les hommes que chez les femmes (Dobruch et al. 2015). En effet, les hommes sont environ trois à quatre fois plus susceptibles que les femmes d'avoir un cancer de la vessie, mais les femmes sont généralement diagnostiquées à un stade plus avancé et ont donc un pronostic plus sombre. Ainsi, chez les hommes, le cancer de la vessie est le quatrième cancer le plus fréquemment diagnostiqué, représentant 6,5% de tous les nouveaux cas, alors que chez la femme, il s'agit du douzième cancer le plus fréquemment diagnostiqué, représentant 2,1% de tous les nouveaux cas. Globalement, il représente plus de 4% de tous les cancers diagnostiqués chez les deux sexes combinés. Entre 1992 et 2013, le taux de cancer de la vessie a connu une baisse statistiquement significative chez les hommes (0,5 % par année) et les femmes (0,2 % par année) qui est attribuable en partie à la baisse du tabagisme (Société Canadienne du Cancer 2017). Bien qu'il n'y ait pas de cause unique au cancer de la vessie, cette maladie est associée à plusieurs facteurs de risque. Ainsi, l'usage du tabac est le principal facteur de risque pour ce cancer et est à l'origine de 34% à 50% des cas. L'exposition professionnelle à certains produits chimiques comme les amines aromatiques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques constitue quant à elle le deuxième facteur de risque le plus important pour le cancer de la vessie. Vient ensuite l'inflammation de la vessie causée par des microorganismes et les prédispositions génétiques comme des altérations dans les gènes *FGFR3*, *RBI*, *HRAS*, *TP53* et *TSC1* (Knowles & Hurst 2015).

Physiopathologie

La vessie est un organe creux muni d'une paroi musculaire flexible et son intérieur est tapissé de cellules urothéliales assurant l'étanchéité de celle-ci. Le carcinome urothélial représente environ 90% de tous les cancers de la vessie. Lors du diagnostic, 75% des cas sont non invasifs (Ta, Tis, T1) et affectent seulement l'urothélium et la *lamina propria* alors que 25% sont invasifs (T2, T3, T4) et envahissent les couches profondes de la paroi de la vessie, atteignant le muscle vésical (Figure 1). Environ 50% des cancers de la vessie non invasifs sont de bas grade, alors que la plupart des tumeurs musculaires invasives ou métastatiques sont de haut grade (Kamat et al. 2016). Morphologiquement, les tumeurs de la vessie peuvent être divisées en types papillaires, solides et mixtes. Le type papillaire est prédominant, en particulier dans le cancer de la vessie non invasif. Cette classification peut se faire sur la base d'altérations génétiques distinctes, les plus notables étant les mutations activatrices de *FGFR3* dans les tumeurs papillaires et les mutations inactivatrices impliquant les principaux suppresseurs de tumeurs *TP53* et *RBI* dans les tumeurs non papillaires (Kamat et al. 2016). Plus récemment, en 2014, The Cancer Genome Atlas (TCGA) a identifié des mutations supplémentaires qui distinguent les cancers de la vessie papillaires et non papillaires (Network 2014). Les deux sous-types ont une fréquence élevée de mutations dans les gènes codant pour les enzymes modifiant la chromatine, mais les mutations dans l'histone H3 lysine 4 (H3K4) méthyltransferase, *KMT2D*, sont plus fréquentes dans les cancers non papillaires, alors que les mutations dans l'histone H3 lysine 27 (H3K27), *KDM6A*, et celles affectant le promoteur de la télomérase et *STAG2* sont plus fréquentes dans les cancers papillaires (Allory et al. 2014; Balbás-Martínez et al. 2013).

Contrairement à de nombreux autres cancers, il n'y a eu aucune amélioration des taux de survie pour le cancer de la vessie au cours des trois dernières décennies. Globalement, la survie nette après 5 ans pour le cancer de la vessie est de 73 %. Celui-ci varie en fonction du stade passant de 95% au stade T1 à 16% au stade T4.

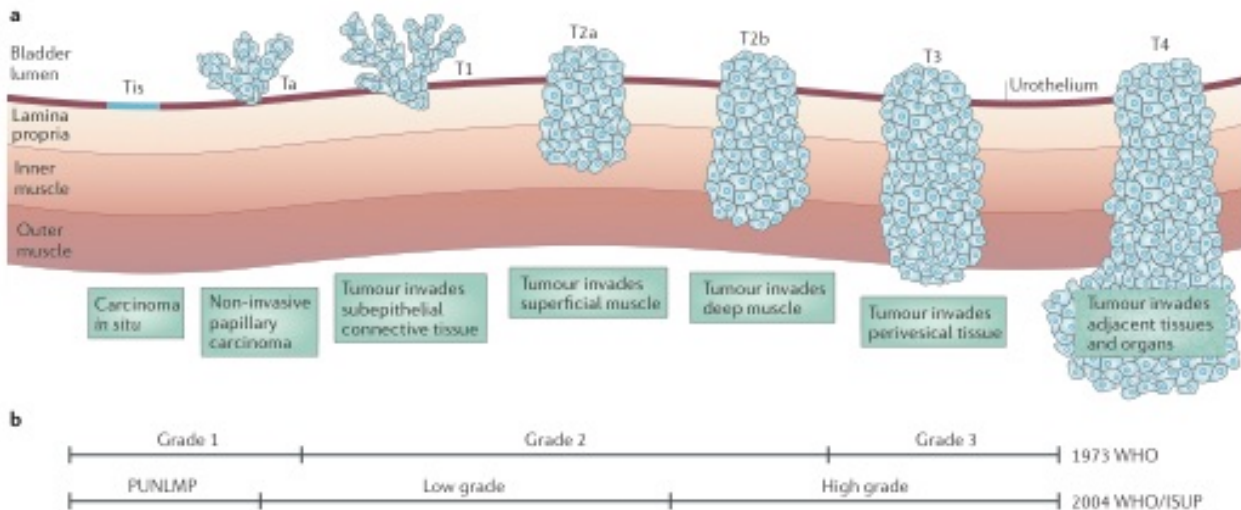


Figure 1.1 | Classification du cancer de la vessie.

A. La stadification du cancer de la vessie selon le système Tumor-Node-Metastasis (TNM). **B.** Le classement en grade selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 1973 et de l'OMS / International Society of Urological Pathology (ISUP) de 2004. Tirée de Knoles et al., 2014.

Traitements

D'entrée de jeu, une modification des habitudes de vie quant au tabagisme est préconisée puisque l'usage du tabac augmente les risques de récurrence et de progression du cancer et diminue la réponse aux traitements (Woldu et al. 2017). La prise en charge du cancer de la vessie est guidée par le stade de celui-ci au moment du diagnostic. Ainsi, la résection transurétrale (RTU) est le traitement chirurgical par excellence dans les cas de cancer non invasif. Celle-ci se pratique par les voies naturelles et consiste à retirer la tumeur par électrocoagulation à l'aide d'une anse diathermique. Les complications sont rares mais le haut taux de récurrence amène l'utilisation de traitements intravésicaux complémentaires tels que l'immunothérapie ou la chimiothérapie. Le bacille de Calmette-Guérin (BCG) est le type d'immunothérapie non spécifique auquel on a le plus souvent recours pour traiter le cancer de la vessie. Dans les cas où le patient n'aurait pas la capacité de tolérer l'immunothérapie, les cliniciens ont recours à la chimiothérapie intravésicale (mitomycine, doxorubicine et gemcitabine). Des méta-analyses ont montré que chez les patients à faible risque de récurrence, une instillation unique de chimiothérapie est bénéfique alors que pour les patients à risque intermédiaire il est nécessaire de répéter les instillations sur 1 an pour voir un bénéfice (Sylvester et al. 2016; Huncharek et al. 2000). Dans le cas des patients à haut risque de récurrence, l'immunothérapie au BCG a montré une meilleure réponse que la chimiothérapie (Kamat et al. 2015). Dans ces études, on montre que non seulement la

vaccination par le BCG est supérieure en termes de réduction des récurrences, mais le vaccin BCG est le seul traitement intravésical qui retarde la progression de la maladie (Malmström et al. 2009; Kamat & Porten 2014). De plus, une méta-analyse d'essais randomisés a montré un taux de rechute significativement plus faible chez les patients recevant le vaccin BCG que chez les patients ayant reçu une RTU seule ou une RTU combinée à une chimiothérapie intravésicale (Sylvester et al. 2005).

Les tumeurs invasives nécessitent une approche thérapeutique plus agressive comme la cystectomie partielle ou radicale, qui consiste en l'ablation partielle ou totale de la vessie, ainsi que des ganglions lymphatiques du bassin. Cette chirurgie est combinée à une chimiothérapie systémique néoadjuvante et/ou adjuvante telles que GemCIS (gemcitabine et cisplatine), MVAC (méthotrexate, vinblastine, doxorubicine et cisplatine) ou CMV (cisplatine, méthotrexate et vinblastine). Plus rarement, afin de conserver leur vessie, certains patients vont recevoir un traitement trimodal, qui consiste en une RTU suivi d'une chimioradiothérapie.

De tous les cancers, le cancer de la vessie a le plus haut taux de récurrence. Environ 50% à 70% des personnes atteintes d'un cancer de la vessie non invasif auront une récurrence dans les 5 années suivant leur diagnostic et de 10% à 30% d'entre eux verront leur cancer progresser vers une forme invasive (Kamat et al. 2016; Sanli et al. 2017; Mari et al. 2018). Ainsi, en raison de la nature récidivante des tumeurs et des nombreuses interventions nécessaires à leur traitement, le cancer de la vessie nécessite un suivi médical important, ce qui en fait l'un des cancers les plus coûteux pour le système de santé.

Le microenvironnement tumoral

Les cellules communiquent entre elles et avec le stroma environnant de manière dynamique. Cette communication se fait parfois de manière directe, par le biais de contacts cellule-cellule, ou par des facteurs sécrétés dans le milieu extracellulaire (cytokines, facteurs de croissance, chemokines, etc.) et agissant sur des récepteurs spécifiques à la surface de leurs cibles cellulaires. C'est cet échange permanent et réciproque entre les cellules et leur environnement direct qui permet le maintien de l'homéostasie des tissus et

des organes. Sa composante cellulaire englobe les cellules immunitaires, les cellules vasculaires et les cellules stromales. Celles-ci baignent dans un gel hydraté que constitue la matrice extracellulaire (MEC). Le microenvironnement tumoral diffère du microenvironnement sain de par le fait que les populations cellulaires qu'il contient, bien que non transformées, sont subverties et contrôlées par les cellules cancéreuses pour répondre à leurs propres besoins (Kalluri 2016). Ces cellules du microenvironnement sont reconnues pour sécréter différentes cytokines qui assument plusieurs fonctions comme favoriser la croissance et la survie des cellules cancéreuses, réguler l'infiltration leucocytaire et stimuler la néovascularisation. Ainsi, l'étude du microenvironnement tumoral a pris ces dernières années une place importante dans le domaine de la recherche sur le cancer. En effet, il est désormais admis que le devenir d'un cancer primitif est déterminé non seulement par le génotype des cellules cancéreuses, mais aussi par ses interactions avec le microenvironnement qui l'entoure puisque l'habileté des tumeurs à moduler son microenvironnement est garante de sa survie et de sa progression (Joyce et al. 2008; Catalano et al. 2013; Quail et al. 2013 ; Bhome et al. 2015).

Les cellules immunitaires

On retrouve une grande variété de cellules immunitaires infiltrant le microenvironnement tumoral et celles-ci entretiennent un contact étroit avec les cellules cancéreuses (Smyth et al. 2001; Sukari et al. 2016). Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une expression de molécules mutées pouvant être détectées par le système immunitaire, qui joue alors un rôle dans le contrôle du développement tumoral. À l'inverse, une réponse immunitaire prolongée par l'inflammation chronique qu'elle instaure, facilite la progression tumorale et la dissémination de métastases, et favorise l'instabilité génétique de la tumeur ainsi que l'immunosuppression locale.

En 1909, Paul Ehrlich a émis la théorie selon laquelle des cellules cancéreuses apparaissent fréquemment dans l'organisme et que le système immunitaire est capable de les éliminer. En 1967, Frank Macfarlane Burnet a défini le terme « immunosurveillance » comme étant la capacité du système immunitaire à détecter les cellules cancéreuses et à les détruire (Burnet 1957). En effet, l'instabilité génétique des cellules cancéreuses entraîne l'apparition de nouveaux antigènes qui peuvent alors être reconnus par le système immunitaire. Avec

les années, la notion de surveillance immunitaire a évolué vers un concept d'immunoédition qui se divise en trois phases (Dunn et al. 2002). La première est la phase d'élimination qui implique la destruction des cellules cancéreuses présentes dans le corps grâce à l'immunité innée et adaptative. La deuxième est une phase d'équilibre ; c'est au cours de cette phase que les cellules cancéreuses subissent des mutations qui leur permettront de survivre. À cette étape, le système immunitaire maintient les cellules cancéreuses dans un état de dormance. Finalement, la dernière phase est dite d'échappement. C'est à cette étape que les cellules ayant acquies assez de mutations échapperont au système immunitaire, notamment en diminuant leur expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et en recrutant des cellules immunosuppressives, et ainsi la tumeur pourra croître sans restriction.

Les cellules impliquées dans l'immunité innée constituent une première barrière pour éliminer les cellules anormales comme les cellules cancéreuses. Les macrophages sont les principales cellules leucocytaires qui infiltrent une tumeur. La stimulation de leurs récepteurs Toll-Like par les cellules cancéreuses entraîne la sécrétion de monoxyde d'azote (NO), d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de cytokines telles que le *tumor necrosis facteur* (TNF α) qui permettent la destruction des cellules cancéreuses par apoptose. Les cellules tueuses naturelles NK reconnaissent et lysent les cellules cancéreuses dépourvues de molécules CMH de classe I. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ vont détruire par contact direct les cellules cancéreuses via une reconnaissance de ces dernières grâce à leur récepteur de cellules T (TCR), leurs récepteurs Fas ligand ou par l'activation de leurs récepteurs de lyse cellulaire (NKG2D, CD160, KIR2DDS, CD94/NKG2C). Les granulocytes, qui regroupent les cellules basophiles, neutrophiles et éosinophiles, participent à la création d'un site inflammatoire en produisant une variété de cytokines pro-inflammatoires qui permettent le recrutement des cellules impliquées dans la réponse immune adaptative.

Lorsque la réponse immune innée ne parvient pas à éliminer les cellules cancéreuses, une réponse immune spécifique se met en œuvre. Au cours de cette réponse, des lymphocytes T CD4⁺ (mémoires) et CD8⁺ (cytotoxiques) reconnaissent les peptides exposés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Les cellules dendritiques (DC) sont les cellules présentatrices de l'antigène les plus efficaces du système immunitaire. Elles servent de

sentinelles, car elles capturent les antigènes dans la périphérie et les présentent aux lymphocytes T dans les nœuds lymphatiques. Les lymphocytes T CD4⁺ ont pour fonction de sécréter de nombreuses cytokines qui vont jouer un rôle important dans l'activation des autres cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T CD8⁺, les lymphocytes B et les macrophages. Les lymphocytes T CD8⁺ possèdent, une fois activés, une activité cytotoxique de par la sécrétion d'enzymes lytiques perforines et granzymes. Ils ont pour fonction d'éliminer spécifiquement les cellules du soi qui sont altérées parmi lesquelles on retrouve les cellules cancéreuses, ce qui fait d'eux les cellules les plus importantes dans l'immunité tumorale. À l'inverse, les lymphocytes T régulateurs (Treg) CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺ ont pour fonction l'inhibition du système immunitaire pour prévenir l'auto-immunité ou l'infection chronique, ce qui conduit à la tolérance de l'antigène impliqué. Leur origine ainsi que leur fonctionnement ne sont pas encore bien compris. La présence des Treg au sein de la tumeur interfère avec le bon fonctionnement des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, ce qui réduit l'efficacité de l'immunité anti-tumorale.

Plusieurs études ont montré que la présence de lymphocytes infiltrant la tumeur dans le cancer de la vessie est associée à un pronostic favorable, mais qu'à long terme, l'activation de ces lymphocytes ne résiste plus aux signaux inhibiteurs retrouvés dans le microenvironnement tumoral (Lipponen et al. 1993; Sharma et al. 2007; Liakou et al. 2007).

D'un point de vue immunologique, il est possible de comparer les tumeurs à une infection virale persistante. Dans les deux cas, c'est la présence constante d'antigènes immunogéniques qui maintient le système immunitaire actif. Cependant, peu de patients atteints de cancer soumis à une vaccination antitumorale semblent démontrer une régression tumorale. La faible efficacité de la vaccination serait due davantage à l'incapacité des divers antigènes tumoraux à induire une réponse immunitaire suffisante, qu'à l'absence de cibles spécifiques dans les tumeurs. Cette faible réponse pourrait aussi être causée par la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi puisqu'il y a une inhibition des effecteurs de l'immunité dans l'environnement tumoral.

Les cellules vasculaires

La croissance des cellules cancéreuses provoque l'apparition de zones au cœur de la tumeur solide, où l'afflux sanguin est significativement diminué. Ainsi, les tumeurs primaires et les métastases ne peuvent dépasser 1-2 mm³ sans un apport additionnel de nutriments et d'oxygène. Au-delà de cette taille, l'hypoxie subie par les cellules cancéreuses constitue le principal stimulus physiologique de l'angiogénèse tumorale, forçant le réseau de vaisseaux sanguins déjà en place à s'étendre et se densifier. Ainsi, lorsque la concentration d'oxygène chute, le facteur HIF-1 α s'hydroxyle, ce qui empêche sa dégradation et mène à son accumulation dans la cellule cancéreuse. HIF-1 α régule l'expression de facteurs pro-angiogéniques, notamment le VEGF, l'angiopoïétine 1 et 2, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance placentaire.

La famille du VEGF comprend le VEGFA, le VEGFB, le VEGFC, le VEGFD qui partagent des structures similaires mais qui possèdent des activités biologiques différentes. La VEGFA est le facteur angiogénique le plus important et exerce ses fonctions cellulaires en se liant avec une haute affinité aux récepteurs de la tyrosine kinase, VEGFR-1 et VEGFR-2 (Guo et al. 2001). Le VEGFB quant à lui est impliqué dans la dégradation de la MEC et la migration des cellules endothéliales. Les VEGFC et VEGFD se lient spécifiquement au récepteur VEGFR-3, exprimé exclusivement par les cellules lymphatiques, et sont donc responsables de la régulation de la lymphangiogénèse. La majorité des cancers, incluant le cancer de la vessie, présentent une expression accrue de VEGF. D'ailleurs, les niveaux de VEGFA corrélerent avec le grade et la progression du cancer de la vessie (C.-C. Yang et al. 2004; Donmez et al. 2009). De plus, un taux élevé de VEGFA est associé à un mauvais pronostic et à un haut taux de récurrence (Crew et al. 1997; Fauconnet 2009).

Sous l'effet de ces facteurs, les cellules endothéliales du microenvironnement vont non seulement retrouver une activité proliférative, mais également synthétiser des enzymes protéolytiques, telles que les MMP ou les collagénases, qui permettent la dégradation de la membrane basale endothéliale préexistante (Risau 1997; Carmeliet 2003). Des bourgeons endothéliaux se forment à la surface des vaisseaux, migrent vers le site tumoral et se creusent une lumière qui permettra le passage du sang. Les structures néoformées

s'anastomosent pour reconstituer un réseau capillaire. Plusieurs études montrent que la densité des micro-vaisseaux retrouvés dans une tumeur vésicale corrèle avec sa progression et un mauvais pronostic (Bochner et al. 1995; Canoglu et al. 2004).

Dans le réseau vasculaire, les péricytes sont les cellules qui recouvrent la face externe des vaisseaux sanguins. Ils sont étroitement reliés entre eux par des jonctions cellule-cellule et jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins. Les péricytes du microenvironnement tumoral sont différents de ceux présents dans un tissu sain puisqu'ils sont, d'une part, moins abondants et, d'autre part, liés de manière plus ou moins lâche à la couche endothéliale (Claesson-Welsh 2015). La perte de l'intégrité des jonctions cellulaires entraîne un dysfonctionnement de la barrière endothéliale qui se traduit par une fuite du compartiment vasculaire. En conséquence, le système vasculaire tumoral est perméable et moins efficace dans la perfusion sanguine, conduisant à une augmentation de la pression du liquide interstitiel, de l'hypoxie et du pH extracellulaire acide qui peuvent affecter de manière significative la délivrance et l'efficacité des médicaments chimiothérapeutiques (Azzi et al. 2013). De plus, la perméabilité des vaisseaux sanguins facilite l'intravasation des cellules cancéreuses et favorisent la progression métastatique (Zhou et al. 2014).

Les cellules stromales

Les CAF (*cancer-associated fibroblasts*) constituent le type cellulaire le plus abondant du microenvironnement tumoral. Activés par les cellules cancéreuses, les CAF sont impliqués non seulement dans la prolifération des cellules cancéreuses et l'invasion tumorale mais seraient également impliqués dans l'angiogenèse et la formation de métastases. Ils feront l'objet de la prochaine section de cette thèse.

Le tissu adipeux est composé principalement d'adipocytes, des cellules traditionnellement associées au stockage lipidique. Ce n'est que récemment que les adipocytes ont commencé à être considérés comme des cellules endocrines et inflammatoires produisant des hormones, des facteurs de croissance, des cytokines et d'autres molécules telles que les adipokines (Halberg et al. 2008). Par conséquent, les adipocytes sont des cellules importantes dans la régulation du comportement de la tumeur par des processus de

signalisation hétérotypiques (Vona-Davis & Gibson 2013). Plusieurs évidences montrent que les adipocytes peuvent stimuler la croissance et la survie des cellules cancéreuses en libérant des acides gras qui peuvent être métabolisés par les cellules cancéreuses et utilisés comme source d'énergie. Les adipocytes favoriseraient également la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Y. Lee et al. 2018). De plus, les adipocytes participent au recrutement des macrophages via la sécrétion de cytokines comme CCL2, IL-1 β et CXCL12 mais également en relarguant leur ADN (Nishimoto et al. 2016).

Les vésicules extracellulaires

La sécrétion de vésicules extracellulaires est un processus qui semble être conservé tout au long de l'évolution (Colombo et al. 2014). Les vésicules extracellulaires ont été isolées dans divers fluides corporels, y compris le sang, l'urine, la salive, le lait maternel, le liquide amniotique et le liquide céphalo-rachidien. Il existe trois types de vésicules extracellulaires qui diffèrent selon leur taille, leur biogenèse et leurs fonctions, soit les corps apoptotiques, les microvésicules et les exosomes. Les corps apoptotiques, libérés par les cellules en apoptose, ont une taille comprise entre 800 nm et 5 μ m de diamètre et contiennent des débris cellulaires, des organites et de l'ADN fragmenté. Les microvésicules proviennent du bourgeonnement de la membrane plasmique et possèdent des tailles hétérogènes comprises entre 100 et 1000 nm. Les exosomes sont de petites vésicules de 30 à 200 nm de diamètre dérivant de la voie endosomale.

Malgré le fait que ces trois catégories de vésicules possèdent en théorie des caractéristiques bien définies, en pratique, il est difficile de les dissocier puisqu'elles partagent certaines propriétés physiques et biochimiques et que jusqu'à maintenant, encore peu de marqueurs sont spécifiquement associés à un seul type de vésicule. Ainsi, une attention spéciale est requise lors de l'isolation de ces vésicules et une caractérisation approfondie est nécessaire afin de s'assurer de l'identité des vésicules isolées.

Les exosomes

Au début des années 80, Harding et al. ont découvert un mécanisme de sécrétion de vésicules extracellulaires complexe faisant intervenir les endosomes (Harding et al. 1983). Le terme exosome a été utilisé pour la première fois en 1987 pour décrire ces petites

vésicules d'origine endosomale (Johnstone et al. 1987). Au cours des années suivantes, les exosomes ont été marginalement étudiés puisqu'ils étaient simplement considérés comme un moyen pour les cellules de se débarrasser des composantes biologiques inutilisées. L'intérêt pour ces vésicules a radicalement augmenté ces dernières années en raison de la découverte de leur implication dans différents processus biologiques autant en contexte sain que pathologique (Jan et al. 2019). Néanmoins, les fonctions physiologiques normales des exosomes restent largement inexplorées. Jusqu'à présent, les seules évidences de leur rôle dans un contexte sain ont été observées dans la communication synaptique (Lachenal et al. 2011; Bahrini et al. 2015) et la modulation de la réponse immunitaire en raison de leur capacité à présenter un antigène (Wolfers et al. 2001). C'est dans le domaine du cancer que le rôle des exosomes a été le plus étudié. Le réseau complexe de communication entre les cellules cancéreuses et non cancéreuses via les exosomes semble être impliqué dans toutes les étapes de la progression du cancer, de la croissance tumorale à la dissémination métastatique (Meehan & Vella 2015).

Biogenèse, sécrétion et composition des exosomes

La biogenèse des exosomes s'opère dans la voie endosomale qui consiste en un réseau de compartiments membranaires dynamiques ayant pour but de recycler ou dégrader les différentes composantes cellulaires. Les endosomes précoces, situés à proximité de la membrane cellulaire, prennent en charge les vésicules internalisées par la cellule et les dirigent vers la membrane plasmique pour être recyclées ou les acheminent vers les endosomes tardifs (Stoorvogel et al. 1991). Les endosomes tardifs ont pour principales fonctions de trier les molécules et de les rediriger vers d'autres compartiments intracellulaires tels que le Golgi ou le réticulum endoplasmique. Toutefois, certains endosomes tardifs se transforment en corps multivésiculaires (MVB). L'invagination de la membrane des MVB mène à la formation de vésicules intraluminales (ILV), futurs exosomes. Cette étape fait intervenir notamment la machinerie ESCRT, composée d'une trentaine de protéines qui s'assemblent en quatre complexes protéiques (ESCRT-0, -1, -II, -III) et des facteurs associés comme Alix, TSG-101 et VSP4 (Colombo et al. 2013; Hanson & Cashikar 2012). Les complexes ESCRT-0 et ESCRT-I s'assemblent et recrutent ESCRT-II qui permet l'invagination de la membrane. Ensuite, le complexe ESCRT-II interagit avec ESCRT-III, ce qui induit la scission des vésicules qui vont alors s'accumuler dans la

lumière endosomale. Cependant, la déplétion des protéines ESCRT n'empêche pas complètement la production d'exosomes suggérant la présence de mécanismes de formation d'exosomes indépendants de la voie ESCRT (Stuffers et al. 2009). Il existe en effet deux autres voies, soit la voie des tétraspanines et la voie des lipides, qui participent à la biogenèse des exosomes (Figure 2). Ensuite, les MVB peuvent soit fusionner avec les lysosomes où leur contenu sera dégradé et recyclé, ou bien se diriger vers la membrane plasmique pour libérer les exosomes dans l'espace extracellulaire. Le trafic intracellulaire des compartiments vésiculaires implique le cytosquelette mais aussi de petites protéines GTPases de la famille Rab composée de plus de 60 membres qui s'associent préférentiellement à un compartiment intracellulaire. Ainsi, Rab11, Rab27 et Rab35 sont impliqués spécifiquement dans la migration des MVB vers la membrane plasmique (Savina et al. 2002; Hsu et al. 2010; Frühbeis et al. 2013). Les MVB fusionnent avec la membrane cellulaire via les SNARE, des protéines transmembranaires spécialisées qui catalysent les réactions de fusion membranaire au cours du transport vésiculaire (Fader et al. 2009).

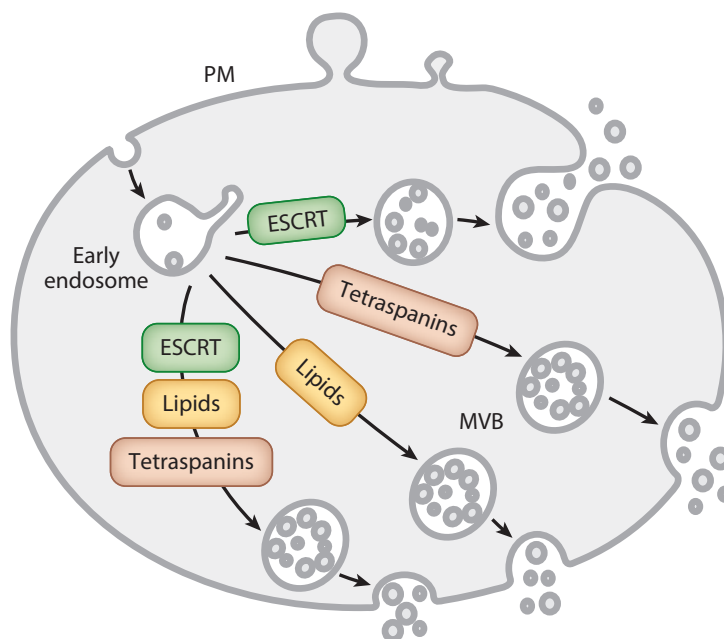


Figure 1.2 | Mécanismes moléculaires de la biogenèse des exosomes.

Différentes machineries cellulaires sont impliquées dans la biogenèse des vésicules intraluminales des corps multivésiculaires (MVB) et donc des exosomes. Les complexes de tri endosomique que constituent l'ESCRT, les lipides et les tétraspanines ont été décrits dans la littérature, mais on ne sait toujours pas si chacun agit sur différents MVB, ou s'ils peuvent agir simultanément sur le même MVB. Tirée de Colombo et al., 2014.

Les exosomes contiennent protéines, ARN et lipides (Figure 3). Le développement de techniques d'analyse protéomique dans les années 1990 a rapidement permis l'identification à grande échelle des protéines contenues dans les préparations d'exosomes et ces données ont été rassemblées dans une base de données appelée Exocarta (www.exocarta.org). Le contenu protéique endosomal est très hétérogène d'un type cellulaire à l'autre et varie également en fonction de l'état cellulaire et le niveau de différenciation et d'activation de la cellule. De façon générale, les exosomes contiennent uniquement des protéines provenant du cytosol et des endosomes tandis que celles dérivées du noyau, des mitochondries, du Golgi et du réticulum endoplasmique y sont absentes. De plus, en raison de leur origine endosomale, les exosomes présentent certaines protéines associées au transport et à la sécrétion des MVB comme CD9, CD63, CD81, Alix, Flotilin et TSG-101, qui permettent notamment de les distinguer des autres types de vésicules. Plusieurs études ont également montré la présence dans les exosomes de petits ARN, incluant les ARNm et les miARN. Fait intéressant, les ARNm ne sont pas présents de manière aléatoire dans les exosomes, puisque des analyses bio-informatiques ont révélées que des séquences différentes étaient soit préférentiellement à l'intérieur des exosomes (sécrétées), soit, à l'inverse, retenues à l'intérieur des cellules (intracellulaires) (Batagov et al. 2011). Enfin, la composition lipidique de la membrane exosomale diffère significativement de celle de la membrane plasmique. En effet, on y retrouve une plus grande concentration de sphingomyéline, phosphatidylsérine et cholestérol (Brouwers et al. 2013; Llorente et al. 2013). Que des constituants cellulaires particuliers soient spécifiquement empaquetés dans des exosomes via un mécanisme organisé ou que le remplissage des exosomes soit simplement un processus aléatoire reste toutefois encore inconnu.

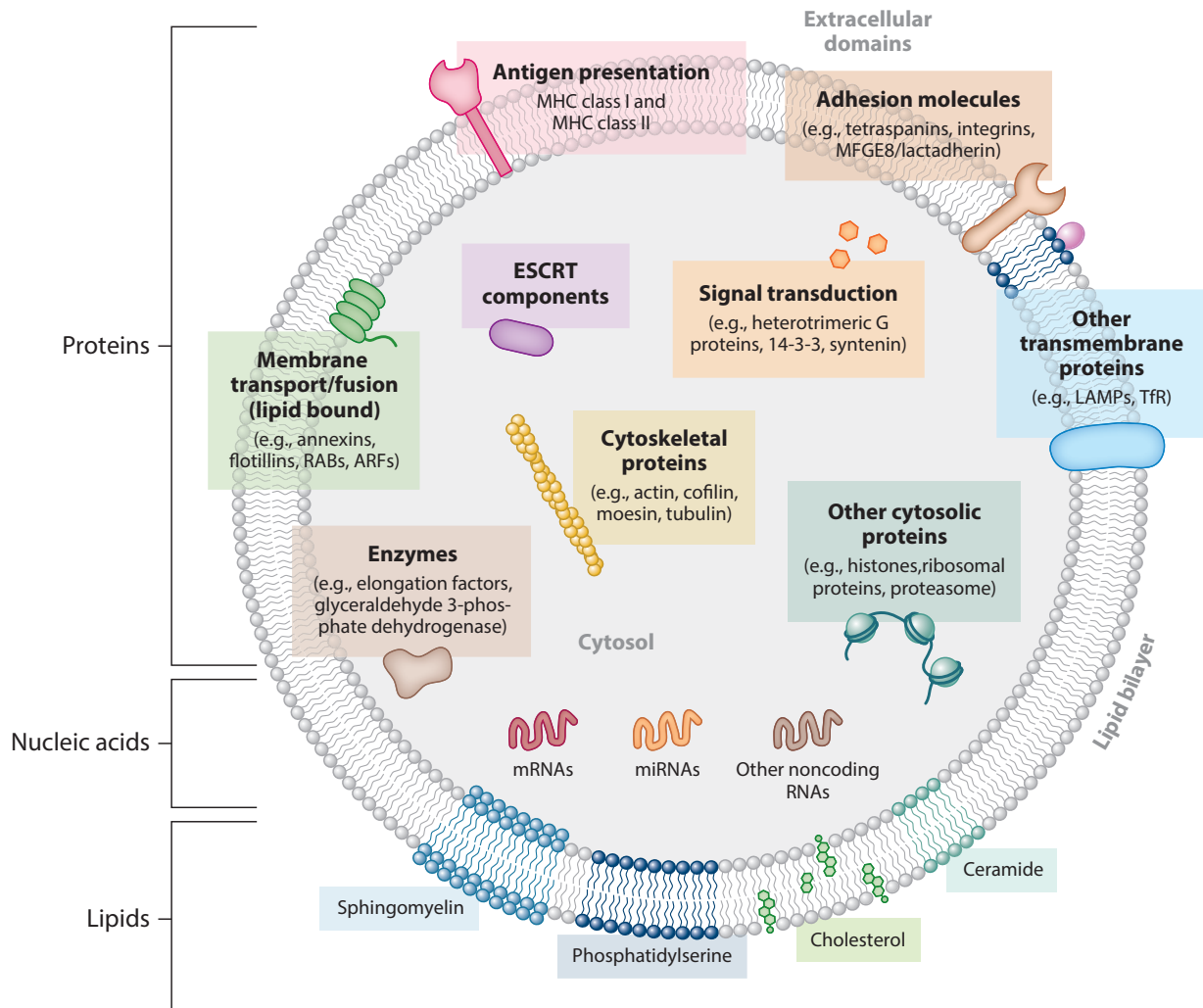


Figure 1.3 | Composition globale des vésicules extracellulaires (VE).

Représentation schématique de la composition (familles de protéines, lipides et acides nucléiques) et orientation membranaire des VE. Tirée de Colombo et al., 2014.

Le rôle des exosomes à titre de messagers dans la communication intercellulaire implique que ceux-ci interagissent avec une cellule réceptrice pour induire des changements biologiques. L'étude des interactions entre exosomes et cellules cibles a grandement été ralentie en raison de la difficulté à visualiser ces vésicules en microscopie optique (la limite de résolution étant de 200 nm). Toutefois, d'autres techniques ont permis de mettre en évidence différents modes d'internalisation des exosomes, comme l'endocytose dépendant de récepteurs ou de la clathrine, la phagocytose ou par fusion avec la membrane plasmique (Figure 4) (Montecalvo et al. 2012; Morelli 2004). Une fois internalisés, le contenu des exosomes est soit dégradé, soit libéré dans le cytosol de la cellule pour induire, selon le cargo transporté, différentes réponses cellulaires. Les exosomes peuvent également jouer

leur rôle de messagers via les protéines présentes à leur surface en stimulant les récepteurs de la cellule cible pour induire une signalisation intracellulaire (Colombo et al. 2014).

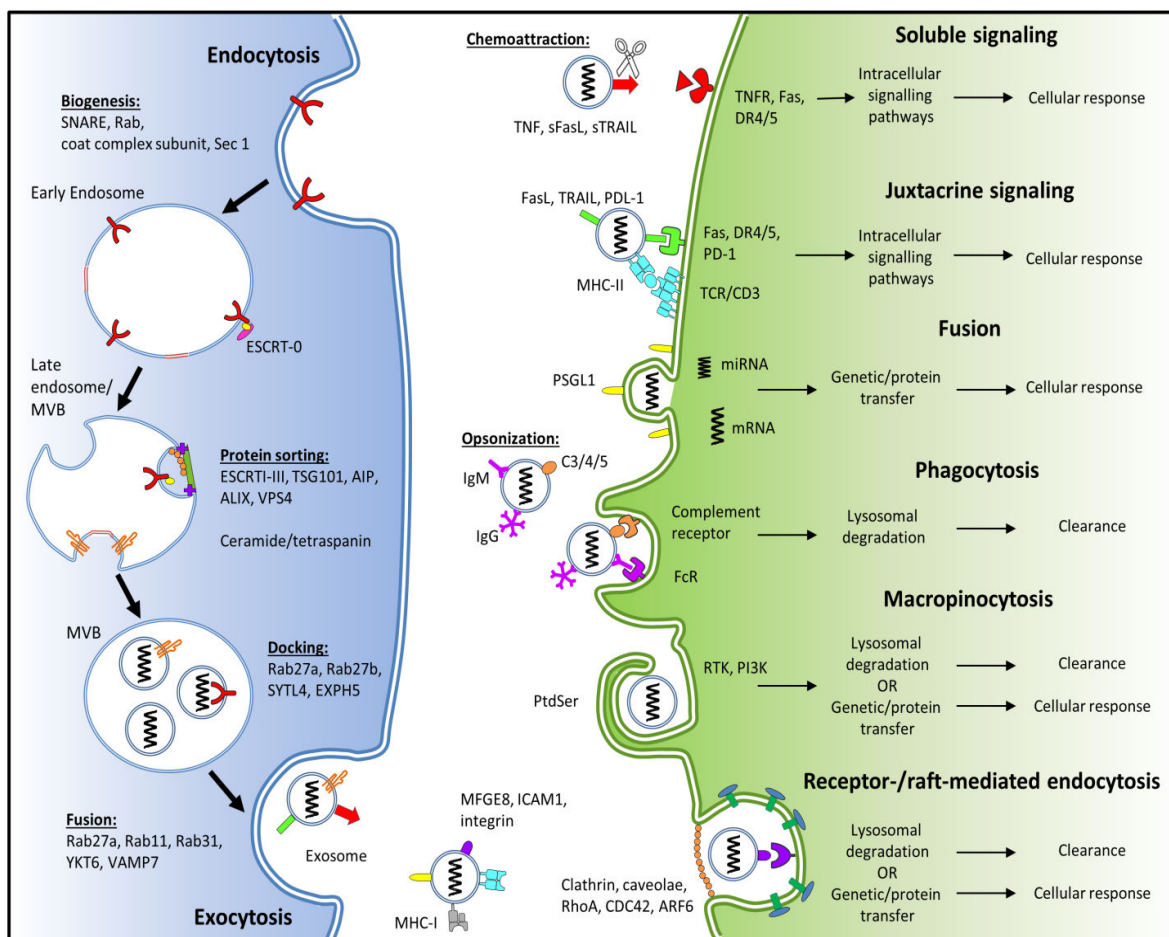


Figure 1.4 | Biogenèse de l'exosome, de son internalisation et de la réponse cellulaire.

L'adhésion des exosomes à la cellule receveuse se fait via l'interaction de diverses protéines de surface exosomales et de récepteurs cellulaires. Une fois lié, l'exosome peut (i) déclencher la transduction du signal via des voies de signalisation intracellulaires et être libéré (signalisation juxtacrine); (ii) fusionner avec la membrane cellulaire transférant la protéine et le contenu génétique, dans le cytoplasme de la cellule receveuse (fusion); ou (iii) être internalisé par phagocytose, macropinocytose ou endocytose médiée par le récepteur. Tirée de McKelvey, et al. Exosomes: Mechanisms of Uptake. J Circ Biomark, 2015, 4:0.

Rôles des exosomes dans le microenvironnement tumoral

La concentration d'exosomes dans le sérum de patients atteints du cancer des ovaires, du sein et du pancréas est près de deux fois plus élevée que chez un patient sain (Taylor & Gercel-Taylor 2008; Caradec et al. 2014; Melo et al. 2015). Plusieurs évidences suggèrent que ces exosomes tumoraux seraient impliqués dans la modulation du microenvironnement tumoral et favoriseraient la carcinogénèse.

Exosomes et prolifération tumorale. Les exosomes provenant aussi bien des cellules cancéreuses que des cellules du microenvironnement contribuent à la carcinogenèse en soutenant la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, il a été démontré que certains exosomes contiennent la survivine, une protéine anti-apoptotique, et qu'une fois internalisés par les cellules cancéreuses, celles-ci sont protégées de la mort cellulaire induite par le stress génotoxique (Khan et al. 2009). Le transfert d'ARNm d'une cellule à l'autre via les exosomes peut également favoriser la prolifération cellulaire. Ainsi, les exosomes provenant du sérum des patients atteints de glioblastome contiennent de l'ARNm du récepteur oncogène EGFRvIII, qui stimule la prolifération des cellules de gliome humain (Al-Nedawi et al. 2008). De plus, les exosomes dérivés de cellules cancéreuses du côlon et enrichis en ARNm de l'oncogène $\Delta Np73$ favorisent la prolifération des cellules réceptrices (Soldevilla et al. 2013). Les cellules cancéreuses libèrent également des exosomes qui expriment des niveaux élevés d'une variété d'ARN et de cytokines qui facilitent la croissance tumorale (P. Zhang et al. 2018; H. Zhang et al. 2017; C. Li 2015). L'interaction entre les cellules stromales et les cellules cancéreuses favorise également la croissance tumorale. Ainsi, les exosomes provenant de cellules leucémiques stimulent la production de la cytokine IL-8 par les cellules stromales de la moelle osseuse, ce qui favorise en retour la croissance des cellules leucémiques (Corrado et al. 2014).

Exosomes et immunité tumorale. Alors que les exosomes sont apparus comme des médiateurs critiques de la communication entre les cellules immunitaires et les cellules cancéreuses, leurs rôles à la fois anti- et pro-tumoraux ne sont pas encore totalement compris, ce qui reflète vraisemblablement l'hétérogénéité fonctionnelle des exosomes dans le microenvironnement tumoral. Ainsi, puisque les exosomes produits par les cellules cancéreuses contiennent des protéines modifiées, ils participent au transfert d'antigènes tumoraux vers les cellules dendritiques, contribuant ainsi à l'induction d'une réponse immune anti-tumorale (Wolfers et al. 2001). De plus, les exosomes dérivés de cellules dendritiques portent à leur surface le CMH leur conférant la capacité de présenter des antigènes et ainsi activer les lymphocytes T CD4⁺ (Vincent-Schneider et al. 2002).

À l'inverse, certaines études ont montré la capacité des exosomes à inhiber la réponse immune notamment en inhibant les cellules immunitaires activées (Bobrie et al.

2011; Filipazzi et al. 2012; H.-G. Zhang et al. 2012). En effet, les exosomes dérivés du cancer de la prostate diminuent la prolifération des cellules T en raison de l'expression du ligand Fas à leur surface (Abusamra et al. 2005). De la même manière, la co-culture d'exosomes provenant de cellules cancéreuses du sein avec des cellules NK induit une réduction de l'activité cytotoxique et de la prolifération des cellules NK (Liu et al. 2006). De plus, la présence de prostaglandine E2 et du TGF β dans les exosomes tumoraux favorise l'accumulation de cellules suppressives dérivées de myéloïdes (MDSC) conduisant à l'expansion des Treg et à l'apoptose des lymphocytes T CD8⁺ (Xiang et al. 2008; Wieckowski et al. 2009).

Exosomes et angiogenèse. La croissance tumorale dépend grandement de l'accès des cellules cancéreuses aux nutriments, à l'oxygène et de l'élimination des déchets qui sont des fonctions en grande partie accomplies par le système vasculaire. Les exosomes dérivés de tumeurs sont impliqués dans ce processus en présentant des activités pro-angiogéniques. Ainsi, il a été montré qu'un environnement hypoxique favorise chez les cellules cancéreuses la sécrétion d'exosomes, qui sont ensuite internalisés par les cellules endothéliales, favorisant la formation de nouveaux tubules et contribuant au développement local de nouveaux vaisseaux sanguins (Skog et al. 2008; Z. Huang & Feng 2017). Le contenu des exosomes est modulé par l'état hypoxique des cellules sécrétrices. En effet, les exosomes isolés des cellules en conditions hypoxiques par rapport aux conditions normoxiques induisent l'angiogenèse *in vitro* et *ex vivo* en stimulant les cellules endothéliales à sécréter des facteurs de croissance et des cytokines pro-angiogéniques (Kucharzewska et al. 2013; Umezu et al. 2014). De plus, l'internalisation d'exosomes dérivés de tumeurs induit l'expression de gènes pro-angiogéniques dans les cellules endothéliales, comme le facteur de von Willebrand, le VEGF et son récepteur apparenté VEGFR2, favorisant une prolifération accrue des cellules endothéliales (Nazarenko et al. 2010).

Exosomes et métastases. Des exosomes tumoraux ont récemment été proposés pour participer à la dissémination métastatique des cellules cancéreuses. L'un des premiers événements à survenir dans le processus métastatique est l'acquisition, par les cellules cancéreuses, d'une motilité cellulaire et d'une capacité invasive (Hanahan & Weinberg

2011). Les invadopodes sont des projections de la membrane plasmique associés principalement aux cellules cancéreuses et qui ont pour rôle la dégradation de la MEC. L'inhibition de la formation des invadopodes dans les cellules diminue significativement la sécrétion d'exosomes. En effet, les invadopodes ont été identifiés comme des sites de sécrétion importants pour les MVB CD63+ et Rab27a+ (D. Hoshino et al. 2013). De plus, l'inhibition de la sécrétion des exosomes ralentit la dégradation de la MEC par les invadopodes ce qui suggère que la motilité cellulaire que procure les invadopodes aux cellules cancéreuses passe en partie par le contenu des exosomes. D'ailleurs, il a été montré que les exosomes tumoraux contiennent des protéases qui peuvent dégrader le collagène, la laminine et la fibronectine et contiennent aussi HSP90a responsable de l'activation des protéases MMP-2 et plasmine (McCready et al. 2010; Mu et al. 2013).

En transition pro-métastatique, les cellules cancéreuses acquièrent, en plus de la dégradation de la MEC, d'autres caractéristiques malignes comme la capacité de franchir la barrière endothéliale, un processus connu sous le nom d'intravasation (Hanahan & Weinberg 2011). Le miRNA-105 est impliqué dans la perturbation des jonctions serrées endothéliales vasculaires par interférence avec une protéine clé, la protéine de jonction serrée ZO-1, ce qui favorise la formation de métastases (Zhou et al. 2014). Notamment, le miARN-105 a été détecté dans les exosomes circulants de patients atteints de cancer du sein au stade prémétastatique (Zhou et al. 2014). De même, une étude récente démontre l'aptitude des exosomes du cancer gastrique à favoriser les métastases péritonéales par la destruction de la barrière mésothéliale (Deng et al. 2017). Les études *in vitro* ont proposé l'apoptose et la transition mésothéliale-mésenchymateuse comme deux des mécanismes pouvant expliquer la rupture de la barrière mésothéliale lors du traitement avec des exosomes provenant de cellules cancéreuses gastriques. En effet, les cellules mésothéliales qui n'étaient pas complètement détachées du péritoine présentaient des niveaux d'expression de ZO-1 plus faibles que les groupes témoins de souris avec une barrière mésothéliale intacte (Deng et al. 2017).

Les cellules cancéreuses ayant maintenant acquis la capacité d'envahir le tissu et de franchir la barrière endothéliale, se retrouvent dans la circulation sanguine et peuvent alors coloniser un organe secondaire (Hanahan & Weinberg 2011). Il est bien décrit que les tumeurs primaires ont tendance à métastaser vers des sites secondaires spécifiques (Lu & Kang 2007). La niche prémétastatique constitue les futurs foyers tumoraux secondaires et

est caractérisée par une arrivée massive de cellules souches hématopoïétiques, un dépôt soutenu de fibronectine et une présence importante de MMP (Kaplan et al. 2006). Récemment, la relation entre l'organotropisme métastatique et les exosomes tumoraux a été explorée. Ainsi, *in vivo*, les exosomes du cancer du pancréas sont internalisés préférentiellement par les cellules pulmonaires, hépatiques et cérébrales (A. Hoshino et al. 2015). De plus, le nombre de cellules cancéreuses de mélanome retrouvées au site métastatique chez des souris traitées aux exosomes tumoraux est significativement augmenté par rapport aux souris traitées avec des liposomes contrôles (Hood et al. 2011). Fait intéressant, Hoshino et ses collègues ont découvert que le site métastatique d'un cancer primaire pouvait être modulé en utilisant des exosomes dérivés de cellules connues pour métastaser à des sites spécifiques. De plus, un profil d'expression d'intégrines distinct dans les exosomes corrèle à l'organotropisme métastatique des cellules cancéreuses. Ainsi, les intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 6\beta 1$ à la surface des exosomes sont associées aux métastases pulmonaires, tandis que l'intégrine $\alpha V\beta 5$ est plutôt associée aux métastases hépatiques (Hood et al. 2011). D'ailleurs, ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans les exosomes dérivés des patients atteints d'un cancer métastatique. Le blocage de ces intégrines réduit l'internalisation des exosomes au site métastatique suggérant que ces intégrines pourraient être un outil utile pour prédire la formation de métastases (Hood et al. 2011).

Exosomes dérivés du cancer de la vessie. Jusqu'à maintenant, peu d'études se sont intéressées au rôle des exosomes spécifiquement dans le cancer de la vessie. Ainsi, les exosomes isolés des lignées de cellules cancéreuses vésicales TCC-SUP et SV-HUC et de l'urine de patients atteints d'un cancer de la vessie de haut grade favorisaient l'angiogenèse des cellules endothéliales et la migration des cellules cancéreuses (Beckham et al. 2014). Franzen et al. ont montré une augmentation des marqueurs stromaux au profit d'une diminution des marqueurs épithéliaux chez les cellules urothéliales traitées avec des exosomes dérivés de cancer de la vessie (Franzen et al. 2015). Conséquemment, les exosomes tumoraux augmentaient la migration et l'invasion des cellules urothéliales, un phénomène qui pouvait être renversé par un traitement à l'héparine. Il a également été montré que le long ARN non-codant (lncRNA) HOTAIR était enrichi dans l'urine de patients atteints d'un cancer invasif de haut grade (Berrondo et al. 2016). L'inhibition de HOTAIR dans différentes lignées cellulaires cancéreuses a réduit la migration et l'invasion de celles-ci et modifié l'expression des gènes de l'EMT, y compris *SNAIL*, *TWIST1*, *ZEB1*,

ZOI, MMP1, LAMB3 et LAMC2. De manière similaire, Xue et al. ont montré que comparativement aux exosomes normoxiques, les exosomes hypoxiques dérivés de la lignée 5637 présentaient un niveau d'expression plus élevé de l'incRNA-UCA1 (Xue et al. 2015). De plus, l'incRNA-UCA1 favorisait la croissance et la progression tumorale par une EMT, *in vitro* et *in vivo*. Enfin, les niveaux d'expression de l'incRNA-UCA1 dans les exosomes dérivés du sérum de patients atteints de cancer de la vessie étaient plus élevés que dans les témoins sains.

La matrice extracellulaire

Le compartiment extracellulaire d'un tissu est constitué de la MEC, un réseau complexe et dynamique de macromolécules en perpétuel remodelage. De par leurs nombreux domaines de liaison avec les cellules, les constituants de la MEC jouent un rôle essentiel dans l'organisation cellulaire et l'architecture d'un tissu. De plus, la MEC est impliquée dans la régulation de plusieurs mécanismes cellulaires tels que l'adhésion cellule-matrice, la signalisation intracellulaire, la régulation et l'expression des gènes ainsi que l'organisation du cytosquelette. Elle constitue également un réservoir de cytokines et de facteurs de croissance qui, trappés dans la matrice, peuvent être libérés au moment opportun via l'action de protéases. La MEC est composée principalement de trois classes de macromolécules, soit les protéines fibreuses (collagène et élastine), les protéines d'adhérence (fibronectine et laminine) et les polysaccharides (glycosaminoglycane (GAG) et protéoglycane). Dans un contexte tumoral, la MEC subit des modifications importantes, un processus appelé la desmoplasie, qui se reflète notamment au niveau de sa composition et de sa rigidité.

Composantes de la MEC

Les collagènes. Les collagènes, composants les plus abondants de la MEC, sont des structures complexes de protéines qui forment une grande famille totalisant 28 membres (Gordon & Hahn 2009). Alors que certains sont ubiquitaires, d'autres sont spécifiques à certains tissus. Par exemple, les collagènes de type II et XI sont présents dans les cartilages, le type V dans la cornée et le type IV est retrouvé dans toutes les membranes basales. Les collagènes forment une structure hélicoïdale en triple hélices avec trois chaînes

polypeptidiques alpha. Celle-ci les rend insensibles à des protéases comme la pepsine et seules les collagénases sont capables de cliver la triple hélice. Le collagène est synthétisé sous une forme inactive nommée pro-collagène. L'excision des pro-peptides localisés dans les extrémités amino- et carboxy-terminales mène à des molécules actives de collagènes matures. Bien que certains types de cellules épithéliales (Van Agtmael & Bruckner-Tuderman 2009) et les cellules endothéliales (Anderson & Hinds 2012) peuvent synthétiser les collagènes, ce sont principalement les cellules stromales qui sont responsables de leur sécrétion.

L'élastine. L'élastine est une protéine fibreuse sécrétée par les fibroblastes, essentiellement pendant la période de croissance. Contrairement au collagène, l'élastine présente dans le tissu conjonctif possède, comme son nom l'indique, des propriétés élastiques.

La fibronectine. La fibronectine est une glycoprotéine extracellulaire ubiquitaire de haut poids moléculaire (environ 500 kDa). Elle est une protéine abondante de la MEC où elle est sécrétée par les fibroblastes sous forme de dimères solubles, assemblés ensuite en réseau fibrillaire insoluble à la surface cellulaire. Les deux monomères de la fibronectine sont reliés par deux ponts disulfures à leur extrémité C-terminale. Cette protéine existe sous plusieurs isoformes selon le type cellulaire, le tissu et le stade de développement, résultat d'un épissage alternatif. La structure compacte et repliée de la fibronectine contient plusieurs sites de liaison pour une variété de molécules à la surface cellulaire et des molécules extracellulaires. En effet, la fibronectine peut se lier simultanément à des cellules grâce à des molécules d'adhérence, notamment les intégrines, et à d'autres molécules de la MEC (collagènes, protéoglycanes), y compris à une autre molécule de fibronectine (Vakonakis & Campbell 2007). Ainsi, le rôle majeur de la fibronectine est l'adhérence cellulaire avec le tissu stromal, mais elle intervient aussi comme site de stockage de différents facteurs de croissance et régule la prolifération et la différenciation cellulaire (Steward et al. 2011).

La laminine. Il s'agit d'une glycoprotéine majeure dans la membrane basale, composée de trois chaînes α , β , et γ qui fixent les intégrines. La laminine joue un rôle en

s'associant avec la fibronectine et les protéines fibrillaires comme substrat pour la migration cellulaire.

Les GAG et les protéoglycanes. Les GAG sont de longues chaînes polysaccharidiques linéaires, formées de la répétition d'un même motif disaccharidique. Les principaux GAG présents dans la MEC existent sous cinq formes : l'acide hyaluronique, le chondroïtine-sulfate, le dermatane-sulfate, l'héparane-sulfate et enfin l'héparine. Les protéoglycanes tels que l'aggrécane, le perlécan et la décorine sont des protéines chargées négativement formées par un noyau protéique sur lequel se lient de manière covalente la plupart des GAG (sauf l'acide hyaluronique).

Remodelage de la MEC durant le développement tumoral

Dans un tissu sain, des structures d'adhérence sont mises en place afin d'assurer une bonne architecture cellulaire. Ainsi, les cellules épithéliales sont non seulement jointes les unes aux autres via les jonctions intercellulaires mais sont aussi liées à une MEC spécialisée, la membrane basale, par l'intermédiaire des intégrines. Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires responsables de l'ancrage des cellules à la MEC via la création des points focaux d'adhésion. Elles jouent également le rôle de récepteurs capables de transmettre des signaux de la cellule à la matrice et inversement. Il existe de nombreuses anomalies de l'expression des intégrines au niveau des tumeurs. D'ailleurs, l'inhibition de la signalisation de certaines intégrines réprimait l'invasion et la migration des cellules cancéreuses (Ju et al. 2017; Ali et al. 2017; Masaki Kobayashi et al. 2017). La désolidarisation des cellules cancéreuses de la membrane basale constitue une des premières étapes de l'invasion tumorale et corrèle avec un mauvais pronostic (Ramovs et al. 2018; Liu et al. 2018). Par la suite, les cellules cancéreuses traversent le stroma jusqu'à atteindre un vaisseau sanguin. Au cours de ce processus, la MEC subit un important remodelage. Celui-ci implique deux événements dont l'équilibre s'avère important : d'un côté, la synthèse et l'assemblage des constituants de la MEC par les cellules stromales et de l'autre, la dégradation par clivage protéolytique de ces composantes matricielles par les enzymes protéolytiques.

Les cellules qui composent le microenvironnement tumoral ont la capacité de produire une MEC favorisant le potentiel migratoire et invasif des cellules cancéreuses. La composition même de la MEC est altérée durant la tumorigenèse. Ainsi, certains gènes, réprimés après la naissance et réactivés seulement en condition pathologique comme la cicatrisation, sont surexprimés dans le microenvironnement tumoral du cancer de la vessie, tels que la ténascine C, la décorine, l'élastine et le collagène IV (Midwood & Orend 2009; Tucker & Chiquet-Ehrismann 2009). Dans un tissu vésical sain, la ténascine C, très faiblement exprimée, est située dans la membrane basale; toutefois, une augmentation de son expression et une présence diffuse dans tout le stroma des tumeurs invasives corrèle avec un mauvais pronostic (Brunner & Tzankov 2007).

L'organisation spatiale des fibres de collagène est elle aussi modifiée afin de faciliter l'invasion tumorale. Par exemple, dans un tissu sain, les fibres de collagène sont disposés dans la membrane basale de façon à former un angle de 10° tandis que dans un tissu cancéreux, ces fibres ont plutôt un angle de 50° (Adur et al. 2014). Dans le compartiment stromal, une désorganisation des fibres de collagène a été observée dans les premiers stades du cancer, alors qu'au stade IV, le stroma était plus dense et les fibres de collagène étaient toutes alignées (Birk et al. 2014).

Une caractéristique importante de la MEC contribuant au développement tumoral est son élasticité, qui va de souple et malléable à ferme et rigide. L'augmentation de la rigidité de la matrice est typique de la plupart des tumeurs solides et ces changements peuvent être dus à différents mécanismes. Par exemple, dans le microenvironnement tumoral, l'activité intensive de la lysyl oxydase (LOX), une enzyme induite par l'hypoxie, favorise la réticulation par désamination oxydative des résidus lysine et hydroxylysine des fibres de collagène/élastine, augmentant ainsi la rigidité du tissu. Une régulation à la hausse de l'expression de la LOX et sa localisation au front invasif des tumeurs infiltrantes ont été observées dans plusieurs cancers, dont celui de la vessie, et ont été associées à un mauvais pronostic (Barker et al. 2012; Gross-Cohen et al. 2016; Reynaud et al. 2017). La réticulation du collagène médiée par LOX dans des modèles de cancer colorectal *in vitro* et *in vivo*, a conduit à une augmentation de la rigidité tissulaire et à l'activation de la voie de signalisation FAK (Baker et al. 2012). En conséquence, les cellules exprimant des niveaux élevés de la protéine LOX ont une capacité accrue à proliférer, envahir et métastaser, des données qui supportent la corrélation entre un stroma plus rigide et l'agressivité du cancer.

La dégradation de la MEC est un processus important lors de l'initiation de l'invasion locale. En plus de devoir se désolidariser de la tumeur, les cellules cancéreuses doivent souvent dégrader la MEC sur laquelle elles reposent afin de permettre la formation d'espaces dans lesquels les cellules vont pouvoir migrer. Une classe de protéases est particulièrement impliquée dans la dégradation protéolytique de la MEC, soit les MMP. À ce jour, la famille des MMP compte 23 protéines codées par des gènes différents (Page-McCaw et al. 2007). Les MMP sont des enzymes protéolytiques qui requièrent la liaison des ions Ca^{2+} et Zn^{2+} comme cofacteurs afin d'acquérir leur activité enzymatique. Toutes les MMP sont constituées de différents domaines structuraux communs, incluant en N-terminal un peptide signal, un prodomaine et un domaine catalytique. Tandis que la plupart des MMP sont sécrétées, certaines demeurent liées aux membranes cellulaires. Les MMP membranaires (MT-MMP) possèdent à leur extrémité C-terminale, soit un domaine transmembranaire de type I suivi d'une queue cytoplasmique, soit un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) permettant l'ancrage membranaire de l'enzyme à la surface de la cellule. Les MMP existent sous trois formes: la forme inactive pro-MMP, la forme active MMP et la forme inhibée par les TIMP. Les membres de la famille des MMP sont classés selon leur substrat: les collagénases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), les gélatinases (MMP-2, MMP-9), les stromélysines (MMP-3, MMP-10, MMP-11), les matrilysines (MMP-7, MMP-26), les MMP membranaires (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25), la métalloélastase (MMP-12), l'énamélysine (MMP-20) et les autres MMP (MMP-19, MMP-21, MMP-23A/B, MMP-27, MMP-28). Les substrats naturels sensibles au clivage des différentes MMP sont nombreux, dont des protéines matricielles extracellulaires (collagènes, laminine, fibronectine, ténascine, élastine et protéoglycanes) ainsi que des substrats non matriciels (cytokines, facteurs de croissance, récepteurs, sérine-protéases, MMP, inhibiteurs de protéases, molécules d'adhésion cellulaire). Dans le microenvironnement tumoral, les MMP participent donc à la dégradation des composantes de la MEC, la libération de facteurs liés à la matrice, l'activation ou l'inhibition des facteurs de croissance/cytokines et leurs récepteurs, l'activation ou l'inhibition d'autres protéases, la destruction des inhibiteurs de protéases et la dégradation des molécules d'adhésion cellulaire. Par conséquent, les tumeurs sécrétant de grandes quantités de MMP ont généralement un potentiel invasif élevé et une agressivité

importante (Egeblad et al. 2010). Inversement, l'inhibition des MMP diminue l'invasion tumorale et inhibe la formation de métastases (Mack & Marshall 2010). Les cellules cancéreuses ne sont pas les seules cellules du microenvironnement tumoral à sécréter des MMP, les CAF et les macrophages ont également cette capacité (Egeblad et al. 2005).

Le TGF β

La famille du TGF β est composée d'une trentaine de membres regroupés en 3 classes, soit les TGF β , les activines et les BMP. Il existe trois isoformes du TGF β , le TGF β 1, le TGF β 2 et le TGF β 3, qui possèdent une structure similaire. Le TGF β est sécrété sous forme d'un précurseur latent constitué d'un peptide signal de sécrétion dans sa région amino-terminale, d'une région centrale appelée *latency-associated peptide* (LAP) et d'une région carboxy-terminale constituant le TGF β . Le LAP est, quant à lui, associé de façon covalente au *latent TGF- β binding proteins* (LTBP). Alors que le LAP est responsable de la latence du TGF β , le LTBP permet la fixation du TGF β à la MEC et son stockage. Ainsi, le complexe requiert une maturation par clivage protéolytique pour libérer la forme bioactive du TGF β et lui permettre de se fixer à son récepteur et induire une réponse cellulaire.

Le TGF β joue un rôle primordial dans la détermination du devenir cellulaire au cours de l'embryogenèse et contrôle un large spectre de réponses biologiques chez l'adulte. En effet, le TGF β possède des activités pléiotropes l'impliquant dans la croissance cellulaire, le renouvellement de la MEC, les interactions épithélio-mésenchymateuses, la réparation tissulaire et la réponse immunitaire (Massagué 2012). Ainsi, une dérégulation de la signalisation du TGF β induit d'importantes anomalies dans le développement embryonnaire et est impliquée dans différentes pathologies comme la fibrose, les maladies auto-immunes et le cancer.

Signalisation

Une fois sous sa forme mature, le TGF β induit une réponse cellulaire en se fixant à ses récepteurs spécifiques, TGFR1 et TGFR2, composés d'une petite région extracellulaire riche en cystéines et d'un domaine intracellulaire dans lequel est situé son domaine sérine/thréonine kinase (Figure 5). TGFR2 a une activité kinase intrinsèque alors que TGFR1 doit être phosphorylé pour être actif. Le TGF β se fixe à TGFR2, formant ainsi un

complexe hétérodimérique qui peut alors recruter TGF β 1 et l'activer par la phosphorylation de résidus sérines et thréonines (Massagué 2012).

La transmission du signal des récepteurs jusqu'au noyau est assurée principalement par la phosphorylation d'une famille de protéines appelée SMAD. Cette famille est divisée en trois groupes fonctionnels différents: les Smads associés au récepteur (Smad2 et Smad3), le co-Smad (Smad4) et le Smad inhibiteur (Smad7). Une fois actif, le TGF β 1 phosphoryle Smad2 et Smad3 sur deux résidus sérines ce qui permet le recrutement de Smad4. Ce complexe Smad2/3/4 migre vers le noyau et se lie à l'ADN, soit directement ou encore en association avec d'autres protéines, où il joue le rôle de facteur de transcription. Smad7 est impliqué dans la régulation de la signalisation du TGF β en s'associant au TGF β 1 activé afin d'empêcher la phosphorylation de Smad2 et Smad3. De plus, Smad7 peut recruter deux ubiquitine ligases E3, soit Smurf1 et Smurf2, au niveau du TGF β 1 activé, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome (Massagué 2012).

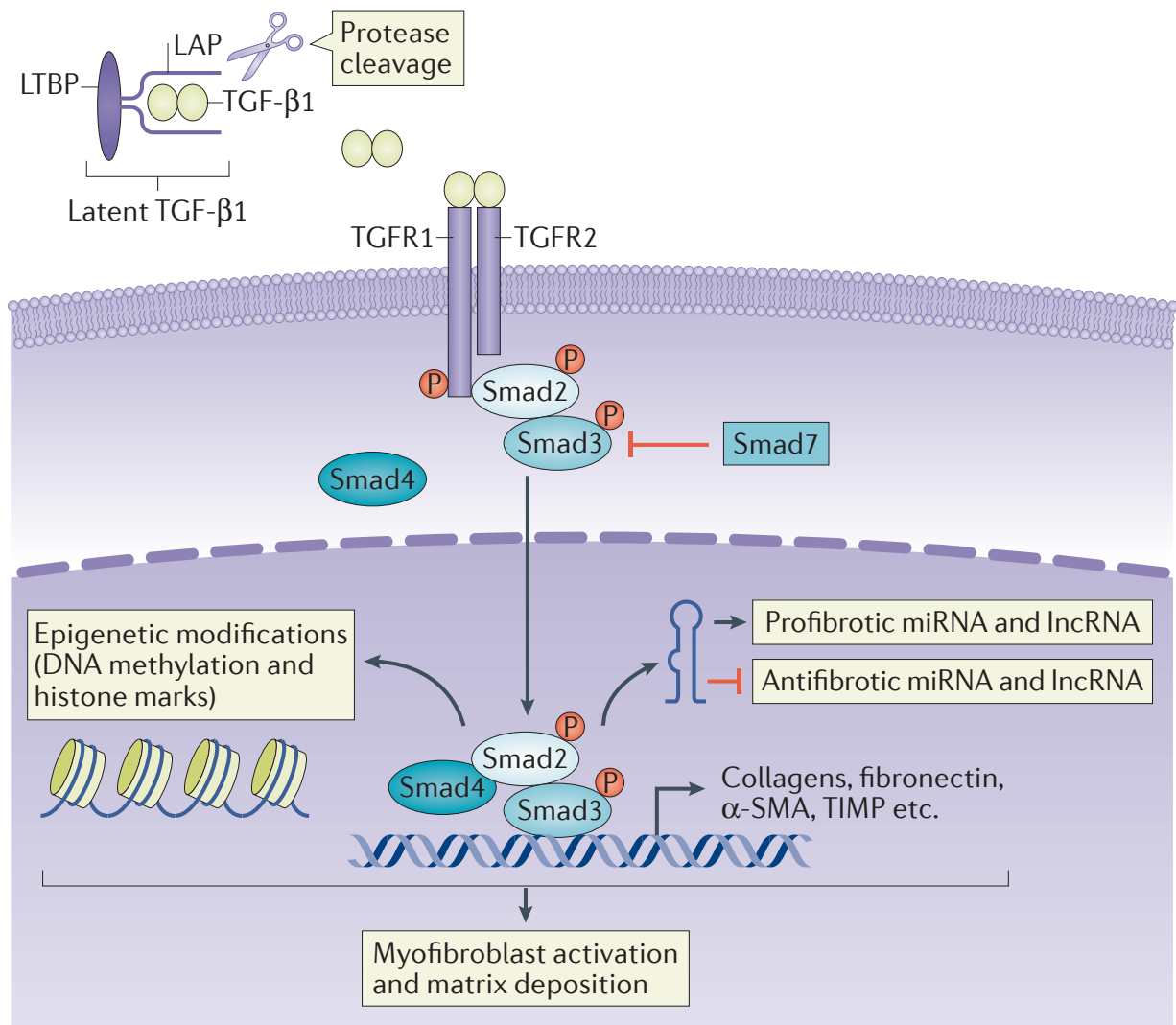


Figure 1.5 | Vue d'ensemble de la signalisation canonique de TGFβ.

Une fois libérée du complexe de latence (LTBP/LAP/TGFβ), la forme active du TGFβ se lie au récepteur TGFR2, qui recrute et active TGFR1. Le TGFR1 actif phosphoryle ensuite Smad2 et Smad3, qui complexent avec Smad4 et transloquent vers le noyau pour induire la transcription de gènes. Tirée de Meng et al., 2016.

Rôles physiopathologiques

Le TGFβ et la fibrose. La fibrose apparaît lorsqu'une lésion tissulaire ne parvient pas à cicatriser normalement et elle est caractérisée par une persistance du tissu de granulation et une production excessive de MEC provoquant un durcissement du tissu. La surexpression du TGFβ et la dérégulation de la voie de signalisation des Smad, impliquant l'augmentation de la phosphorylation des Smad2/3 et/ou leur accumulation nucléaire, ou encore la réduction de l'expression de Smad7 ont été observées dans un contexte de fibrose

(Kim et al. 2018; Györfi et al. 2018). Le TGF β induit des réponses pro-fibrotiques *in vitro* et *in vivo*, en augmentant l'expression des composants de la MEC, en réprimant les enzymes cataboliques et en induisant la prolifération des fibroblastes ainsi que leur transdifférenciation en myofibroblastes (Walton et al. 2017; Meng et al. 2016). À leur tour, les myofibroblastes sécrètent du TGF β , ce qui maintient leur activation et participe au processus de fibrose.

Le TGF β et le cancer. Dans un stade pré-malin, le TGF β sécrété par les cellules cancéreuses ou stromales peut induire un arrêt du cycle cellulaire, favoriser l'apoptose et ainsi jouer un rôle suppresseur de tumeur. La résistance aux effets anti-prolifératifs exercés par le TGF β est une caractéristique de nombreuses cellules cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses contournent souvent ces effets cytostatiques/apoptotiques en mutant des acteurs clés le long de la voie du TGF β . Par exemple, la présence de mutations inactivatrices dans les gènes codant pour les récepteurs au TGF β et les protéines Smad est fréquemment observée dans différents cancers (Colak & Dijke 2017).

Cependant, le TGF β peut devenir un facteur pro-oncogénique dans les stades tardifs du développement tumoral, ce qui exacerbe le phénotype malin des cellules cancéreuses (J. J. Huang & Blobel 2016). Le TGF β sécrété par les cellules cancéreuses favorise l'EMT, l'invasion et la formation de métastases (Zhao et al. 2018). Il joue également un rôle important dans la régulation des cellules stromales dans le microenvironnement tumoral. Le TGF β a de puissants effets immunosuppresseurs sur les cellules immunitaires innées et adaptatives, y compris les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules NK et les cellules T CD4⁺ et CD8⁺. De plus, le TGF β stimule la différenciation des lymphocytes Treg immunosuppresseurs (Colak & Dijke 2017). Enfin, il peut contribuer indirectement à la croissance tumorale en stimulant la production de facteurs angiogéniques.

Les CAF

Origine et marqueurs

Les CAF constituent le type cellulaire le plus abondant du microenvironnement tumoral. Ce sont des fibroblastes activés qui partagent plusieurs similitudes avec des fibroblastes que l'on retrouve dans les tissus fibrotiques ou pendant la phase de cicatrisation d'une plaie

(Chang et al. 2002). Contrairement à la cicatrisation d'une plaie mais de façon similaire à l'état de fibrose d'un tissu, les CAF sont activés en permanence jusqu'à atteindre un niveau irréversible notamment via une régulation épigénétique (Marsh et al. 2013; Mrazek et al. 2014; Albrengues et al. 2018). Leur présence au sein d'une tumeur est associée à un mauvais pronostic (Owusu et al. 2015; Surowiak et al. 2006). Les différentes origines cellulaires et la composition en facteurs du microenvironnement tumoral façonnent le phénotype des CAF et contribuent à leur hétérogénéité. Bien qu'ils semblent trouver leur origine de plusieurs types cellulaires, incluant les cellules musculaires lisses, les péricytes, les cellules souches mésenchymateuses (MSC), les adipocytes et les cellules épithéliales, les fibroblastes locaux sont largement considérés comme étant la source principale de CAF (Räsänen & Vaheri 2010; Egeblad et al. 2010). Cependant, il n'est pas clair encore si certains types de tumeurs partagent une source commune de CAF, si les différentes origines cellulaires donnent lieu à des sous-populations de CAF et dans quelle mesure les différentes sources contribuent aux différentes populations de CAF dans une tumeur donnée.

Les fibroblastes sains adoptent un état quiescent caractérisé par une activité transcriptionnelle et métabolique faible. Par conséquent, la comparaison du profil d'expression génique des fibroblastes sains et des CAF révèle que les CAF ne possèdent pas de marqueur unique mais produisent une variété de facteurs qui ne sont que très faiblement exprimés chez les fibroblastes sains. Ainsi, les CAF sont identifiés de par une expression accrue, entre autres, de l'*alpha smooth muscle actin* (α SMA), la *fibroblast-specific protein 1* (FSP1), le *platelet-derived growth factor* (PDGF) et la *fibroblast activation protein alpha* (FAP) (Sugimoto et al. 2006). Les CAF sont caractérisés également par leur sécrétion importante de cytokines, de chimiokines (e.g. IL-6, CXCL8, CXCL12) et facteurs de croissance comprenant le VEGF, le TGF β , le facteur de croissance hépatocellulaire (HGF), le facteur de croissance épidermique (EGF) ou le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), et expriment des récepteurs tels que le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes alpha (PDGFR α) et le PDGFR β . Ces facteurs solubles sont impliqués non seulement dans la signalisation paracrine mais contribuent aussi à activer les CAF de façon autocrines, participant ainsi au maintien du phénotype CAF (Aoto et al. 2018; Gialeli et al. 2014). D'autres marqueurs, utilisés de façon plus marginale, sont rapportés dans la littérature, comme par exemple la galectine-1, une

protéine surexprimée dans les CAF provenant des cancers du sein, de la bouche et gastrique (Zhu et al. 2016; M.-H. Wu et al. 2011; Tang et al. 2015). Une étude menée par Orr et al. a révélé des marqueurs qui distinguent les CAF issus du cancer de la prostate de leurs homologues sains tels que ASPN, ZEB1 et OGN (Orr et al. 2011). La glycoprotéine podoplanine a également été suggérée comme un marqueur des CAF et son potentiel pronostique a d'ailleurs été démontré pour les tumeurs mammaires (Pula et al. 2013). Cependant, tous les marqueurs de CAF décrits ci-haut ne sont pas uniques et sont exprimés par d'autres types cellulaires, reflétant la complexité de leur identification et l'importance d'utiliser une combinaison de plusieurs marqueurs.

Les fibroblastes sains comprennent une population hétérogène de cellules présentant un patron de différenciation topographique, c'est-à-dire que les fibroblastes expriment un programme transcriptionnel en fonction de leur localisation anatomique (Chang et al. 2002). En conséquence, cette hétérogénéité est susceptible d'affecter le phénotype adopté par les CAF de différents sites anatomiques. Une divergence au sein d'un même tissu est également observée, de sorte que les marqueurs de CAF ne sont pas uniformément exprimés sur ces cellules et définissent alors des sous-populations de CAF. Sugimoto et al. ont été les premiers à décrire différents sous-types de CAF basés sur l'analyse de l'expression de FSP1, PDGFR β , NG2 et α SMA dans des modèles murins des cancers du pancréas et du sein (Sugimoto et al. 2006). Fait intéressant, les résultats des deux modèles étaient plutôt similaires et ont révélé un sous-type de CAF qui est caractérisé par la co-expression de PDGFR β , α SMA et NG2, tandis que l'expression de FSP1 était associée à un autre sous-type de CAF. De plus, l'analyse de l'expression génique de CAF provenant des trois types prédominants de cancer du sein (ER+, triple négatif et Her2+) a révélé un profil moléculaire caractéristique pour chacun (Tchou et al. 2012). Enfin, Öhlund et al. ont identifié une autre sous-population de CAF dans le cancer du pancréas, située à distance des cellules cancéreuses, qui n'exprime pas α SMA et qui a une sécrétion marquée d'IL-6 (Öhlund et al. 2017). Malgré ces quelques études, le nombre de sous-populations de CAF existantes et les facteurs influençant ces différentes sous-populations sont peu connus. On peut par conséquent se questionner à savoir si ces différentes sous-populations ont des fonctions distinctes.

Activation des fibroblastes sains en CAF

Les mécanismes d'action impliqués dans l'activation des fibroblastes en CAF ne sont pas encore très bien compris. Les fibroblastes résidents acquerreraient progressivement le phénotype CAF sous l'influence de différents facteurs solubles sécrétés par les cellules cancéreuses (Figure 6). Par exemple, une exposition des fibroblastes sains au milieu conditionné par des cellules cancéreuses a induit une différenciation de ceux-ci en CAF (Henriksson et al. 2011; Y. Yu et al. 2013). Les signaux exogènes conduisant à l'activation des fibroblastes dans le microenvironnement tumoral sont nombreux et probablement distincts pour différents types de tumeurs. Actuellement, le TGF β est le facteur le plus étudié dans l'activation des fibroblastes du microenvironnement tumoral (Lohr et al. 2001; Cat 2006). D'ailleurs, *in vitro*, certains phénotypes des CAF peuvent être induits en supplémentant le milieu de culture des fibroblastes sains avec du TGF β (Midgley et al. 2013). En co-culture, il a été montré que la sécrétion de TGF β par des cellules cancéreuses du côlon, du sein et de la peau stimulait la transition des fibroblastes en CAF (Casey et al. 2008; Lewis et al. 2004). D'autres facteurs seraient également impliqués dans l'activation des fibroblastes. L'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire, est produite en grande quantité par les cellules cancéreuses. Elle induit une forte augmentation de l'expression du marqueur FAP, mais pas de α SMA, couplée à une sécrétion accrue de protéines de la MEC chez les fibroblastes (Giannoni et al. 2010). Ces CAF activés par l'IL-6 favoriseraient la migration et l'invasion de cellules cancéreuses prostatiques (Giannoni et al. 2010). Mitra et al. ont démontré que les cellules cancéreuses de l'ovaire induisaient la transformation des fibroblastes en CAF via l'action des microARN miR-31, miR-214 et miR-155 (Mitra et al. 2012). Enfin, le facteur de croissance HGF serait responsable de l'activation des CAF dans le microenvironnement du cancer gastrique (Wu et al. 2013). Dans le cancer de la prostate, le CXCL16 se liant au CXCR6 sur les fibroblastes induit l'activation de ceux-ci en CAF (Jung 2013). Une fois activés, ces CAF possèdent une prolifération plus marquée, une capacité migratoire augmentée et une sécrétion de facteurs plus abondante que les fibroblastes sains.

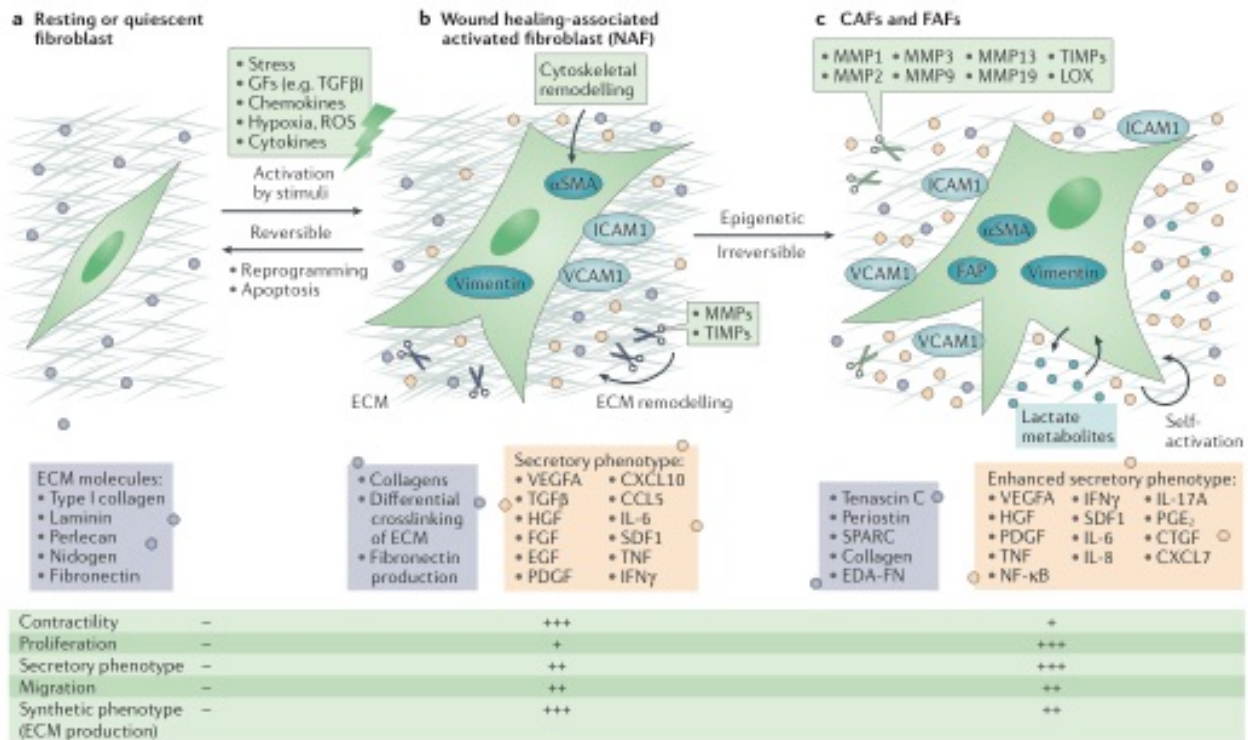


Figure 1.6 | Activation en plusieurs étapes des fibroblastes.

A. Les fibroblastes sains sont quiescents et sont en forme de fuseau dans l'espace interstitiel intégré dans la MEC physiologique. **B.** En réponse à une lésion tissulaire et aux stimuli associés, les fibroblastes quiescents sont activés de manière réversible pour faciliter la réparation et la régénération du tissu. Les fibroblastes activés normaux (NAF) acquièrent l'expression de l' α SMA et de la vimentine et adoptent une forme étoilée. Avec une production accrue de protéines matricielles, le remodelage de la MEC et les réarrangements de leur cytosquelette, les NAF acquièrent des propriétés contractiles. À ces fonctions s'ajoutent des propriétés sécrétoires autocrines qui amplifient leur activation, leur recrutement et leur prolifération. La réversibilité d'une telle activation peut être médiée par une reprogrammation ou une apoptose des NAF suite à la cicatrisation de la plaie une fois le processus de réparation terminé. **C.** Dans un contexte d'activation chronique et persistante, tels que la fibrose (FAF) ou le cancer (CAF), les fibroblastes vont présenter un sécrétome étendu, une capacité accrue de remodelage de la MEC, une activation autocrine robuste et des fonctions de signalisation immunomodulatrices dynamiques. Ces cellules subissent alors des modifications épigénétiques rendant leur retour à un état quiescent impossible. Tirée de Kalluri, 2016.

Rôles des CAF dans le microenvironnement tumoral

Bien qu'il existe encore des doutes à savoir si les CAF sont en mesure d'induire une transformation maligne des cellules épithéliales saines (en absence de mutations oncogéniques), il existe des évidences convaincantes que les CAF favorisent non seulement la prolifération des cellules cancéreuses, la migration, l'invasion tumorale et la formation de métastases mais seraient également impliqués dans l'angiogenèse, le remodelage

matriciel et la résistance aux drogues (Figure 7) (Cai et al. 2011; Subramaniam et al. 2013). En effet, il a été montré que les CAF, en co-culture ou greffés chez la souris, stimulent la prolifération ainsi que la transformation maligne de cellules épithéliales prostatiques (Olumi et al. 1999; Hayward et al. 2001). De plus, la transplantation de cellules cancéreuses et de CAF chez la souris donne lieu à des tumeurs plus agressives que celles où les cellules cancéreuses ont été transplantées seules ou avec des fibroblastes sains. D'ailleurs, ces tumeurs manifestent une résistance exacerbée aux chimiothérapies (Qian et al. 2003; Wilson et al. 2012). Enfin, les tumeurs formées suite à la greffe de cellules cancéreuses *in vivo* sont significativement réduites en taille lorsqu'elles sont injectées dans des souris déficientes pour FSP1, un des marqueurs exprimés par les CAF (Grum-Schwensen et al. 2005).

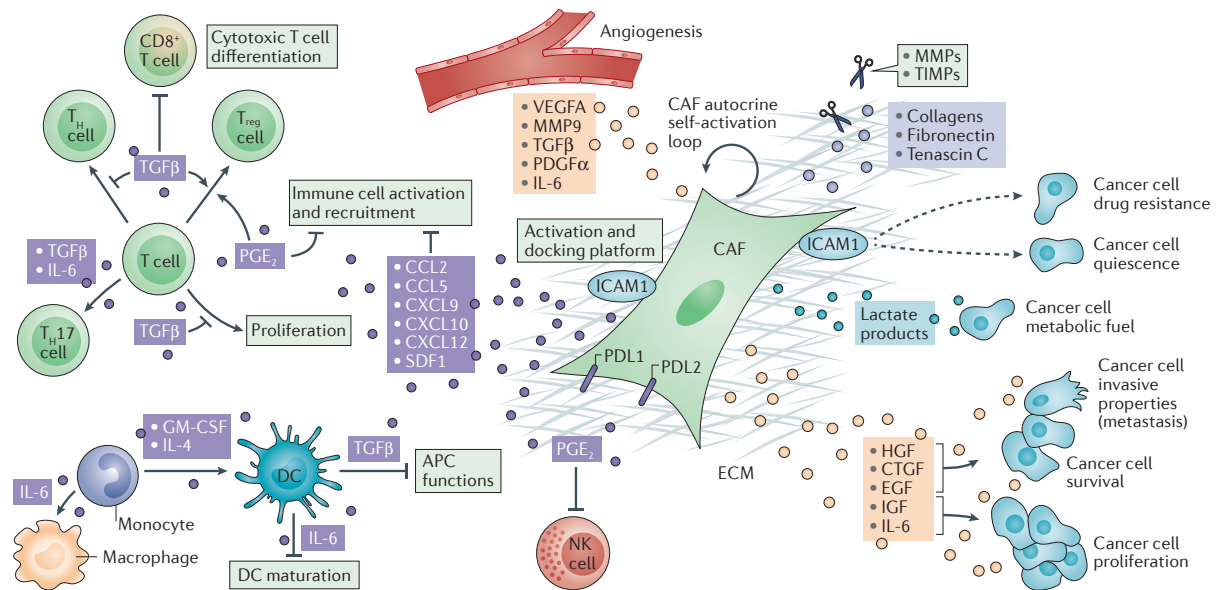


Figure 1.7 | Les CAF et leur sécrétome remodelent le microenvironnement tumoral.

La matrice extracellulaire (MEC) ainsi que les composantes cellulaires du microenvironnement tumoral sont activement remodelées et reprogrammées par les CAF. Le sécrétome des CAF médie la reprogrammation immunitaire (à gauche), entretient l'activation autocrine des CAF (au centre), et engage les cellules cancéreuses (à droite), favorisant ou restreignant leur croissance, leur survie et leur résistance à la thérapie. Les molécules sécrétées par les CAF exercent de puissants effets sur l'immunité tumorale, affectant le recrutement et l'activation des cellules immunitaires innées, et polarisant la réponse immunitaire adaptative. Les CAF soutiennent également fortement l'angiogenèse tumorale, qui affecte indirectement le recrutement et l'activation des cellules immunitaires, ainsi que les propriétés migratoires et invasives des cellules cancéreuses. La reprogrammation métabolique des CAF peut également alimenter les cellules cancéreuses via leur production de lactate et améliorer leur adaptation au microenvironnement tumoral. Tirée de Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. Nat Rev Cancer. 2016 Aug 23;16(9):582-98.

CAF et tumorigenèse. Les mécanismes moléculaires qui permettent aux CAF d'exercer leur effet tumorigénique ne sont que peu caractérisés. Globalement, l'activité pro-tumorale des CAF serait principalement exercée via la sécrétion de facteurs solubles tels que des cytokines/chimiokines et des facteurs de croissance.

Par exemple, en se liant à son récepteur CXCR4 à la surface des cellules cancéreuses, la chimiokine CXCL12, sécrétée par les CAF, favoriserait la prolifération des cellules dans le cancer du sein, l'EMT dans les cancers gastrique et de la prostate, ainsi que la migration des cellules dans les cancers de l'endomètre et de la prostate (Orimo et al. 2005; Teng et al. 2016; Lee et al. 2015; Jung et al. 2013; Maxwell et al. 2014).

L'IL-6 présente dans les milieux conditionnés par les CAF favorisait l'invasion des cellules de mélanome cultivées en sphéroïdes dans une matrice de collagène de type I (Jobe et al. 2018). La co-culture des CAF avec des cellules de mélanome a induit également la sécrétion d'IL-8, alors que l'inhibition des IL-6 et IL-8 a renversé le potentiel invasif de ces cellules. De plus, l'acide rétinoïque, une molécule lipophile dérivée de la vitamine A, peut exercer des effets thérapeutiques en diminuant la sécrétion d'IL-6 par les CAF, limitant ainsi la migration et l'induction de l'EMT des cellules cancéreuses pancréatiques (Guan et al. 2014; Carapuca et al. 2016).

Il a été montré que les CAF sécrètent des taux importants de TGF β (Calon et al. 2014). En outre, le TGF β présent dans les milieux conditionnés par des CAF a stimulé l'EMT dans différentes lignées cellulaires de cancer du sein, qui ont montré une hausse de l'expression de marqueurs mésenchymateux, comme la vimentine, la fibronectine et les MMP2 et MMP9, ainsi qu'une invasion accrue dans le Matrigel (Yu et al. 2013). L'inhibition de la voie TGF β a renversé les effets du milieu conditionné par les CAF sur les cellules cancéreuses. Des effets similaires ont également été observés dans d'autres types de cancers, tels que les cancers gastrique, colorectal et vésical (Zhuang et al. 2015; Fuyuhiro et al. 2012; Kim et al. 2015).

Les CAF sécrètent également des niveaux élevés de HGF et de ténascine C, qui sont nécessaires à l'invasion des cellules cancéreuses du côlon, aussi bien dans le Matrigel que dans les gels de collagène de type I (De Wever 2004). Il est intéressant de noter que ces deux facteurs individuels n'étaient pas suffisants pour favoriser l'invasion des cellules cancéreuses, soulignant les rôles interdépendants de la MEC et des facteurs solubles dans la modulation du comportement des cellules cancéreuses. Le HGF sécrété par les CAF

provenant du carcinome hépatocellulaire favorise la prolifération des cellules cancéreuses et augmente leurs capacités de migration et d'invasion (Lau et al. 2016). De plus, il a été montré que le HGF libéré par les CAF favorise l'invasion des cellules cancéreuses de l'œsophage, un phénomène inhibé par l'ajout d'un siRNA ciblant le HGF dans les fibroblastes ou en altérant l'expression ou la fonction de c-Met, i.e. le récepteur du HGF, dans les cellules cancéreuses (Grugan et al. 2010). De même, l'altération de l'interaction HGF-cMet avec l'anticorps monoclonal anti-HGF ficlatuzumab a inhibé la migration et l'invasion des cellules du carcinome épidermoïde de la tête et du cou suite au traitement avec des milieux conditionnés par les CAF (Kumar et al. 2015). Ces résultats suggèrent que le ciblage de la signalisation du HGF dans les cancers inhibe la progression tumorale. D'ailleurs, des essais cliniques de phase I sont actuellement en cours avec l'anticorps ficlatuzumab pour le traitement du carcinome épidermoïde de la tête et du cou et des cancers du poumon non à petites cellules (Rizwani et al. 2015).

Le FGF sécrété par les CAF est lui aussi impliqué dans la progression tumorale. En effet, il a été montré que le FGF1 augmente la migration et l'invasion des cellules cancéreuses du côlon et que cet effet est renversé en bloquant son récepteur le FGFR3 (Henriksson et al. 2011). Les CAF expriment également d'autres isoformes de FGF tels que le FGF2, une protéine ancrée à la membrane cellulaire. Le FGF2 induit chez les cellules cancéreuses un changement de phénotype qui se traduit par une élongation de la cellule, une migration sur de plus longues distances et une invasion plus marquée dans le Matrigel (Knuchel et al. 2015). Cette étude a également montré que la tyrosine kinase Src, est activée en aval de l'activation du FGFR et que les cellules cancéreuses utilisent l'intégrine $\alpha\beta 5$ pour adhérer aux fibroblastes.

Les CAF jouent un rôle important dans la formation de métastases en remodelant la niche métastatique. En effet, Duda et al. ont montré que les cellules cancéreuses apportent avec elles des CAF provenant de la tumeur primaire vers le site métastatique et que ceux-ci, en modifiant le microenvironnement métastatique, favorise la colonisation de l'organe (Duda et al. 2010). Les CAF exprimant la ténascine C et le VEGFA sont des médiateurs clés de la dissémination du cancer du sein au poumon (OConnell et al. 2011). Les métastases hépatiques du mélanome reposent sur l'activation des cellules stellaires (les fibroblastes résidants dans le foie) pour soutenir l'angiogenèse (Olaso 1997). Dans le cancer colorectal, les CAF induits par le TGF β sécrètent de l'IL-11, améliorant la survie des

cellules cancéreuses et augmentant l'efficacité de la colonisation des organes secondaires (Calon et al. 2012). Les CAF, induits par le PDGF, augmentent également l'intravasation des cellules cancéreuses colorectales et la formation de métastases à distance via la sécrétion de stanniocalcin 1 (Pena et al. 2013). La fibronectine associée au microenvironnement du poumon et les cellules VEGFR1+ de la moelle osseuse sont impliquées dans le processus métastatique des cellules de mélanome (Kaplan et al. 2005).

CAF et angiogenèse. Les tumeurs sont fortement vascularisées puisqu'elles nécessitent un apport important en oxygène et en nutriments. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants est régulée par différents facteurs solubles et les CAF seraient impliqués dans ce processus. En effet, CXCL12 faciliterait l'angiogenèse en recrutant des cellules endothéliales (Orimo et al. 2005). Dans un modèle de xéno greffe, la présence de CAF contribue au développement d'un réseau vasculaire plus organisé comparativement aux fibroblastes sains (Orimo et al. 2005). De plus, la sécrétion d'IL-6 par les CAF augmente leur production de VEGF, favorisant ainsi l'angiogenèse (Nagasaki et al. 2013).

CAF et immunité tumorale. Les CAF sécrètent une variété de facteurs pro-inflammatoires tels que les IL-6, IL-4, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor (TNF), TGF β , CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10, SDF1, prostaglandine E2 (PGE2), oxyde nitrique (NO), HGF et HLAG conduisant au recrutement de cellules immunitaires aussi bien pro-cancéreuses que immunosuppressives, participant ainsi à la mise en place d'un environnement inflammatoire ou immunosuppresseur (Mace et al. 2013; Comito et al. 2013). Récemment, Lakins et al. ont montré que les CAF contribuent directement à la suppression des lymphocytes T CD8+ via PD-L2 et FasL, augmentant ainsi la viabilité tumorale (Lakins et al. 2018).

CAF et remodelage matriciel. Les fibroblastes produisent la majorité des composants de la MEC tels que les collagènes, la fibronectine et la laminine et maintiennent son homéostasie en facilitant sa dégradation via la sécrétion d'enzymes telles que les MMP. Ces propriétés confèrent aux CAF un rôle majeur dans le remodelage de la MEC. Les cancers invasifs sont souvent associés à l'expansion et à la rigidification du

stroma tumoral et à un dépôt important de MEC, un phénomène appelé desmoplasie. Plusieurs études ont montré l'implication des CAF dans ce processus notamment via une sécrétion accrue de collagène de type I, de fibronectine et de différentes protéases (Amatangelo et al. 2005; Gaggioli et al. 2007; Goetz et al. 2011).

On retrouve dans le tissu tumoral une forme particulière de fibronectine sécrétée par les CAF contenant des séquences appelées extra-domaine A et B (EDA et EDB) (Fullár et al. 2015; Oyama et al. 1993). La fibronectine-EDA est nécessaire à la transduction des signaux de TGF β et la conversion des fibroblastes en myofibroblastes (Serini et al. 1998), alors que la fibronectine-EDB est particulièrement associée aux structures néovasculaires de nombreux types de tumeurs (Castellani et al. 2002). De plus, la fibronectine est positivement associée au potentiel métastatique des tumeurs humaines et à la sécrétion de MMP (Kaplan et al. 2005).

Fait intéressant, il a été démontré que les CAF préparent le stroma pour les cellules cancéreuses en y façonnant des sillons afin que ces dernières migrent et envahissent les tissus environnants (Sanz-Moreno et al. 2011; Scott et al. 2010). En effet, les CAF réorganisent le collagène de type I en sécrétant des MMP et utilisent la force contractile médiée par la voie Rho-ROCK pour créer les sillons dans la MEC (Gaggioli et al. 2007). Ainsi, des cellules cancéreuses du sein ont montré un caractère invasif plus prononcé lorsqu'ensemencées sur une matrice produite par les CAF (Bockstal et al. 2014). Le stroma tumoral présente une plus grande rigidité, une conséquence non seulement d'un dépôt accru de protéines matricielles par les CAF, mais également d'une organisation macromoléculaire distincte, attribuable en partie à la LOX (Kasashima et al. 2014). Cette enzyme sécrétée par les CAF catalyse la réticulation du collagène et de l'élastine (Erler et al. 2006). D'ailleurs, chez la souris, un traitement avec un inhibiteur de LOX a bloqué la réticulation des fibres matricielles, ce qui s'est traduit par une réduction de la densité de la matrice et une baisse de la progression tumorale (Levental et al. 2009). De plus, la rigidité de la MEC peut contribuer à augmenter la pression du liquide interstitiel, ce qui réduit l'infiltration d'agents thérapeutiques à l'intérieur de la tumeur (Olive et al. 2009). Les CAF sécrètent également différentes protéases qui affectent directement la migration des cellules cancéreuses en les aidant à envahir le stroma non seulement en créant des sentiers de migration, mais en

permettant aussi le relargage de facteurs trappés dans la MEC (Lederle et al. 2009). Par exemple, la MMP9 sécrétée par les CAF est reconnue pour dégrader préférentiellement la laminine 322 et le collagène IV de la membrane basale ainsi que pour sa capacité à activer différents facteurs piégés dans la MEC comme le TGF β et le VEGF (Stuelten 2005).

La protéine cavéoline-1 (Cav-1) est enrichie dans le stroma des cancers du sein et du rein et elle est surexprimée par les CAF du cancer du sein. Une étude a montré l'implication de la Cav-1 dans la tumorigenèse via la modulation de la MEC (Goetz et al. 2011). Les auteurs ont montré que les fibroblastes embryonnaires de souris exprimant Cav-1 réorganisaient la fibronectine en fibres parallèles pour supporter la migration des cellules cancéreuses. Le remodelage de la matrice de fibronectine par ces fibroblastes dépendait de la contractilité cellulaire médiée par Rho. De plus, l'injection orthotopique de cellules cancéreuses dans les glandes mammaires de souris de type sauvage ou knock-out pour la Cav-1 a démontré que la perte de Cav-1 diminuait la croissance tumorale et la formation de métastases, et plus important encore, ces tumeurs devenaient peu invasives et présentaient moins de fibres de collagène. En revanche, les tumeurs développées chez les souris sauvages étaient constituées de fibres de collagène alignées radialement avec les cellules et possédaient un caractère plus invasif.

CAF et cancer de la vessie. Le microenvironnement tumoral est un aspect peu abordé par la recherche sur le cancer de la vessie. Essentiellement, cinq groupes s'y sont intéressés. D'abord, Schulte et al. ont montré qu'il existe une forte corrélation entre le grade/stade diagnostiqué et la présence de CAF dans 49 échantillons histologiques de tumeurs vésicales (Schulte et al. 2012). Ensuite, Grimm et al. ont rapporté une augmentation de la migration et de l'invasion des lignées cancéreuses vésicales RT112 et Cal-29 lorsque co-cultivées avec des CAF. De plus, les RT112 et Cal-29 induisaient chez les CAF la sécrétion des facteurs IL-8, HGF, MMP-2 et MCP-1 (Grimm et al. 2015). Dans un modèle de co-culture microfluidique, Shi et al. ont induit la différenciation de fibroblastes sains en CAF avec la lignée de cellules cancéreuses T24 (Shi et al. 2015). De plus, ces CAF possédaient une meilleure capacité à produire du lactate, une source d'énergie pour les cellules cancéreuses, ce qui a favorisé la prolifération des T24. Zhuang et al. ont montré que le TGF β sécrété par les CAF induisaient l'EMT des cellules cancéreuses

vésicales via le long ARN non-codant ZEB2NAT (Zhuang et al. 2015). Enfin, l'étude menée par Miyake et al. a mis en évidence le rôle de la chimiokine CXCL1 produite par les CAF dans la progression tumorale du cancer de la vessie (Miyake et al. 2016). En effet, l'analyse de 155 biopsies de patients a révélé qu'un niveau élevé de CXCL1 corrélait avec un potentiel métastatique élevé et un mauvais pronostic. De plus, les CAF sur-exprimant le CXCL1 ont favorisé la croissance de tumeurs vésicales, autant dans un modèle murin sous-cutané que dans un modèle orthotopique, lorsqu'injectés ensemble.

Effet des CAF sur les cellules épithéliales saines

Certaines études se sont intéressées au rôle joué par les fibroblastes stromaux dans l'établissement d'une niche favorable à l'initiation d'une tumeur. Les résultats montrent que les CAF stimulent la croissance de cellules pré-néoplasiques *in vitro* et dans les modèles de xénogreffe (Pazolli et al. 2009) et induisent des altérations cellulaires conduisant à une transformation maligne des cellules épithéliales saines (Hayward et al. 2001; Bhowmick et al. 2004). De plus, les CAF co-incubés avec des exosomes dérivés de tumeurs ont acquis la capacité de transformer les cellules épithéliales normales en cellules présentant un phénotype pré-malin (Olumi et al. 1999). Les changements induits dans ces cellules épithéliales incluaient un aspect pléomorphe, une mitose aberrante, une perte de polarité, une altération de l'expression des protéines du cycle cellulaire et une augmentation de la prolifération (Olumi et al. 1999).

Le maintien de l'homéostasie tissulaire est crucial pour la préservation de la morphologie normale des tissus et du bon fonctionnement des organes. Dans les tissus adultes, cette tâche est finement contrôlée par le compartiment stromal grâce à des interactions entre les différents types de cellules et la production des composants de la MEC qui assurent une bonne architecture et la fonction des tissus. Ainsi, les fibroblastes normaux peuvent ralentir la prolifération des cellules cancéreuses induite par les CAF (Sadlonova et al. 2004). De plus, les fibroblastes normaux ont démontré leur capacité à convertir des cellules malignes de la prostate et de la peau en lésions bénignes du point de vue morphologique (Cooper & Pinkus 1977; Hayashi & Cunha 1991).

Chapitre 2 - Problématique, hypothèses et objectifs de recherche

Au cours des dernières années, de nombreuses évidences ont mis en lumière l'importance du microenvironnement tumoral dans le développement et la progression du cancer. Parmi les nombreux intervenants du microenvironnement tumoral, les CAF semblent jouer un rôle prépondérant dans la tumorigenèse. Ainsi, un contrôle précis de leur activation rend l'étude des mécanismes impliqués dans cette étape cruciale d'un intérêt considérable. L'objectif principal de cette thèse était d'étudier l'impact des interactions entre les cellules cancéreuses et les fibroblastes du microenvironnement tumoral sur l'activation des CAF et la progression tumorale.

Des études ont montré la capacité des cellules cancéreuses à activer les fibroblastes sains en CAF de façon paracrine, notamment via la sécrétion de cytokines telles que le TGF β (Chen et al. 2009; Ishimoto et al. 2017; Walton et al. 2017; Colak & Dijke 2017). Les cellules cancéreuses sécrètent également une grande quantité d'exosomes, de petites vésicules extracellulaires transportant différents facteurs biologiques, qui ont la capacité de moduler le microenvironnement tumoral (Zhang et al. 2015). En dépit d'une implication potentielle des exosomes dans l'activation des fibroblastes en CAF, le rôle de ceux-ci et la nature des facteurs qu'ils transportent sont encore très peu connus. **Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que le TGF β transporté par des exosomes issus de cellules cancéreuses de la vessie activerait les fibroblastes vésicaux sains en CAF.** Le premier volet de mon projet de doctorat proposait donc de vérifier cette hypothèse grâce à trois objectifs spécifiques (Chapitre 3):

1. Isoler et caractériser les exosomes sécrétés par les cellules cancéreuses de la vessie.
2. Évaluer le potentiel de ces exosomes à activer les fibroblastes vésicaux en CAF.
3. Déterminer l'implication du TGF β dans cette activation.

Une fois activés, les CAF participent à la prolifération des cellules cancéreuses, à l'invasion tumorale, à l'angiogenèse et à la formation des métastases (Augsten 2014). Des mécanismes nombreux et variés interviennent dans la communication des CAF vers les

cellules cancéreuses, reflétant leur hétérogénéité. L'exploration du sécrétome des CAF générés au cours de cette thèse a permis d'identifier l'IL-6 comme étant une molécule fortement exprimée par ceux-ci. **Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les CAF soutiennent la progression tumorale via la sécrétion de la cytokine IL-6.** Le deuxième volet de mon projet de doctorat proposait donc d'approfondir l'effet des CAF sur les cellules cancéreuses grâce à deux objectifs spécifiques (Chapitre 4) :

4. Déterminer l'effet des CAF sur la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de la vessie.

5. Évaluer le rôle de l'IL-6 dans la progression tumorale médiée par les CAF.

Les CAF produisent une MEC distincte de la MEC d'un tissu sain, notamment par la présence de protéines oncofœtales ainsi que par l'expression augmentée d'enzymes matricielles. Ce stroma réactif supporte la progression tumorale et corrèle avec un mauvais pronostic (De Wever 2004; Z. Yang et al. 2017; Levental et al. 2009; Ni et al. 2017). **Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que la MEC générée par les CAF induit un phénotype pro-tumoral dans les cellules urothéliales saines.** Le troisième volet de mon projet de doctorat s'attardait donc à vérifier cette hypothèse en s'appuyant sur 2 objectifs spécifiques (Chapitre 5):

6. Caractériser la MEC produite par les CAF induits *in vitro*.

7. Définir l'impact de la MEC produite par les CAF sur les cellules urothéliales saines, principalement sur leur potentiel migratoire et sur l'expression de marqueurs de l'EMT.

Chapitre 3 - Les exosomes issus de cellules cancéreuses induisent la différenciation des fibroblastes en CAF via la voie de signalisation du TGFβ.

Auteurs :

Cassandra R Goulet, Geneviève Bernard, Sarah Tremblay, Stéphane Chabaud, Stéphane Bolduc & Frédéric Pouliot.

Contributions des auteurs :

J'ai participé à la conception des expériences, à leur réalisation, à la conception des méthodes d'analyse, à l'analyse des résultats, à la conception et à la préparation des tableaux et des figures. J'ai rédigé l'ensemble de la première version du manuscrit et participé au peaufinage de la version finale. Geneviève Bernard et Sarah Tremblay ont réalisé certaines expériences. Stéphane Chabaud a participé à l'écriture du manuscrit. Les Prs Stéphane Bolduc et Frédéric Pouliot ont supervisé les travaux.

Article publié dans :

Molecular Cancer Research 2018:16(7);1196-1204

Impact Factor : 4.9

Résumé

Une interaction étroite dans le microenvironnement tumoral (TME) existe entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales environnantes. Les fibroblastes, en réponse aux cellules cancéreuses, adoptent l'état activé et présentent des caractéristiques myofibroblastiques favorisant la progression tumorale et les métastases. Cependant, le mécanisme par lequel les cellules cancéreuses favorisent l'activation des fibroblastes sains en fibroblastes associés au cancer (CAF) n'est pas encore bien compris. Les exosomes sont des vésicules de taille nanométrique qui transportent protéines, lipides et acides nucléiques entre les cellules pour établir une communication intercellulaire. Dans cette étude, les exosomes dérivés des cellules cancéreuses de la vessie ont été étudiés afin de déterminer leur rôle dans l'activation des fibroblastes vésicaux primaires sains. Nous avons montré que les exosomes libérés par les cellules cancéreuses de la vessie sont internalisés par les fibroblastes et favorisent leur prolifération et l'expression des marqueurs de CAF. En outre, ces exosomes contiennent du TGF β et, dans les CAF induits par ces exosomes, la signalisation SMAD-dépendante est activée. De plus, l'inhibition de TGF β atténue l'expression des marqueurs de CAF chez les fibroblastes sains. Par conséquent, ces données démontrent que les cellules cancéreuses de la vessie déclenchent la transdifférenciation des fibroblastes en CAF par le transfert de TGF β via les exosomes et l'activation de la voie SMAD. Enfin, le TGF β exosomal est localisé à l'intérieur de la vésicule et constitue de 53,4 à 86,3% du TGF β total présent dans le surnageant des cellules cancéreuses. Cette étude met en évidence une nouvelle fonction pour les exosomes du cancer de la vessie en tant que nouveaux modulateurs de la transdifférenciation des cellules stromales.

Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-associated Fibroblasts through TGF β Signaling

Cassandra R Goulet^{1,2,3}, Geneviève Bernard^{1,2}, Sarah Tremblay¹, Stéphane Chabaud^{1,2}, Stéphane Bolduc^{1,2} & Frédéric Pouliot^{2,3*}.

¹ Centre de recherche en organogénèse expérimentale/LOEX, Regenerative Medicine Division, CHU de Québec Research Center, Quebec, QC, Canada

² Department of Surgery, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, QC, Canada

³ Oncology Division, CHU de Québec Research Center, Quebec, QC, Canada

Running title: Bladder Cancer Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into CAFs

Keywords: Bladder cancer, exosomes, cancer-associated fibroblasts, TGF β

*** Corresponding author:**

Frédéric Pouliot

CHU de Québec Research Center

10 rue McMahan

Quebec City, Quebec, Canada, G1J 1Z4

Frederic.pouliot@crchudequebec.ulaval.ca

Conflict of interest statement: The authors declare no potential conflicts of interest.

Word count: 4,050

Number of figures: 5

Number of supplementary figure: 1

Abstract

A particularly important tumor microenvironment (TME) relationship exists between cancer cells and surrounding stromal cells. Fibroblasts, in response to cancer cells, become activated and exhibit myofibroblastic characteristics that favor invasive growth and metastasis. However, the mechanism by which cancer cells promote activation of healthy fibroblasts into cancer-associated fibroblasts (CAFs) is still not well understood. Exosomes are nanometer-sized vesicles that shuttle proteins and nucleic acids between cells to establish intercellular communication. Here, bladder cancer-derived exosomes were investigated to determine their role in the activation of healthy primary vesical fibroblasts. Exosomes released by bladder cancer cells are internalized by fibroblasts and promoted the proliferation and expression of CAF markers. In addition, cancer cell-derived exosomes contain TGF β and in exosome-induced CAFs SMAD-dependant signaling is activated. Furthermore, TGF β inhibitors attenuated CAF marker expression in healthy fibroblasts. Therefore, these data demonstrate that bladder cancer cells trigger the differentiation of fibroblasts to CAFs by exosomes-mediated TGF β transfer and SMAD pathway activation. Finally, exosomal TGF β localized inside the vesicle and contributes 53.4 to 86.3% of the total TGF β present in the cancer cell supernatant. This study highlights a new function for bladder cancer exosomes as novel modulators of stromal cell differentiation.

Implication

This study identifies exosomal TGF β as new molecular mechanism involved in cancer-associated fibroblast activation.

Introduction

The interaction between the microenvironment and cancer cells has a critical role in tumor development. Tumor cells start to shape their microenvironment at an early phase of the malignant progression by cell-cell interaction and paracrine mechanisms. They produce a variety of growth factors, chemokines, and matrix-degrading enzymes, which in turn promote diverse events, such as tumor angiogenesis, extracellular matrix remodelling, cellular proliferation, invasion, and metastasis, as well as mediate mechanisms that are therapeutically resistant (1). The tumor microenvironment is composed of diverse types of cells, including infiltrating immune cells, blood and lymphatic vascular networks, and carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) (2). CAFs constitute the majority of non-cancerous cells within a tumor and share many similarities with myofibroblasts found during wound healing. They express, among other things, α -smooth muscle actin (α SMA), fibroblast-activated protein (FAP) and Galectin (3,4). CAFs arise from nearby healthy fibroblasts (HF) that have been differentiated under the tumor microenvironment conditions, and they contribute to the formation of cancer-altered stroma (5,6). They create a microenvironment that promotes cancer growth, invasiveness, vascularization, establishment of the pre-metastatic niche, metastasis and therapy resistance (7-10). Moreover, the presence of CAFs in vivo correlates with poor prognosis of several cancer types (11-14). Therapeutics targeting CAF activation may therefore be attractive, but the mechanisms responsible for the transformation of HFs into CAFs are not well understood.

There is a growing interest in the cancer cell–microenvironment communication mediated by secreted vesicles termed exosomes (15). Exosomes are nanometer-sized vesicles secreted from the endosomal membrane compartment by diverse cell types (16). Exosomes carry multiple biologically active cargo components, such as proteins, nucleic acids, and lipids, which strongly vary with the cellular origin and the physiological state of the cell that secretes the exosomes. They mediate cell-to-cell communication and activate signaling pathways by acting as natural vehicles for delivering their contents from donor cells to target cells. Exosomes mediate their biological functions, which include immunomodulation (17), cancer progression (18), and epigenetic reprogramming (19), through receptor-mediated endocytosis, pinocytosis, or phagocytosis, or else through fusion with the cell membrane resulting in direct release of contents into the cytoplasm (20). With

our growing understanding of the biology of exosomes, the theory of passive exosome loading, trafficking and release is beginning to be replaced by the idea that these processes are orchestrated and deliberate (21,22). In cancer, emerging evidence suggests that exosomes play a role in facilitating tumorigenesis by regulating angiogenesis, immunity, and metastasis (23-25). Very few studies have investigated the function of exosomes in the context of cancer-stroma activation (26,27), and there remain many unanswered questions about the factors, shuttled by exosomes, involved in stromal activation.

In this study, we hypothesize that bladder cancer exosomes can alter the function of HFs surrounding the tumor, leading to alterations that may promote tumor growth and progression. Therefore, we examined whether exosomes produced by bladder cancer cells could transfer information to HFs and trigger a cellular response. We found that bladder cancer cells communicated with HFs through release of exosomes. We showed that HFs acquired a CAF phenotype following exposure to cancer-derived exosomes and that the differentiation of HFs to CAFs was associated with the activation of the TGF β /SMAD signaling pathway. We also found that exosomal TGF β , localized inside the vesicle, contributes for 53.4 to 86.3% of the total TGF β present in the cancer cell supernatant. Thus, this study identifies a new molecular mechanism involved in CAF activation.

Materials and Methods

Ethics Statement

Bladder biopsies from paediatric patients undergoing non-oncologic urologic surgery were obtained at the CHU de Québec Research Center in accordance with recognized ethical guidelines of Declaration of Helsinki and with the institutional review board of Laval University. All patients provided their formal, informed, written consent, each agreeing to supply a biopsy for this study.

Cell Isolation and Culture

Healthy vesical fibroblasts (HFs) were isolated from two different human bladder biopsies as previously described (28). Briefly, the stroma was separated from the urothelium after incubation O/N at 4°C in HEPES buffer with 500µg/mL thermolysin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO). The fibroblasts were enzymatically dissociated from the extracellular matrix by treating the stroma with 0.125U/mL collagenase H (Roche, Mississauga, Canada) for 30 min at 37°C under gentle agitation. Then, fibroblasts were cultured in Dulbecco-Vogt modified Eagle's media (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Burlington, Canada) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 25 µg/ml gentamicin; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO). RT4, T24 and SW1710 bladder cancer cell lines were obtained from the ATCC (HTB-2™, HTB-4™) or DSMZ (ACC 426) and cultured in DMEM containing 10% FBS and antibiotics. All cells were cultured fewer than 5 passages after purchasing or receiving them for all the experiments and tested for mycoplasma contamination. Cell supernatant was aliquoted and stored at -80°C until the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) assay.

Exosomes production and isolation

To remove any residual bovine exosomes from the FBS, serum was treated with the FBS Exosome Depletion Kit (Norgen Biotek Corp., ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Bladder cancer cells were cultured in DMEM containing 10% exosome-depleted FBS for 48 h. Then, the conditioned medium was centrifuged to 2000 x g for 30 min to remove cells and debris, and supernatant was mixed with 0.5 volumes of the Total Exosome Isolation Reagent (Invitrogen, Burlington, Canada). Samples were mixed

by vortexing and incubated at 4 °C overnight. Then, they were centrifuged at 10,000 × g for 60 min at 4 °C. Exosomes, contained in the pellet, were resuspended in phosphate buffered saline (PBS). The protein concentration was measured with a BCA kit (Pierce™, ThermoFisher, Waltham, MA).

Electron microscopy

Isolated exosomes were loaded onto copper grids covered with a carbon film and stained with 3% uranyl acetate (Sigma, Oakville, QC, Canada). The grid was air-dried, and electron micrographs were acquired using a JEOL, JEM-1230 (Tokyo, Japan) transmission electron microscope at 80 kV excitation voltage.

Sucrose density gradients

Isolated exosomes were placed on top of nine successive layers (from 1.10 to 1.18 g/mL) of sucrose density gradient and centrifuged at 200,000 × g for 12 h at 4 °C. After centrifugation, series of fractions (1.0 ml each × 9) were collected, the protein concentration was measured by using a BCA kit (Pierce™, Thermo Fisher, Waltham, MA), and samples were lysed with RIPA buffer. These samples (10ug) were separated by SDS-PAGE using a 12% polyacrylamide gel. Proteins were visualized by silver staining using a Silver Stain kit (Pierce™, Thermo Fisher, Waltham, MA) according to the manufacturer's instructions.

Exosome size distribution and concentration measurement

To determine exosome size distribution and concentration, semi-automated nanoparticle tracking-based analyses were performed using a NanoSight (NS300) apparatus (Malvern Instruments Ltd). Samples were diluted to provide counts within the linear range of the instrument (i.e., 3×10^8 to 10^9 per ml). Three videos of 1 min duration were recorded for each sample, with a frame rate of 30 frames per second. Particle movement was analyzed by NTA software (NTA 2.3, NanoSight Ltd.) according to the manufacturer's protocol. The NTA software was optimized to first identify and then track each particle on a frame-by-frame basis.

Exosome uptake by fibroblasts

Exosomes were pre-labeled with a PKH26 cell linker kit (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) according to the manufacturer's instructions. Briefly, exosomes were resuspended in 1 mL Diluent C, and 4 μ L PKH26 was mixed with 1 mL Diluent C separately. The exosome suspension and the PKH26 solution were mixed and incubated for 4 min. The labeling reaction was stopped by adding an equal volume of 1% FBS. To remove the extra dye, samples were ultracentrifuged at 4000 \times g, washed with PBS, and centrifuged again at 4000 \times g in Vivaspin 2 100kDa MWCO spin columns (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Exosomes were resuspended in 1 mL of PBS. PKH26 labeled exosomes (1 mg/mL) were incubated for 24 h with HFs grown on coverslips to 50% confluence in a 12-well plate. The coverslips were then washed three times with PBS solution and fixed with 4% PFA for 20 min. The HFs were labelled with Vimentin (1/1000; Abcam, San Francisco, CA) primary antibody diluted in PBS containing 1% w/v bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) for 60 min at room temperature, rinsed in PBS, and then incubated for 45 min with Alexa Fluor 488 conjugated secondary antibodies (1:1000; Invitrogen, Carlsbad, CA). The nuclei were stained by using Hoechst 33258 (5 mg/mL; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO), and samples were observed using a Zeiss Axio Imager M2 microscope equipped with an Axiocam HR Rev3 camera (Oberkochen, Germany).

CAF induction

HFs were co-cultured with freshly isolated exosomes (1mg/ml) for 48 h in DMEM 10%FBS. rhTGF β 1 (4ng/mL; Proteintech, Rosemont, IL) was used as a positive control. Then, proteins were collected in RIPA buffer containing protease inhibitors cOmplete (Roche, Mississauga, Canada), quantified with a BCA kit, and stored at -80 $^{\circ}$ C until performing Western blot assay. For neutralization of TGF β , exosomes were pre-incubated with 10 mg/ml of human TGF β 1,2,3 antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN) for 1 h at room temperature before they were added to the culture medium.

Immunocytochemistry

HFs were co-cultured with freshly isolated exosomes (1mg/ml) for 48 h in DMEM 10%FBS. rhTGF β 1 (4ng/mL) was used as a positive control. The cells were then washed

with PBS and fixed with 4% v/v paraformaldehyde/PBS for 30 min. For immunocytochemistry, permeabilization was performed using 0.25% v/v Triton X-100/PBS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) for 30 min followed by blocking using PBS 5% BSA for 1 h. Incubation with primary antibody α SMA (1/1000; Abcam, San Francisco, CA) was performed at room temperature for 1 h in PBS 5% BSA. The cells were rinsed in PBS before incubation with anti-rabbit Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (1/1000; Invitrogen, Carlsbad, CA) for 1 h. Cells were then mounted and counterstained using VECTASHIELD mounting medium with 4',6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) (Vector Laboratories, Peterborough, UK).

Cell proliferation assay

To assess the proliferation of HFs in the presence of bladder cancer-derived exosomes, the CyQUANT NF assay (Invitrogen Ltd., Paisley, Scotland) was used according to the manufacturer's instructions. HFs were plated at 5,000 cells per well in DMEM in 96-well white walled clear bottomed plates (Corning Life Sciences, Amsterdam, Netherlands) and incubated with 1mg/mL of exosomes overnight at 37 °C in 5% CO₂. The following day, the cells were incubated with x1 CyQUANT NF dye binding solution for 60 min at 37 °C, and the fluorescence intensity was measured at excitation wavelength of 485 nm and the emission detection at 530 nm using Varioskan Flash microplate reader (Thermo Electron Corporation).

Immunoblot

Equal amounts of proteins (10 μ g) were loaded in 12% polyacrylamide gels, resolved by SDS-PAGE, and transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked for 30 min with 5% non-fat milk and 0.05% Tween 20 in PBS. The membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4°C followed by 45 min at RT with HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Protein expression was detected using Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Bands were imaged by using Fusion Fx7 imager (Vilber Lourmat, France) and analyzed with ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). The following antibodies were used: CD9 (1/1000; Biolegend, San Diego, CA), CD63 (1/1000; Biolegend, San Diego, CA), CD81 (1/1000; Biolegend, San Diego, CA), Flotilin (1/1000;

Proteintech, Rosemont, IL), Alix (1/1000; Proteintech, Rosemont, IL), Hsp70 (1/1000; Biologend, San Diego, CA), GM130 (1/1000; BD Biosciences, Missisauga, Canada), β -actin (1/5000; Abcam, San Francisco, CA), CK18 (1/50; Life Technologies, Carlsbad, CA), α SMA (1/5000; Abcam, San Francisco, CA), Galectin (1/1000; R&D Systems, Minneapolis, MN), FAP (1/1000; Novus Biologicals, Littleton, CO), pSMAD2 (1/500; Millipore, Burlington, MA), SMAD2/3 (1/1000; Millipore, Burlington, MA) and Tubulin (1/1000; Novus Biologicals, Littleton, CO).

Proteinase K treatment

Exosomes were permeabilized or not with 1% Triton X-100 and then incubated for 60 min at 37°C in the presence of 100 μ g/ml proteinase K (Invitrogen). Protease K was quenched with 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Equivalent amounts of all samples were resolved with SDS-PAGE and subjected to Western blotting with a TGF β antibody (1/500; R&D Systems, Minneapolis, MN). Results were confirmed by using an ELISA according to the manufacturer's protocol (Duoset®, R&D Systems, Minneapolis, MN). The plates were read at 450 nm using a SpectraMax Plus spectrometer with SoftmaxPro Ver 4.7.1.

Cycloheximide treatment

For protein synthesis inhibition, HFs were incubated with cycloheximide (100 μ g/ml; Sigma-Aldrich) 1h before exosome treatment. Then, HFs were co-cultured with freshly isolated exosomes (1mg/ml) for 48 h in DMEM 10%FBS containing 500 μ g/ml cycloheximide.

Statistical analysis

For graphical representation of data and statistical analysis, GraphPad Prism was used. The results were expressed as mean \pm standard error. Differences between the groups were considered significant at $P < 0.05$. Data were interpreted using one- or two-way analysis of variance.

Results

Isolation and characterization of bladder cancer cell-derived exosomes

Exosomes were isolated from superficial RT4 or invasive T24 and SW1710 bladder cancer cell supernatants. As shown in Fig. 1A, the exosomes had a vesicle shape limited by a lipid membrane with a diameter ranging from 30 to 100 nm. To examine the protein heterogeneity, the exosomes derived from bladder cancer cells were analyzed using sucrose density gradients (Fig. 1B). The exosomes were purified by differential centrifugation, overlaid on a 0.2–1.8 g/mL sucrose density gradient, and centrifuged for 12 h at $200,000 \times g$. Gradient fractions were collected and analyzed by silver staining. Then, the expression of exosomal markers CD9, CD63, CD81, Alix, Flotillin and Hsp70, as well as that of cell markers GM130, Actin and CK18, was characterized in both cell lysates and isolated exosomes by Western blotting (Fig. 1C). The exosomes of each cancer cell line were quantified by nanoparticle tracking analysis (Fig. 2A-C). This revealed a typically heterogeneous exosomal population with size ranging between 30 and 450 nm in diameter; the most enriched exosomes were smaller than 200 nm (Fig. 2D). The isolation protocol retrieved $1.3\text{-}4.3 \times 10^9$ exosomes/mL (Fig. 2D). Collectively, these results suggest that our isolated exosomes had a high degree of purity and satisfied the size, density, structure and molecular phenotype of exosome vesicles as described (29,30).

Bladder cancer cell-derived exosomes are internalized by HFs and promote their proliferation

To investigate the internalization of exosomes by HFs, we labeled the exosomes with PKH26. As shown in Fig. 3A, bladder cancer-derived exosomes were internalized and accumulated around the nuclei in HFs after incubation for 24 h. To analyze whether the proliferation ability of HFs was affected by bladder cancer-derived exosomes, HFs were cultured with 1mg/mL of exosomes for 18 h. As shown in Fig. 3B, cancer-derived exosomes promoted the proliferation of HFs.

Differentiation of HFs to CAFs induced by bladder cancer cell-derived exosomes

The role of cancer exosomes in the differentiation of HFs to CAFs was investigated. To do so, an HF monolayer was cultured in DMEM containing rhTGF β (4ng/mL) or RT4, T24 or

SW1710 cell-derived exosomes (1 mg/mL) for 48 h. It is well established that CAFs share key phenotypic markers with myofibroblasts(6). Using immunocytochemistry, we visualized the expression of α SMA in cells; as expected, rhTGF β and exosome treatments strongly induced α SMA expression (Fig. 3C). Moreover, compared to untreated HFs, rhTGF β and exosome treatments induced morphological changes where cells exhibited the classical stress fibre structures of α SMA and the mechanical tensions typical of myofibroblasts. As CAFs were defined as the increased expression of not only α SMA but also FAP and Galectin proteins, we quantified their expression with a Western blot. Analyses showed that, compared to the untreated group, treatment with cancer exosomes resulted in increases in α SMA, FAP, and Galectin protein levels (Fig. 3D-E). Taken together, these results indicate that HFs undergo differentiation to CAFs in response to cancer exosome exposure.

The role of TGF β pathways in the differentiation of HFs to CAFs

TGF β has been shown to be involved in CAF differentiation in breast and prostate cancer (31,32). Therefore, we investigated whether cancer exosomes can trigger TGF β signaling pathways and thereafter initiate a process of differentiation of HFs toward a CAF phenotype. We first demonstrated the presence of TGF β in bladder cancer exosomes (Fig. 4A). Surprisingly, T24 cell line-derived exosomes showed significantly higher levels of TGF β than RT4 and SW1710 cell line-derived exosomes. TGF β is synthesized in a latent complex with its prodomain, the latency-associated peptide (LAP). To exert biological activity, TGF β requires activation, which involves dissociation of LAP and TGF β . To determine the bioactive exosomal TGF β levels, we measured by ELISA active (not acid-treated) and total (acid-treated) TGF β in our exosome preparations. As expected, we find that approximately 2-3% of the exosomally associated TGF β is active (Fig. 4A). We next determine the proportion of secreted TGF β associated with exosomes by comparing TGF β levels found in bladder cancer cell supernatant and supernatant depleted in exosomes. Using ELISA, data revealed that from 53.4% to 86.3% of supernatant TGF β is associated with exosomes (Fig. 4B).

TGF β binds sequentially to type II receptor and then type I receptor, which triggers a signaling cascade, involving phosphorylation of SMAD2 and 3, which subsequently mediate binding to SMAD4. This SMAD complex translocates to the nucleus to initiate

transcription of a host of genes, including α SMA (33). Therefore, to assess whether the differentiation of HF to CAF is associated with TGF β pathway activation, we examined the level of phosphorylated SMAD2 1h, 4h and 48h after bladder cancer exosomes treatment (Supplementary Figure 1). Typical kinetic for TGF β 1-mediated Smad2 phosphorylation is on the order of 30-60 minutes consistent with ligand-mediated activation of a receptor kinase. Thus, the absence of SMAD2 activation in our exosome-treated HF suggests that cells have to process cancer-derived exosomes to release exosomal TGF β and then induce SMAD2 signalisation. In order to eliminate the TGF β that could be produced by HFs, we blocked protein synthesis in HFs by adding cycloheximide. The results showed that SMAD2 phosphorylation was increased by cancer exosomes in rhTGF β and RT4, T24 and SW1710 cell-derived exosomes treatments even in cycloheximide condition (Fig. 4C).

To demonstrate that TGF β signaling shuttled by cancer exosomes is directly involved in the differentiation of HFs to CAFs, we blocked TGF β signaling with TGF β 1,2,3 neutralization antibody (10ng/mL) followed by cancer exosome treatment for 48 h. As shown in Fig. 4D, TGF β 1,2,3 neutralization reversed the expression of the α SMA CAF marker in HFs treated with rhTGF β and cancer exosomes.

Localization of exosomal TGF β

An issue that remains unknown is whether TGF β is associated with exosomes. Proteins may be bound to the surface membrane of the exosome or located inside the vesicle. Since proteinase K cannot penetrate through the lipid bilayer, it is most likely that proteins susceptible to proteinase K degradation are localized on the surface of vesicle. To clarify the localization of TGF β , cancer-derived exosomes were treated with proteinase K (100 μ g/ml) in the presence or absence of 1% Triton X-100, which was used to permeabilize the exosomal membranes. Western blot data revealed that the proteinase K treatment alone did not result in the degradation of TGF β . However, we observed a shift of TGF β molecular weight, suggesting that TGF β is associated with other proteins. With the addition of 1% Triton X-100, the exosomal membrane was disrupted, resulting in the complete digestion of the TGF β (Fig. 5A). To validate this result, TGF β levels were quantified using ELISA (Fig. 5B). The exosomal TGF β level was not significantly reduced by treatment with proteinase K, while the addition of Triton X-100 in combination with proteinase K degraded over 90% of the TGF β . To determine if the small portion of external exosomal TGF β is sufficient to

induce CAF differentiation, we assessed the capacity of proteinase K treated exosomes to trigger differentiation of HFs. As expected, proteinase K treated exosomes maintained their ability to differentiate HFs to CAFs (Fig. 5C). Collectively, these data indicate that the majority of TGF β proteins are localized inside exosomes.

Discussion

Interactions between cancer exosomes and the tumor microenvironment have been the subject of renewed interest in recent years. It is becoming increasingly evident that exosomes derived from cancer cells impact the local stroma, driving production of a disease-associated microenvironment. While currently such data is lacking for bladder cancer, studies have shown that gastric and colon cancer exosomes trigger the differentiation of stromal cells into CAFs (26,34,35). The main goal of this study was to investigate the effect of exosomes isolated from three different bladder cancer cell lines on primary vesical HFs.

Studies on extracellular vesicles require special attention to experimental design to ensure the specific isolation of exosomes and avoid cellular contaminants. In this work, we used an isolation method based on sedimentation reagents. Globally, we demonstrate that vesicles isolated in RT4, T24 and SW1710 bladder cancer cell lines possess similar characteristics to exosomes, including density, protein expression and size distribution. NanoSight analyses reveal that our exosomes are quite pure, since only a low concentration of the isolated vesicles presents sizes greater than 200nm. Obviously, we cannot avoid possible cellular contaminants, but these larger vesicles may also be due to exosome aggregates, as seen in electronic microscopy. These results are broadly consistent with similar studies of exosomes from other cellular sources (29,30). Interestingly, we noticed a great heterogeneity regarding the expression level of exosomal protein. Indeed, although SW1710-derived exosomes express CD9, CD63 and Alix proteins, the expression level is much lower than that of RT4-derived exosomes. Moreover, the absence of Golgi apparatus (GM130) or cytoskeleton (Actin, CK18) markers reveals that our method allows specific and effective exosome isolation.

The uptake of these exosomes by vesical HFs was observed by immunofluorescence staining, confirming direct interaction between cancer exosomes and HFs. Cancer exosome treatment brings about sustained changes in the morphology, protein expression, and metabolism of HFs. Indeed, we observed an augmentation of the proliferation rate and a dramatic upregulation of α SMA stress fibres, resulting in the characteristic spindle-shaped CAF morphology. Based on Western blot data, several CAF markers were overexpressed

after exosome treatment, including α SMA, FAP and Galectin, suggesting that bladder cancer cell-derived exosomes trigger differentiation of HFs to CAFs.

TGF β signaling is one of the major pathways controlling tumorigenesis not only in cancer cells but also in CAFs. Previous studies showed evidence that TGF β is involved in the alteration of tumor stroma, notably by contributing to the acquisition of a CAF phenotype in stromal cells (32,36,37). Our data is consistent with such findings, as exosomal TGF β , contributing for 53.4 to 86.3% of the total TGF β present in the cancer cell supernatant, mediates SMAD pathway activation and drives the differentiation of HFs to CAFs. Moreover, TGF β neutralization renders cancer exosomes unable to trigger fibroblast differentiation, suggesting that TGF β is a key regulator in HF-CAF transition.

A large proportion of exosome surface-associated proteins are transmembrane proteins, but some of those may be non-covalently bound to the vesicle membrane and could thus be travelling with the exosome between cells (38). While the precise mechanism of how exosomal TGF β is delivered to the recipient cell is not known, its association with the outer exosome membrane can be evaluated by its susceptibility to digestion by an extracellular protease. Interestingly, a Western blot analysis of proteinase K-treated exosomes revealed a shift in TGF β molecular weight from \sim 40kDa to \sim 15kDa. This finding led us to hypothesize that intra-vesicular TGF β is associated with transmembrane protein and is liberated when this protein is digested by proteinase K. We also found that TGF β levels were significantly affected by proteinase K treatment only in the presence of Triton X-100, demonstrating that TGF β is localized inside exosomes. These results raise important questions of whether exosomal TGF β reaches HF TGF β receptors and activates Smad signaling. Since TGF β neutralizing antibodies reduced the expression levels of α SMA, the effect of exosomes should be mediated by TGF β released into the medium. We confirmed with cycloheximide-treated HF that Smad signaling activation involves only exosomal TGF β and not cell-secreted TGF β . This result suggests that exosomal TGF β , which is localized inside exosome, is released from exosomes prior to bind TGF β receptors at the surface of HF. We could hypothesize that the exosomes burst in the extracellular media prior their internalization, releasing their TGF β , or even that the content of internalized exosomes is recycled by endosomes and is then secreted by exocytosis, releasing TGF β in the extracellular media.

Taken together, our data show exosomes to be an additional mechanism contributing to microenvironment modulation by bladder cancer cells. Our results give a new insight into the role of exosomes in the differentiation of fibroblasts into CAFs. This study provides a better understanding of whether exosomes contribute to the establishment and persistence of cancer-altered stroma, and it may offer a novel therapeutic modality to target cancer growth and progression.

Acknowledgments

We thank Bastien Paré and Isabelle Lorthois for their critical comments and experimental input, Richard Janvier (IBIS) for help with electron microscopy, Dr. Denis Boudreau and Jérémie Asselin (COPL) for their NanoSight technical assistance. This work was supported by a Bladder Cancer Canada Grant to F. Pouliot and C.R. Goulet and a Ferring Innovation Grant to S. Bolduc. C.R. Goulet is the recipient of an FRQS Doctoral Research Award. FP is the recipient of a FRQS Scholarship. S. Bolduc is the recipient of a Canadian Urological Association Scholarship and a Canadian Institute for Health Research Grant (#258229).

References

1. Catalano V, Turdo A, Di Franco S, Dieli F, Todaro M, Stassi G. Tumor and its microenvironment: A synergistic interplay. *Seminars in Cancer Biology*. Elsevier Ltd; 2013 Dec 1;23(6):522–32.
2. Bhome R, Bullock MD, Saihati Al HA, Goh RW, Primrose JN, Sayan AE, et al. A top-down view of the tumor microenvironment: structure, cells and signaling. *Front Cell Dev Biol*. Frontiers; 2015 May 29;3:1–9.
3. Tang D, Gao J, Wang S, Ye N, Chong Y, Huang Y, et al. Cancer-associated fibroblasts promote angiogenesis in gastric cancer through galectin-1 expression. *Tumor Biol*. Springer Netherlands; 2015 Sep 1;:1–11.
4. Huang Y, Zhou S, Huang Y, Zheng D, Mao Q, He J, et al. Isolation of Fibroblast-Activation Protein-Specific Cancer-Associated Fibroblasts. *BioMed Research International*. Hindawi; 2017 Aug 14;:1–8.
5. Gascard P, Tlsty TD. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes & Development*. 2016 May 5;30(9):1002–19.
6. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016 Aug 23;16(9):582–98.
7. Zhuang J, Lu Q, Shen B, Huang X, Shen L, Zheng X, et al. TGF β 1 secreted by cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through lncRNA-ZEB2NAT. *Sci Rep*. 2015 Jul 8;5:11924–13.
8. Attieh Y, Clark AG, Grass C, Richon S, Pocard M, Mariani P, et al. Cancer-associated fibroblasts lead tumor invasion through integrin- β 3-dependent fibronectin assembly. *J Cell Biol*. 2017 Sep 20;80:jcb.201702033–12.

9. Chan JSK, Sng MK, Teo ZQ, Chong HC, Twang JS, Tan NS. Targeting nuclear receptors in cancer-associated fibroblasts as concurrent therapy to inhibit development of chemoresistant tumors. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2017 Oct 23;:1–14.
10. Liu J, Chen S, Wang W, Ning B-F, Chen F, Shen W, et al. Cancer-associated fibroblasts promote hepatocellular carcinoma metastasis through chemokine-activated hedgehog and TGF- β pathways. *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2017 Aug 27;:1–11.
11. Zhi K, Shen X, Zhang H, Bi J. Cancer-associated fibroblasts are positively correlated with metastatic potential of human gastric cancers. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29(1):66–8.
12. Ha SY, Yeo S-Y, Xuan Y-H, Kim S-H. The Prognostic Significance of Cancer-Associated Fibroblasts in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Hoheisel JD, editor. *PLoS ONE*. 2014 Jun 19;9(6):e99955–9.
13. Cheng Y, Wang K, Ma W, Zhang X, Song Y, Wang J, et al. Cancer-associated fibroblasts are associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma after surgery. 2015 Mar 28;8(2):1896–903.
14. Lau EYT, Lo J, Cheng BYL, Ma MKF, Lee JMF, Ng JKY, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Regulate Tumor-Initiating Cell Plasticity in Hepatocellular Carcinoma through c-Met/FRA1/HEY1 Signaling. *Cell Reports*. 2016 May;15(6):1175–89.
15. Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V; 2015 Dec 10;219(C):278–94.
16. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2015 Jun 1;25(6):364–72.

17. Wei G, Jie Y, Haibo L, Chaoneng W, Dong H, Jianbing Z, et al. Dendritic cells derived exosomes migration to spleen and induction of inflammation are regulated by CCR7. *Sci Rep. Nature Publishing Group*; 2017 Dec 9;:1–9.
18. Boelens MC, Wu TJ, Nabet BY, Xu B, Qiu Y, Yoon T, et al. Exosome Transfer from Stromal to Breast Cancer Cells Regulates Therapy Resistance Pathways. *Cell*. 2014 Oct;159(3):499–513.
19. Chen L, Charrier A, Zhou Y, Chen R, Yu B, Agarwal K, et al. Epigenetic regulation of connective tissue growth factor by MicroRNA-214 delivery in exosomes from mouse or human hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2014 Jan 27;59(3):1118–29.
20. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2016 Feb 2;:1–11.
21. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*. 2013 Dec 12;126(24):5553–65.
22. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Seminars in Cancer Biology*. 2014 Oct 11;28:3–13.
23. Umezumi T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2012 Jul 16;32(22):2747–55.
24. Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, et al. Cancer-Secreted miR-105 Destroys Vascular Endothelial Barriers to Promote Metastasis. *Cancer Cell*. Elsevier Inc; 2014 Apr 14;25(4):501–15.

25. Greening DW, Gopal SK, Xu R, Simpson RJ, Chen W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2015 Nov 10;40:72–81.
26. Gu J, Qian H, Shen L, Zhang X, Zhu W, Huang L, et al. Gastric Cancer Exosomes Trigger Differentiation of Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cells to Carcinoma-Associated Fibroblasts through TGF- β /Smad Pathway. Samant R, editor. *PLoS ONE*. 2012 Dec 20;7(12):e52465–8.
27. Webber JP, Spary LK, Sanders AJ, Chowdhury R, Jiang WG, Steadman R, et al. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Nature Publishing Group*; 2014 Jan 20;34(3):319–31.
28. Ringuette-Goulet C, Bernard G, Chabaud S, Couture A, Langlois A, Neveu B, et al. Tissue-engineered human 3D model of bladder cancer for invasion study and drug discovery. *Biomaterials*. 2017 Nov;145:233–41.
29. Webber J, Clayton A. How pure are your vesicles? *Journal of Extracellular Vesicles*. 2013 Dec 10;2(1):19861–6.
30. Schageman J, Zeringer E, Li M, Barta T, Lea K, Gu J, et al. The Complete Exosome Workflow Solution: From Isolation to Characterization of RNA Cargo. *BioMed Research International*. 2013;2013(8):1–15.
31. Casey TM, Eneman J, Crocker A, White J, Tessitore J, Stanley M, et al. Cancer associated fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF- β 1) increase invasion rate of tumor cells: a population study. *Breast Cancer Res Treat*. Springer US; 2008 Aug 3;110(1):39–49.
32. Shangguan L, Ti X, Krause U, Hai B, Zhao Y, Yang Z, et al. Inhibition of TGF- β /Smad Signaling by BAMBI Blocks Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells

to Carcinoma-Associated Fibroblasts and Abolishes their Protumor Effects. *STEM CELLS*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2012 Nov 27;30(12):2810–9.

33. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*. 2003 Oct 9;425:577–84.

34. Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer Exosomes Trigger Fibroblast to Myofibroblast Differentiation. *Cancer Research*. 2010 Dec 6;70(23):9621–30.

35. Chowdhury R, Webber JP, Gurney M, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myo broblasts. 2015 Jan 25;:1–17.

36. Li Q, Zhang D, Wang Y, Sun P, Hou X, Larner J, et al. MiR-21/Smad 7 signaling determines TGF- β 1-induced CAF formation. *Sci Rep*. 2013 Jun 20;3:1–9.

37. Beach JA, Aspuria P-JP, Cheon D-J, Lawrenson K, Agadjanian H, Walsh CS, et al. Sphingosine kinase 1 is required for TGF- β mediated fibroblast- to-myofibroblast differentiation in ovarian cancer. 2015 Jan 2;:1–16.

38. Kalra H. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLOS Biology*. 2012 Dec 9;10(12):1–5.

Figures

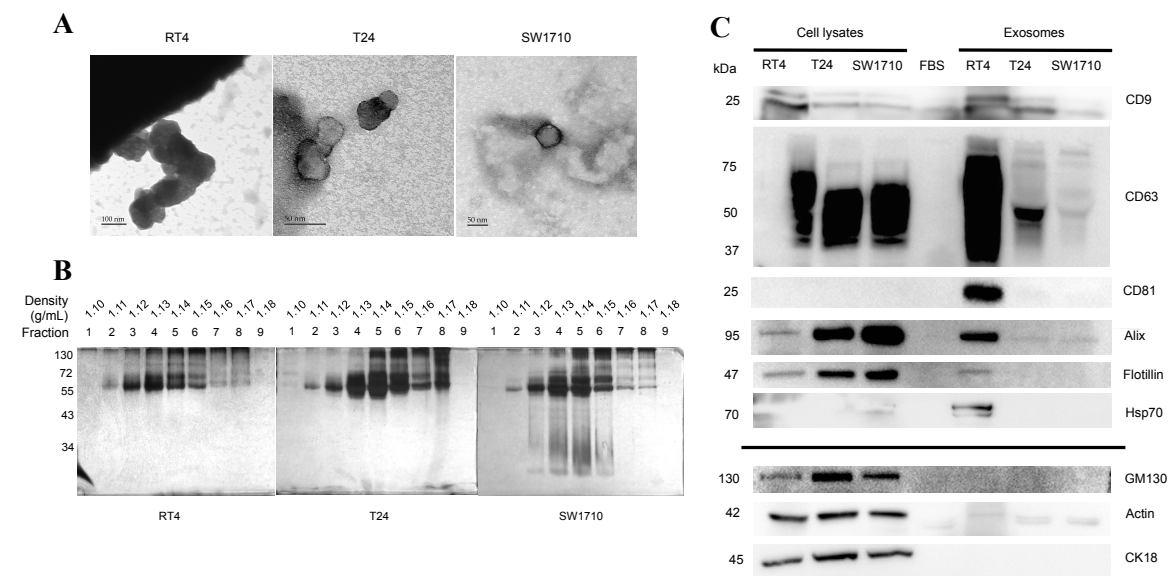


Figure 3.1 | Bladder cancer-derived exosomes characterization

(A) TEM micrographs showing morphology of exosomes immunoprecipitated with anti-CD9 mAb from RT4, T24 and SW1710 bladder cancer cells. Exosomes were stained with 2% uranyl acetate after being placed on carbon-coated TEM grid. (B) Silver staining of fractions resulted from sucrose density-gradient centrifugation of the crude exosome pellet. (C) Protein blot of cell lysate, FBS and exosomes samples for common exosome markers (Alix, HSP70, Flotillin, CD9, CD63 and CD81) and cell markers (GM130, Actin, CK18).

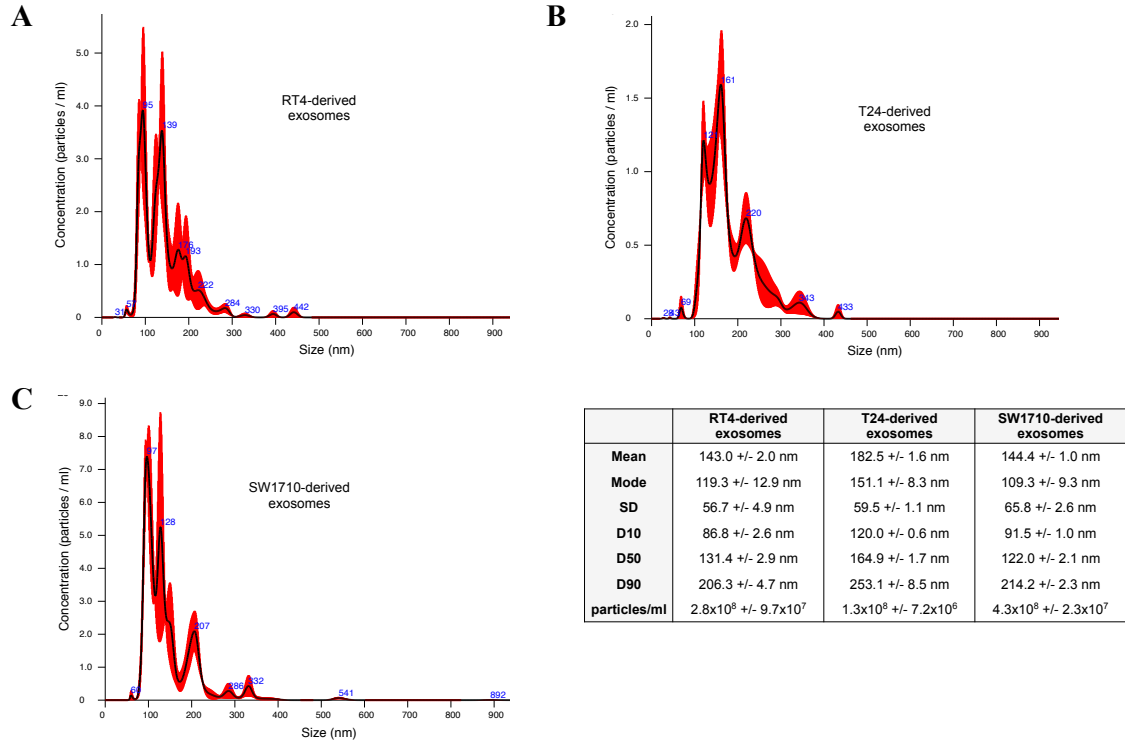


Figure 3.2 | Particle size distributions and concentration of isolated exosomes

NanoSight analysis shows that (A) RT4, (B) T24 and (C) SW1710-derived vesicles isolation deliver good yields of particles whose sizes are consistent with exosomes.

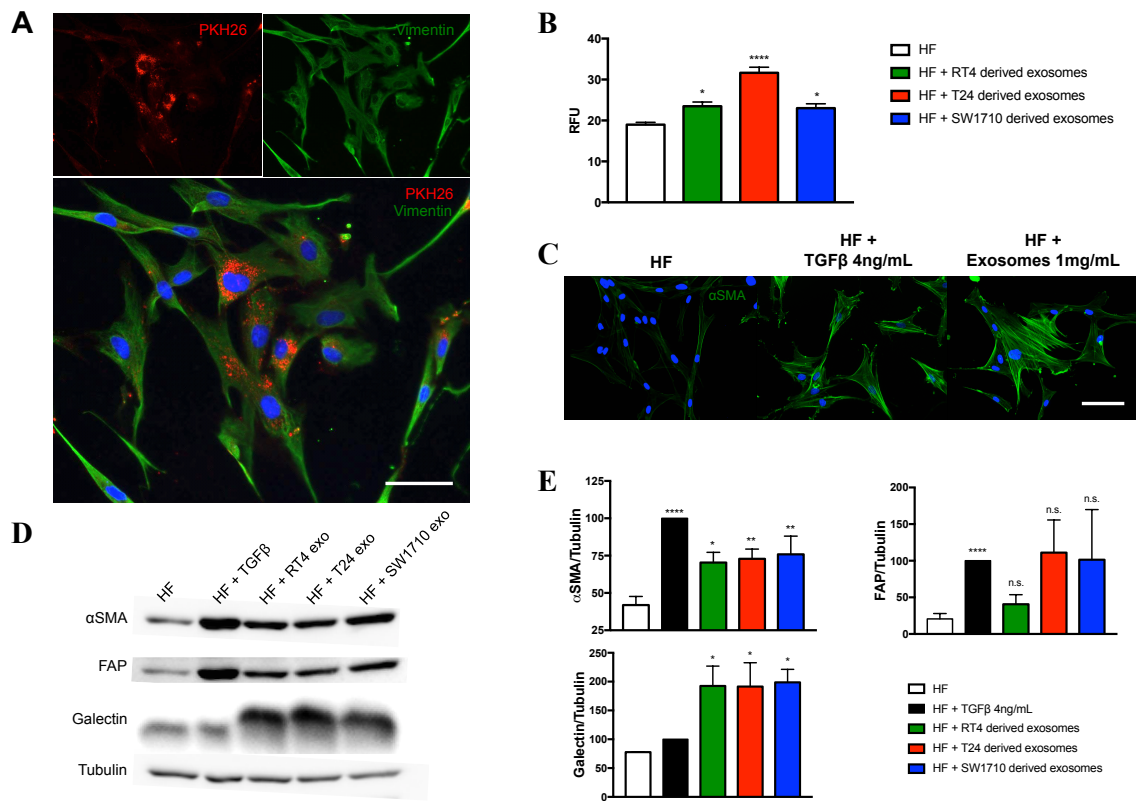


Figure 3.3 | Cancer-derived exosomes penetrate into HF, drive their proliferation and induce CAF markers expression

(A) Fluorescence microscopy images demonstrated co-localization of PKH26-labeled cancer exosomes (red; left) with primary vesical fibroblasts cells labeled with vimentin antibody (green; middle). Cell nuclei are labeled with Hoechst nuclear stain (blue). Exosomes was localized around the nucleus and in the lamellipodia of the fibroblasts. Scale bar = 100 nm. (B) HF were treated with 1mg/mL of RT4, T24 or SW1710 cells-derived exosomes for 48h. Cell proliferation was evaluated with cyQUANT kit (C) and HF were examined by immunocytochemistry for the expression of α SMA (scale bar = 100 nm) (D) or by Western blot for the expression of α SMA, FAP and Galectin proteins. (E) Density analysis of Western blotting bands. rhTGF β 1 (4ng/mL) served as a positive control. Graphs show mean \pm SD. The difference between groups was analyzed by one-way ANOVA followed by post hoc analysis using Dunnett's multiple comparison tests. * P <0.05, ** P <0.01, **** P <0.0001 compared to the HF control group (n=6-9).

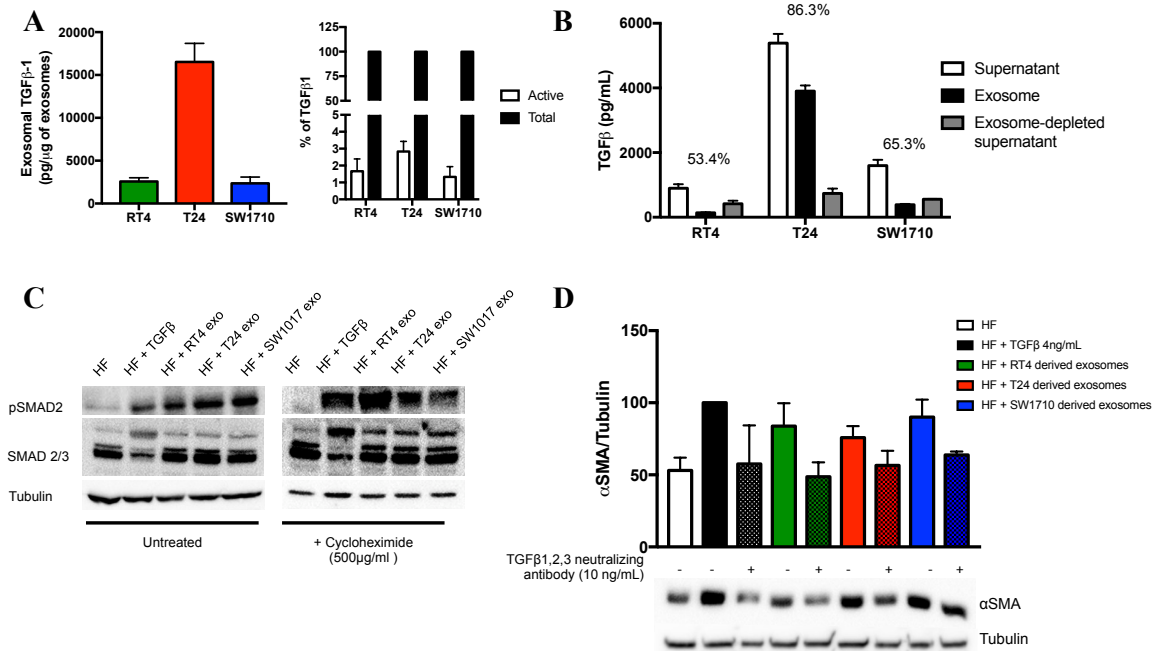


Figure 3.4 | Bladder cancer cell-derived exosomes contain TGFβ1 which induce SMAD2 phosphorylation in HF

(A) ELISA quantification of TGFβ1 expression in bladder cancer-derived exosomes. Percent of active TGFβ1 was measured by ELISA, without (active) and with (total) prior activation with acid (HCL 1N), showing that exosomal TGFβ is mainly in a latent form. (B) TGFβ ELISA was performed on supernatant, exosomes and exosome-depleted supernatant, revealing the proportion of TGFβ1 in supernatant associated to exosomes. (C) HF were treated cancer-derived exosomes (1mg/mL) in presence or not of 500μg/ml cycloheximide for 48h. rhTGFβ (4ng/mL) served as a positive control. The levels of pSMAD2 were analyzed by Western blotting. (D) HF were treated with rhTGFβ (4ng/mL) or bladder cancer cells-derived exosomes (1 mg/mL) in the presence or absence of TGFβ1,2,3 neutralizing antibody (10 ng/mL) for 48 h. The levels of αSMA were analyzed by Western blotting.

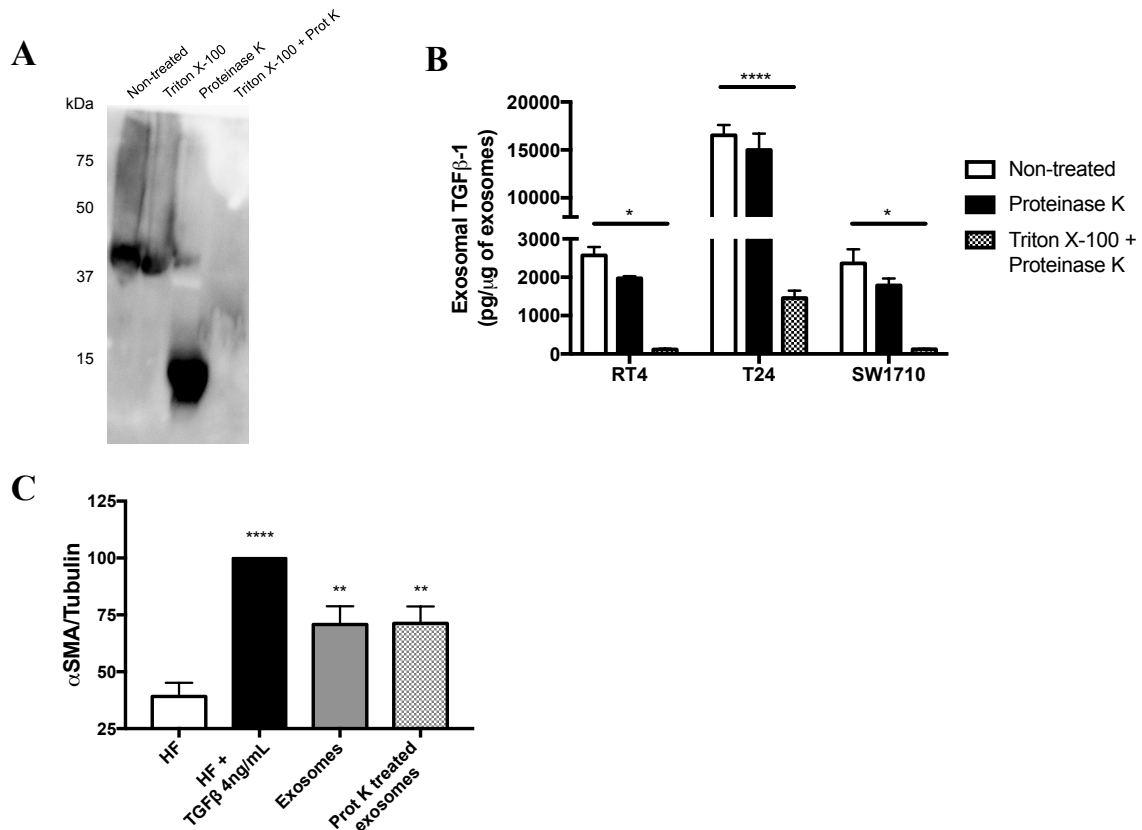
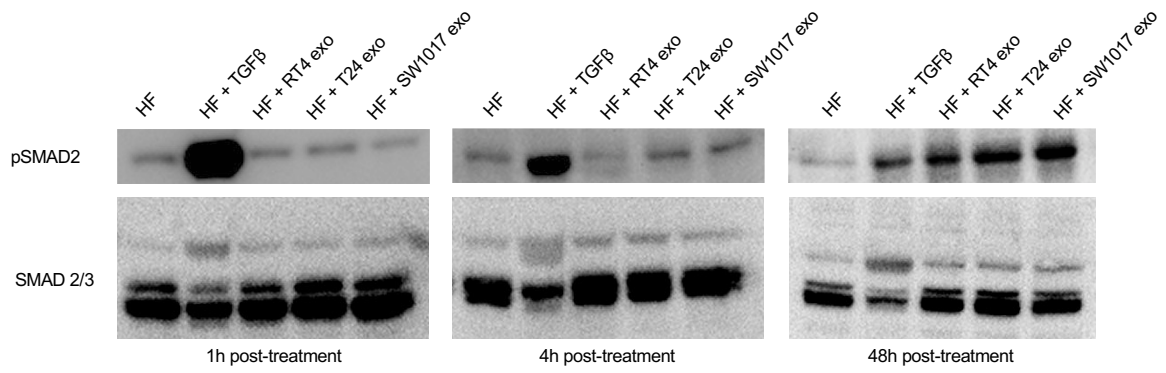


Figure 3.5 | Exosomal localization of TGFβ

Exosomes were treated with proteinase K (100 μg/ml) or proteinase K-1% Triton X-100. (A) Equivalent amounts of all samples were resolved with SDS-PAGE and subjected to Western blotting with TGFβ antibody. (B) Samples were also quantified by ELISA. Proteinase K treatment did not result in the degradation of TGFβ unless Triton X-100 was added to permeabilize the exosome membrane. (C) HF were treated with rhTGFβ (4ng/mL) or 1mg/mL of exosomes treated or not with proteinase K (100 μg/ml) for 48h. The expression of αSMA were analyzed by Western blotting. The difference between groups was analyzed by two-way ANOVA followed by post hoc analysis using Tukey's multiple comparison tests. Graphs show mean +/- SD. *P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001 (n=3).



Supplementary Figure 1 | HF were treated with 1mg/mL of exosomes or TGFβ 4ng/mL. Smad signaling activation was evaluated 1h, 4h or 48h post-treatment by Western blot.

Chapitre 4 - Les CAF induisent l'EMT chez les cellules cancéreuses de la vessie via la signalisation IL-6

Auteurs :

Cassandra R Goulet, Audrey Champagne, Geneviève Bernard, Dominique Vandal, Stéphane Chabaud, Frédéric Pouliot & Stéphane Bolduc.

Contributions des auteurs :

J'ai participé à la conception des expériences, à leur réalisation, à la conception des méthodes d'analyse, à l'analyse des résultats, à la conception et à la préparation des tableaux et des figures. J'ai rédigé l'ensemble de la première version du manuscrit et participé au peaufinage de la version finale. Audrey Champagne a produit la figure 5. Geneviève Bernard et Dominique Vandal ont réalisé certaines expériences. Stéphane Chabaud a participé à l'écriture du manuscrit. Les Prs Stéphane Bolduc et Frédéric Pouliot ont supervisé les travaux.

Article publié dans :

BMC Cancer le 2 février 2019

Impact Factor : 3.3

Résumé

Contexte: Les fibroblastes associés au cancer (CAF), activés par les cellules cancéreuses, constituent le type prédominant des cellules stromales dans les tissus cancéreux et jouent un rôle important dans les interactions avec les cellules cancéreuses en favorisant la progression tumorale. La transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) est un processus clé dans l'invasion et la dissémination en métastases des cellules cancéreuses. Cependant, le mécanisme par lequel les CAF induisent l'EMT chez les cellules cancéreuses de la vessie reste peu étudié. **Méthodes:** Afin de mieux connaître le rôle des CAF dans la progression du cancer de la vessie, des fibroblastes vésicaux sains (HF) ont été activés en CAF par des exosomes dérivés de cellules cancéreuses de la vessie. L'effet du milieu conditionné provenant d'iCAF (CM^{iCAF}) sur l'expression par les marqueurs EMT de la lignée cellulaire non-invasive de cancer de la vessie RT4 a été déterminé par qPCR et Western blot. L'expression de l'IL6 dans les iCAF a été évaluée par ELISA et Western Blot. La prolifération, la migration et l'invasion des cellules RT4 ont été évaluées dans le CM^{iCAF} +/- l'anticorps neutralisant anti-IL6 en utilisant respectivement le test cyQUANT, le test de grattage et la chambre transwell. Nous avons étudié l'importance de l'expression de l'IL6 dans la progression du cancer de la vessie en analysant des ensembles de données sur l'expression des gènes de spécimens de cancer de la vessie chez l'homme à partir de plateformes de données génomiques TCGA et GEO. **Résultats:** Les HF exposés aux exosomes provenant de cellules cancéreuses présentaient des caractéristiques appartenant aux CAF comme des niveaux d'expression élevés d' α SMA et de FAP. Nous avons montré que le CM^{iCAF} induit une régulation positive des marqueurs mésenchymateux N-cadhérine et vimentine, tout en réprimant l'expression des marqueurs épithéliaux E-cadhérine et p- β -caténine dans les cellules cancéreuses de la vessie. De plus, les facteurs de transcription impliqués dans l'EMT comme SNAIL1, TWIST1 et ZEB1 ont été régulés à la hausse dans les cellules RT4 cultivées dans le CM^{iCAF} par rapport au contrôle. Nous avons également montré que la cytokine IL-6 était fortement exprimée par les CAF et que son récepteur, IL-6R, était présent sur les cellules cancéreuses de la vessie RT4. La culture des cellules RT4 avec le CM^{iCAF} a favorisé leur croissance, leur migration et leur invasion. Il est important de noter que l'inhibition de l'IL-6, sécrétée par les CAF, au moyen d'anticorps neutralisants, a significativement inversé le phénotype EMT dans les cellules RT4, soulignant ainsi le rôle de la cytokine IL-6 dans l'initiation de l'EMT chez ces cellules. Finalement, nous

avons montré que l'expression d'*IL-6* est augmentée dans les cancers agressifs de la vessie et corrèle avec le marqueur de CAF *ACTA2*. **Conclusion** Nous concluons que les CAF induisent un phénotype agressif chez les cellules cancéreuses superficielles de la vessie en favorisant l'initiation de l'EMT via la sécrétion de l'*IL-6*.

Cancer-associated Fibroblasts Induce Epithelial–Mesenchymal Transition of Bladder Cancer Cells Through Paracrine IL-6 Signaling

Cassandra Ringuette Goulet^{1,2,3}, Audrey Champagne^{2,3}, Geneviève Bernard^{1,2}, Dominique Vandal¹, Stéphane Chabaud^{1,2}, Frédéric Pouliot^{2,3}, Stéphane Bolduc^{1,2,*}.

¹ Centre de recherche en organogénèse expérimentale/LOEX, Regenerative Medicine Division, CHU de Québec-Université Laval Research Center, Québec, QC, Canada

² Department of Surgery, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, QC, Canada

³ Oncology Division, CHU de Québec Research Center, Quebec, QC, Canada.

Cassandra Ringuette Goulet

cassandra.r.goulet@gmail.com

Audrey Champagne

audrey.champagne.4@ulaval.ca

Geneviève Bernard

genevieve.bernard@crchudequebec.ulaval.ca

Dominique Vandal

dominique.vandal.1@ulaval.ca

Stéphane Chabaud

stephane.chabaud@crchudequebec.ulaval.ca

Frédéric Pouliot

frederic.pouliot@crchudequebec.ulaval.ca

*** Corresponding author: Stéphane Bolduc**

stephane.bolduc@fmed.ulaval.ca

Centre de recherche du CHU de Québec-Université Laval

Centre de recherche en organogénèse expérimentale de l'Université Laval/LOEX

1401, 18e rue, Quebec City, Québec, Canada G1J 1Z4.

Word count: 4650

Number of figures: 5

Abstract

Background: Cancer-associated fibroblasts (CAFs), activated by tumour cells, are the predominant type of stromal cells in cancer tissue and play an important role in interacting with neoplastic cells to promote cancer progression. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a key feature of metastatic cells. However, the mechanism by which CAFs induce EMT program in bladder cancer cells remains unclear. **Methods:** To investigate the role of CAFs in bladder cancer progression, healthy primary bladder fibroblasts (HFs) were induced into CAFs (iCAFs) by bladder cancer-derived exosomes. Effect of conditioned medium from iCAFs (CM^{iCAF}) on EMT markers expression of non-invasive RT4 bladder cancer cell line was determined by qPCR and Western blot. IL6 expression in iCAFs was evaluated by ELISA and Western blot. RT4 cell proliferation, migration and invasion were assessed in CM^{iCAF} +/- anti-IL6 neutralizing antibody using cyQUANT assay, scratch test and transwell chamber respectively. We investigated *IL6* expression relevance for bladder cancer progression by querying gene expression datasets of human bladder cancer specimens from TCGA and GEO genomic data platforms. **Results:** Cancer exosome-treated HFs showed CAFs characteristics with high expression levels of α SMA and FAP. We showed that the CM^{iCAF} induces the upregulation of mesenchymal markers, such as N-cadherin and vimentin, while repressing epithelial markers E-cadherin and p- β -catenin expression in non-invasive RT4 cells. Moreover, EMT transcription factors SNAIL1, TWIST1 and ZEB1 were upregulated in CM^{iCAF}-cultured RT4 cells compared to control. We also showed that the IL-6 cytokine was highly expressed by CAFs, and its receptor IL-6R was found on RT4 bladder cancer cells. The culture of RT4 bladder cancer cells with CM^{iCAF} resulted in markedly promoted cell growth, migration and invasion. Importantly, inhibition of CAFs-secreted IL-6 by neutralizing antibody significantly reversed the IL-6-induced EMT phenotype, suggesting that this cytokine is necessary for CAF-induced EMT in the progression of human bladder cancer. Finally, we observed that *IL6* expression is up-regulated in aggressive bladder cancer and correlate with CAF marker *ACTA2*. **Conclusions:** We conclude that CAFs promote aggressive phenotypes of non-invasive bladder cancer cells through an EMT induced by the secretion of IL-6.

Keywords: CAFs; IL-6; EMT; bladder cancer

Background

Bladder cancer is the 9th most commonly diagnosed cancer and is ranked 13th for cancer deaths in the overall population worldwide. Of all newly diagnosed cases, 75% present as non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) disease, while 25% present as muscle-invasive bladder cancer (MIBC) disease with 10–15% of cases that are already metastatic [1,2]. Of all solid cancers, bladder cancer has the highest rate of recurrence. After first line of treatment, 50% to 70% of patients with NMIBC will experience disease recurrence within 5 years and 10% to 30% of them will see their cancer progress to an invasive form [3-5].

The complex process of tumor metastasis consists of multiple steps during which cancer cells spread from primary tumor to other organs. Metastasis involves the epithelial–mesenchymal transition (EMT) process by which cancer cells transit between adherent epithelial and mobile mesenchymal states facilitating cancer cells dissemination. Epithelial cells loss E-cadherin expression, cell-cell adhesion and apico-basal polarization to gain vimentin expression and motility [6]. EMT is regulated by several transcription factors including snail homolog 1 (SNAIL1), twist basic helix–loop–helix transcription factor 1 (TWIST1) and zinc-finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1) [6]. Cadherin switch from E-cadherin to N-cadherin is a key step occurring during the EMT process [7]. This down-regulation of the E-cadherin and also the phosphorylation of GSK3 β , an effector of Wnt signaling pathway, are associated with the release of β -catenin, which then translocates to the nucleus and activates the Wnt signaling pathway, known to be involved in metastasis formation. However, the precise molecular events that initiate this complex EMT process in bladder cancer are poorly understood. Increasing evidence suggests that the tumor microenvironment (TME) plays an important role in promoting EMT in tumor cells. Fibroblasts, the predominant stromal cell type in the TME, are activated by tumor cells into cancer-associated fibroblasts (CAFs) through the secretion of paracrine growth factors [8]. CAFs display a specific subset of markers, including α -smooth muscle actin (α -SMA; coded by *ACTA2* gene), fibroblast-activating protein (FAP), fibroblast-specific protein-1 (FSP1) and tenascin C [9,10]. Previous studies suggest that CAFs play a pivotal role in establishing a metastatic niche and promoting tumor cell proliferation, invasion and metastasis by secretion of chemokines and cytokines in the microenvironment [9,11,12]. However, it is still unclear by which mechanisms CAFs affect the metastatic potential of

bladder cancer cells.

IL-6 is a pleiotropic cytokine that modulates a variety of physiological events including metabolism, inflammation and immune response [13]. Activation of classic signalling requires binding of the IL-6 to its receptor (IL-6R) inducing the phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), which dimerizes and translocates into the nucleus to regulate target gene transcription. A number of studies have highlighted the role of IL-6 and STAT3 in promoting tumor metastasis as their overexpression and/or hyper-activation have been reported in several human cancers [14, 15, 16]. Moreover, the level of IL-6 in blood of patients has been suggested as a prognostic marker [17]. Also, studies have shown that IL-6 contributes to cancer's drug resistance [18]. IL-6 is overexpressed in bladder cancer tissues compared to non-malignant tissues at both mRNA and protein levels and elevated IL-6 levels correlated with higher clinical stage, higher recurrence rate after curative treatment, and reduced survival rate [19].

Although there is evidence suggesting that CAFs and IL-6 may be a critical factor in metastatic spreading, their role in EMT of bladder cancer cells remains unclear. Therefore, we designed this study to understand how CAFs may be promoting EMT in bladder cancer cells. Our results suggest that iCAF^s induce EMT-related changes in cancer cells predominantly via the secretion of IL-6. We showed that the exposition of bladder cancer cells to the CAF conditioned medium (CM^{iCAF}) significantly induced the expression of N-cadherin, vimentin, SNAIL1, TWIST1 and ZEB1 while repressing E-cadherin and phospho- β -catenin expression. In addition, the CM^{iCAF} significantly enhanced cancer cell proliferation, migration and invasion. We also observed that *IL6* expression is up-regulated in aggressive bladder cancer tissues, correlates with CAF marker *ACTA2* and is associated with a poor prognosis. These results suggest an important role of IL-6 in mediating EMT and metastatic spreading of bladder cancer cells.

Methods

Ethics statement

Bladder biopsies from paediatric patients undergoing non-oncologic urologic surgery were obtained at the CHU de Québec Research Center in accordance with the institutional review board. All patients provided their formal, informed and written consent, each agreeing to supply a biopsy for this study.

Cell isolation and culture

Healthy primary bladder fibroblasts (HFs) were isolated from two different human bladder biopsies as previously described [8, 20]. Briefly, the stroma was separated from the urothelium after incubation overnight at 4°C in HEPES buffer with 500 µg/mL thermolysin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO). Fibroblasts were enzymatically dissociated from the extracellular matrix by treating the stroma with 0.125 U/mL collagenase H (Roche, Missisauga, Canada) for 3h at 37°C under gentle agitation. Then, fibroblasts were cultured in Dulbecco-Vogt modified Eagle's media (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Burlington, Canada) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 25 µg/ml gentamicin; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO). The results from the two HF populations were pooled together to minimize excessive data spread due to inter-individual variations. The RT4 bladder cancer cell line was obtained from the ATCC (HTB-2™) and cultured in DMEM containing 10% FBS and antibiotics. We selected the RT4 cells for our studies as a representative example of non-invasive bladder cancer cells [20]. Cells were cultured fewer than 5 passages after purchasing them for all the experiments and tested for mycoplasma contamination. Proteins were collected in RIPA buffer containing protease inhibitors Complete (Roche, Missisauga, Canada), quantified using the BCA kit and store at -80°C until their use.

Exosomes production and isolation

Exosomes were isolated as previously described [8]. Briefly, to remove any residual bovine exosomes from the FBS, serum was treated with the FBS Exosome Depletion Kit (Norgen Biotek Corp., ON, Canada) according to manufacturer's instructions. Bladder cancer cells were cultured in DMEM containing 10% exosome-depleted FBS for 48 h. Then, the conditioned medium was centrifuged at 2000 g for 30 min to remove cells and debris, and

the supernatant was mixed with 0.5 volume of the Total Exosomes Isolation Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Samples were mixed thoroughly by vortexing and incubated at 4°C overnight. Then, they were centrifuged at 10,000 g for 60 min at 4°C. Exosomes, contained in the pellet, were re-suspended in phosphate buffered saline (PBS). The protein concentration was measured by using the BCA kit (Pierce™, ThermoFisher, Waltham, MA).

CAF induction

HF_s were co-cultured with freshly isolated exosomes (1 mg/ml) for 48 h in DMEM 10% exosome-free FBS. Recombinant human transforming growth factor β 1 (rhTGF β 1; 4 ng/mL, Peprotech, Rocky Hill, NJ) was used as a positive control. Then, the supernatant was aliquoted and store at -80°C until the ELISA assay, while proteins were collected in RIPA buffer containing protease inhibitors CComplete (Roche, Mississauga, Canada), quantified with the BCA kit and store at -80°C until the Western blots. RNAs were isolated using 1 mL of TRIzol Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) and stored at -80°C until the RT-PCR assay.

Preparation of the conditioned medium

HF_s, HF_s+TGF β or induced CAF_s (iCAF_s) were cultured in DMEM containing 10% FBS and antibiotics until they reached a confluency of approximately 80%, the cell culture medium was thus collected and centrifuged at 1,200 g for 10 min. RT4 bladder cancer cells were cultured in freshly collected conditioned mediums (CM).

Immunoblot

Equal amounts of proteins (10 μ g) were loaded into 12% polyacrylamide gels, resolved by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. Membranes were blocked for 30 minutes with 5% non-fat milk and 0.05% Tween 20 in PBS, and then incubated with primary antibodies overnight at 4°C followed by 45 min at RT with HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). The protein expression was detected using the Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Bands were imaged by using the Fusion Fx7 imager (Vilber Lourmat, France) and analyzed with the ImageJ software (NIH,

Bethesda, MD). The following antibodies were used: α SMA (1/5,000; Abcam, San Francisco, CA), FAP (1/1000, Novus Biologicals, Littleton, CO), tubulin (1/1,000; Novus Biologicals, Littleton, CO), E-cadherin (1/3,000; R&D Systems, Minneapolis, MN), N-cadherin (1/3,000; Millipore, Burlington, MA), vimentin (1/1,000; Abcam, San Francisco, CA), phospho- β -Catenin (1/1,000; Cell Signaling, Danvers, MA), total β -catenin (1/1,000; Abcam, San Francisco, CA), pGSK3 β (1/500; Cell Signaling, Danvers, MA), GSK3 β (1/750; Cell Signaling, Danvers, MA), SNAIL1 (1/2000; Invitrogen, Carlsbad, CA), TWIST1 (1/1500; LifeSpan BioSciences, Seattle, WA), ZEB1 (1/1000; Abcam, San Francisco, CA), IL-6R (1/1,000; Abcam, San Francisco, CA), pSTAT3 (1/1,000, Cell Signaling, Danvers, MA), STAT3 (1/1,000; Cell Signaling, Danvers, MA) and β -actin (1/5,000; Abcam, San Francisco, CA), pAKT (1/1000; Cell Signaling, Danvers, MA), AKT (1/1000; Cell Signaling, Danvers, MA).

ELISA

IL-6 protein expression was quantified by using an ELISA according to the manufacturer's protocol (Duoset; R&D Systems). The plates were read at 450 nm using a SpectraMax Plus spectrometer with SoftmaxPro Version 4.7.1.

RT-qPCR

RNA was extracted using the TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed on a Bioanalyzer using the Agilent RNA 600 Nano Kit. The concentration and purity of the RNA was determined using a NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). One μ g of RNA was used to reverse transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA). qPCR was performed in triplicate using the DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) and Lightcycler® 480 system (Roche, Mississauga, Canada), following the manufacturer's instructions. The β -2-microglobulin transcript was used as an endogenous control for normalization.

Proliferation assay

RT4 cells were seeded in 96-well plates at a density of 3×10^3 cells/well and allowed to attach for 12h. Then, RT4 were treated with the CM from HFs, HFs+TGF β or iCAFs for 24

h in presence or absence of an anti-IL-6 antibody (1 µg/mL). Cell proliferation was assessed by fluorometric quantification of DNA using CyQUANT Proliferation Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions.

Cell migration assay

RT4 cells were first seeded at a concentration of 4×10^4 cells/100 µl in both chambers of an Ibidi-silicone insert (Ibidi, Martinsried, Germany). This insert allows for the formation of a well-defined edge without physically scratching or wounding the cell monolayer. Cells were cultured for 24 h in DMEM containing 10% FBS to form a confluent monolayer. Then, cells were grown in serum-free DMEM and Mitomycin C (5 µg/ml, Sigma #M4287) to inhibit cell proliferation for 12 hours prior to careful removal of the insert. Cells were incubated in the CM from HFs, HFs+TGFβ or iCAFs for 24h in presence or absence of an anti-IL-6 antibody (1 µg/mL). The migration was visualized at the indicated times (0, 6, and 12 h) under an inverted microscope (TE2000, Nikon). Migration distances were measured using the ImageJ analysis software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Transwell invasion assays

Invasion assays were performed using transwell 24-well plates with 8-µm diameter filters (Corning, NY, USA). Filters were precoated with 40 µL of purified Type I bovine collagen gel (2.5 mg/mL, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) and incubated for 4 h at 37°C. Approximately 1×10^5 cells in 200 µL of serum-free DMEM + Mitomycin C (5 µg/ml) with or without an anti-IL-6 antibody (1 µg/ml) were placed in the upper chamber and 500 µL of the CM from HFs, HFs+TGFβ or iCAFs was added in the lower chamber. The plates were incubated for 24 h. Then, cells on the upper side of the filters were removed with a cotton swab, and the filters were washed with PBS. Cells were fixed in methanol for 15 min and nuclei were stained with DAPI. The relative cell migration was determined by the number of migrated cells in 10 randomly selected fields.

Mitomycin C sensitivity assay

RT4 cells were seeded in 96-well plates at a density of 3×10^3 cells/well and allowed to attach for 12 h. Then, RT4 cells were treated with the CM from HFs, HFs+TGFβ or iCAFs for 24 h in presence or absence of mitomycin C (0,5 µg/mL, Sigma-Aldrich, Saint-Louis,

MO). Plates were washed with PBS to remove any debris and cell viability was assessed by fluorometric quantification of DNA using CyQUANT Proliferation Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions.

Genomic data processing and tumor purity analysis

Clinicopathological profiles and genomic data from TCGA [22] and GSE13507 [23] were downloaded respectively on GDC (Genomic Data Common; <https://portal.gdc.cancer.gov/>) and GEO (Gene Expression Omnibus; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) data portal (n=412 and n=272, respectively). The expression of *IL6* in human bladder cancer specimens was analyzed using GraphPad Prism 7.0 in bladder cancer patients linked with their clinical parameters and follow-up data information. Tumor purity of the TCGA datasets was obtained using the ABSOLUTE algorithm (<https://confluence.broadinstitute.org/display/CGATools/ABSOLUTE> (2013)). We applied a Pearson's correlation to test for the association between tumor sample purity and mRNA expression of *IL6* and *ACTA2* expression.

Statistical analysis

Graphical representation of data and statistical analysis was performed with the GraphPad Prism v.7 Software (San Diego, CA, USA). The results are expressed as mean \pm standard error (SD) and were interpreted using one- or two-way analysis of variance (ANOVA). mRNA expression distribution was analyzed using the non-parametric Mann-Whitney U test. Survival analyses were determined by Kaplan-Meier method, where the difference was evaluated by the Log-rank test. Differences between the groups were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Healthy bladder primary fibroblasts treated with bladder cancer-derived exosomes exhibit characteristics of CAFs

To induce the activation of healthy bladder primary fibroblasts (HFs) into CAFs (iCAF), we cultured HFs with 1 mg/mL of bladder cancer-derived exosomes for 48 h [20]. HFs + TGF β was used as positive control for activated fibroblasts [8]. iCAFs were positive for α SMA staining and exhibited a spindle-shape morphology, similar to CAFs (Figure 1A). Moreover, iCAFs presented higher levels of α SMA and FAP proteins expression (Figure 1B).

iCAFs induce EMT program in bladder cancer cells

As EMT plays a pivotal role in tumor metastasis, we investigated the effects of iCAFs on cancer cells EMT, the CM^{iCAF} was collected and used to grow the bladder cancer cell line RT4 (Figure 2A). We examined changes of EMT phenotype induced by CM^{iCAF} by measuring the protein expression of epithelial markers E-cadherin, phospho- β -catenin and phospho-GSK β and of mesenchymal markers N-cadherin and vimentin. Results showed that RT4 cells cultured with CM^{iCAF} had decreased expression of E-cadherin, phospho- β -catenin and phospho-GSK3 β , while the expression of N-cadherin and vimentin was increased (Figure 2B). To investigate whether the EMT programming was activated by the CAF secretome in RT4 cells, the expression of EMT-related transcription factors (EMT-TFs) SNAIL1, TWIST1 and ZEB1 was measured by qPCR. The results showed that *SNAIL1* and *ZEB1* expression levels were highly upregulated, while *TWIST1* expression levels were slightly increased in RT4 cells cultured with CM^{iCAF} (Figure 2C). These results were also confirmed at protein level (Figure 2D). These results suggested that the CAF secretome enhances the aggressive behaviour of bladder cancer cells by inducing an EMT phenotype through well-known EMT-TFs.

iCAFs activate the STAT3 signalling pathway in bladder cancer cells via IL-6 secretion

The pro-inflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6) has been shown as an important EMT inducer in breast and lung cancers [14, 15]. Therefore, we quantified the IL-6 mRNA expression in HFs, HFs+TGF β and iCAF cells as well as the IL-6 protein secretion in

supernatants. Our results showed that iCAFs expressed more *IL6* mRNA and secreted significantly more IL-6 protein than HFs (Figure 3A, B). In order to determine if RT4 cells could interact with iCAFs-secreted IL-6, we evaluated the expression of the IL-6R on RT4 cells. The IL-6R was highly expressed in RT4 cells compared to iCAFs, indicating that IL-6 could induce responses in RT4 cells (Figure 3C). The canonical IL-6 signal transduction pathway is initiated by the cytokine binding to the IL-6R and the subsequent phosphorylation of STAT3. To investigate the effect of the CM^{iCAF} on the activation of IL-6 signaling pathway in bladder cancer cells, we compared the expression levels of phosphorylated STAT3 (pSTAT3) and phosphorylated AKT (pAKT) in RT4 cells cultured with CM^{iCAF} to control media (CM^{HF} and CM^{HF + TGFβ}). The results showed that CM^{iCAF} significantly increased pSTAT3 and pAKT in RT4 cells compared to CM^{HF}, while total STAT3 and AKT expression remained unchanged (Figure 3D).

iCAFs-secreted IL-6 promotes the proliferation, migration and invasion of bladder cancer cells

The tumor metastatic cascade is characterized by the activation of EMT process in cancer cells, where loss of cell–cell junctions and cell polarity lead to the acquisition of migratory and invasive properties. Therefore, we investigated the role of iCAFs-secreted IL-6 on cell growth and motility of RT4 cells treated with CM^{iCAF} with or without the anti-IL-6 neutralizing antibody. When RT4 cells were treated with CM^{iCAF}, the proliferation rate increased by 21.2% after 24h (Figure 4A). To test the specificity of the IL-6 stimulation, we added an anti-IL-6 antibody (x-IL-6) to the culture medium to block IL-6-induced proliferation. The activity of the IL-6 on cell proliferation of RT4 cells was reversed by the anti-IL-6 antibody (Figure 4A). The migration assay was used to examine the effect of the iCAFs-secreted IL-6 on RT4 cells. As shown in Figure 4B, the CM^{iCAF} increased the migration activity of RT4 cells significantly. When RT4 cells were incubated with the CM^{iCAF} and proliferation inhibitor, the migration rate after 6h and 12h was increased of 36.4 and 23.7%, respectively (Figure 4B). To examine the effect of the iCAFs-secreted IL-6 on the invasion of RT4 cells, a transwell assay was used where artificial extracellular matrix (ECM) was precoated on the upper side of all filters. We found that the number of cells that invaded through the ECM was raised by 51.5% when RT4 cells were cultured in the CM^{iCAF} compared to the CM^{HF} (Figure 4C). In addition, when RT4 cells were treated with the

CM^{iCAF} in combination with the anti-IL-6 antibody (1 µg/ml), the IL-6-induced cell migration and invasion was markedly inhibited (Figure 4B, C). These data imply that the iCAFs-secreted IL-6 is clearly implicated in the proliferation, migration and invasion abilities of RT4 cells.

The CM^{iCAF} increases cancer cell survival in response to the chemotherapeutic drug mitomycin C

Chemotherapeutic agents such as mitomycin C have long been used to treat bladder tumors, but development of drug resistance remains a substantial problem [1, 21]. To investigate how CAFs might influence the sensitivity of bladder cancer cells to mitomycin C, RT4 cells were cultured in the CM from HFs, HFs+TGFβ or iCAFs with 0.5 µg/mL mitomycin C. As expected, the viability of RT4 cells was significantly decreased by 72.9% after the addition of mitomycin C for 12 hours, demonstrating the effectiveness of the drug (Figure 4D). When cultured with the CM^{iCAF}, RT4 cells showed reduced cell death (12.3%) as compared with the CM^{HF}. However, cell death was not significantly reduced after the addition of the anti-IL-6 antibody to CM^{iCAF} compared to the CM^{iCAF} alone (12.4% vs 12.3%). Thus, cell death induced by mitomycin C was attenuated by the CM^{iCAF} but was not mediated by the iCAFs-secreted IL-6.

***IL6* expression is up-regulated in aggressive bladder cancer, correlates with the CAF marker *ACTA2* and stromal compartment and is associated with poor clinical outcome**

We analyzed *IL6* and *ACTA2* expression in the publicly available TCGA and GSE13507 gene expression profiling datasets of human bladder cancer samples [22-23]. The stratification of patients according to tumor staging, grading and invasiveness revealed that *IL6* expression was found up-regulated in stage III/IV compared to stage I/II (****P<0.0001), in high grade compared to low grade (****P<0.0001) and in invasive compared to superficial bladder cancer (****P<0.0001) (Figure 5A-C). Similar results were obtained with CAF marker *ACTA2* expression, suggesting an activation of fibroblasts in aggressive bladder cancer (Figure 5D-F). The expression levels of *IL6* and *ACTA2* were positively correlated (r=0.4543; ****P<0.0001; Figure 5G). Moreover, Kaplan–Meier analysis of the cancer specific survival showed a significant correlation between patients

with high versus low *IL6/ACTA2* expression (Figure 5H, HR=2.738, 95% CI=1.056-7.099, *P=0.0471). Tumor purity is the proportion of cancer cells within a tumor. Despite some selection for inclusion, TCGA tissue samples may retain a heterogeneous mix of cell types, causing varying levels of tumor purity. To independently assess the origin of *IL6* and *ACTA2* expression, we correlated bladder cancer tumor purity scores generated using the ABSOLUTE algorithm with the corresponding *IL6* and *ACTA2* expression. To this end, TCGA samples with matching RNAseq expression and ABSOLUTE-based tumor purity estimates (N=399) were analyzed. We observed a highly negative correlation between the tumor purity and *IL6* mRNA ($r=-0.6274$; ****P<0.0001. Supplementary Figure 2A) or *ACTC2* mRNA ($r=-0.4888$; ****P<0.0001. Supplementary Figure 2B), indicating that higher average *IL6* and *ACTA2* expression correspond with higher stromal component of the tumor. We next investigated whether *ACTA2/IL6* mRNA co-expression in bladder cancer tumors correlated with clinicopathological features. For these analyses, bladder cancer patients were stratified based on low and high quartiles of *ACTA2/IL6* co-expression levels in tumors. As shown in Table 1, no significant association was observed between *ACTA2/IL6* mRNA co-expression and patient age, metastatic invasion, cancer recurrence or progression. A correlation was seen between high *ACTA2/IL6* co-expression and the tumor grade (*P=0.0179) and lymph node metastasis (*P = 0.0281). A strong association was observed between high *ACTA2/IL6* mRNA co-expression and tumor invasiveness (****P<0.0001), correlating with our *in vitro* findings.

Discussion

EMT plays a crucial role in metastasis dissemination and is correlated with poor prognosis in cancer patients [24-26]. However, the precise molecular events that initiate this complex process in bladder cancer are still poorly understood. A mounting body of evidence suggests that dynamic interplay between cancer cells and their microenvironment contributes to metastasis [27-30]. CAFs represent the major component of the TME and have been reported to support tumor progression by a variety of mechanisms [31-35]. However, their role in EMT of bladder cancer cells remains poorly defined.

Thus, we induced the activation of HFs into iCAF_s in order to examine their role in bladder cancer cell EMT activation. We found that iCAF_s promotes the upregulation of mesenchymal markers, such as N-cadherin and vimentin, while repressing epithelial markers E-cadherin and p- β -catenin expression in bladder cancer cells. In presence of Wnt ligands, the glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) is inhibited by phosphorylation, leading to the accumulation and nuclear translocation of β -catenin. In the nucleus, β -catenin binds to the lymphoid-enhancing factor/T-cell factor (LEF/TCF), to initiate the transcription of EMT genes [36-38]. Therefore, the increase expression of phosphorylated GSK3 β and decreased expression of the p- β -catenin in RT4 cells cultured in the CM^{iCAF} suggests a decrease in the β -catenin degradation, confirmed by the total- β -catenin Western blotting. Moreover, EMT transcription factors SNAI1, TWIST1 and ZEB1 were upregulated in the CM^{iCAF}-cultured RT4 cells.

The extent to which specific proteins secreted by CAFs contribute directly to tumor progression is unclear. Previous studies have showed that IL-6 is involved in tumor progression and metastasis in various types of cancer, including lung cancer [39], pancreatic cancer [40], liver cancer [41], gastric cancer [42] and colon cancer [43]. In bladder cancer, clinical findings showed that patients have higher serum IL-6 levels than the healthy controls and that higher IL-6 levels are associated with poorer prognosis [44-45]. However, the association between CAFs and IL-6 secretion in bladder cancer has not been shown. These studies drove us to investigate the role of IL-6 in bladder cancer. We examined the expression of IL-6 by iCAF_s and its receptors on the bladder cancer cell line RT4. We found that IL-6 was upregulated in iCAF_s compared to HFs. Similarly, IL-6 have been found to be increased in fibroblasts cultured with the CM from lung cancer [18].

Moreover, RT4 express its receptor IL-6R, indicating that RT4 cells were suitable to respond to the iCAF-secreted IL-6 cytokine. Initiation of metastasis requires EMT, which is characterized by enhanced capability of active locomotion of cancer cells. We found that the iCAF-secreted IL-6 could promote cell growth, migration and invasion significantly. To our knowledge, this is the first study that has shown that iCAF-secreted IL-6 was enough to transform a non-invasive cell line (RT4) into invasive-like cells.

To determine the potential of targeting IL-6 signaling in bladder cancer patients, we performed *in silico* analysis using *IL-6* expression data acquired from public database. Remarkably, we demonstrated that *IL-6* was expressed at higher levels in bladder cancer stages III/IV than in stages I/II. Moreover, high *IL-6* expression was preferentially associated with high grade MIBC. These results are somewhat consistent with the analysis of Andrews et al., in which a small cohort of human bladder cancer plasma samples revealed IL-6 were associated with cancer stage, metastasis and disease specific survival [44]. Therefore, *IL-6* expression might be related to a more malignant phenotype. In addition, *IL-6* correlates with CAF marker *ACTA2* and negatively correlates with tumor purity, suggesting that IL-6 is produced primarily by CAFs and not tumor cells. Nonetheless, our analysis revealed a correlation between high *IL6/ATCA2* mRNA levels and poor cancer specific survival.

Taken together, our results reveal that IL-6 secreted from iCAFs promotes malignant behavior through the activation of the EMT program in bladder cancer cells. These results provide a mechanistic explanation for the role of IL-6 in the bladder cancer microenvironment, as well as the correlation observed between high IL-6 levels and metastatic potential in bladder cancer patients. Overall, our findings may serve as an attractive therapeutic target for human bladder cancer driven by IL-6 signaling. In this study, we demonstrated that IL-6 blockade reverses the effect of CAFs on tumor progression. Therefore, since IL-6 blocking antibodies are already approved by the Food and Drug Administration (FDA), such an approach to impede CAFs functions may be a clinical promising strategy. In solid tumour model, siltuximab, an IL-6 antibody, has demonstrated antitumor efficacy against ovarian, prostate, and lung cancers [16]. Despite these preclinical data, there remains a dearth of clinical trials investigating targeted approaches, such as *IL-6* signaling inhibition, particularly in bladder cancer. IL-6 signal through multimeric complexes that includes the gp130 receptor/IL-6R α chain and

ultimately triggers a signaling cascade that is mediated by STAT3 pathway. STAT3 activation was demonstrated to drive the proliferation, survival, invasiveness, and metastasis of tumor cells, while strongly suppressing the antitumour immune response [16]. Moreover, STAT3 activation was associated with bladder cancer cell growth and survival [46]. In our study, we observed that iCAFs activates the STAT3 signaling pathway in RT4 cells. OPB-31121 and OPB-51602 are orally administrated STAT3 inhibitors, which are capable of binding to the SH2 domain of STAT3, and disrupt STAT3 dimerization and DNA binding activity, and are currently under evaluation in clinical trials (NCT00657176, NCT01406574, NCT01423903 and NCT01184807). A combination of these two drugs could be used to more efficiently target some of the downstream mediators of IL-6 signaling.

Our study has some limitations. The TME consists of cancer cells, fibroblasts, endothelial cells, and immune cells, all of which contribute to the tumor secretome. Although our findings were focused on the interaction between tumor cells and CAFs, IL-6 is a multifunctional cytokine known to be secreted by and to influence multiple cell types in the TME, from immune to endothelial cells, and therefore, it is important to keep in mind the potential influence of these cells in our system [47-48]. Thus, this strongly indicates that neutralization of IL-6 signaling could have even more potent antitumor effects.

Conclusion

Identify factors involved in the dynamic interaction between tumor cells TME is much-needed to improve cancer therapy. Herein, we show how one of the mediators of such an interaction, namely IL-6, mainly secreted by CAFs, can support tumor progression and how it can be antagonized by a neutralizing antibody to its receptor, which significantly reduces proliferation, migration and invasion in bladder cancer cells. These results highlight a prominent role for CAFs in bladder cancer and provide a framework for further studies to develop relevant TME-based anti-cancer therapy.

List of abbreviations

α -SMA: Alpha smooth muscle actin

CAF: Cancer-associated fibroblast

CM: Conditioned medium

DMEM: Dulbecco-Vogt modified Eagle's media

iCAF: Induced cancer-associated fibroblast

EMT: Epithelial-mesenchymal transition

FAP: Fibroblast associated protein

FBS: Fetal bovine serum

FDA: Food and Drug Administration

GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 beta

HF: Healthy fibroblast

IL-6: Interleukin 6

IL-6R: IL-6 receptor

LEF: Lymphoid-enhancing factor

MIBC: Muscle-invasive bladder cancer

NMIBC: Non-muscle-invasive bladder cancer

pSTAT3: Phosphorylated STAT3

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3

TCF: T-cell factor

TME: Tumor microenvironment

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Bladder biopsies from paediatric patients undergoing non-oncologic urologic surgery were obtained at the CHU de Québec-Université Laval Research Center in accordance with the institutional review board. All legal guardians of donors provided their formal, informed and written consent, each agreeing to supply a biopsy for this study.

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and material

TCGA and GSE13507 datasets are available on GDC (Genomic Data Common; <https://portal.gdc.cancer.gov/>) and GEO (Gene Expression Omnibus; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) data portal.

Competing interests

Frédéric Pouliot has received speaker's bureau honoraria from Sanofi, Genzyme, Amgen, Astellas, and Janssen; he is a consultant/advisory board member of Sanofi, Abbvie, Astellas, Janssen, Genzyme and Roche. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Funding

This work was supported by a Bladder Cancer Canada Grant (FP and CRG) and a Ferring Innovation Grant (SB). CRG and AC are recipient of an FRQS Doctoral Research Award from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS). FP is a Research Scholar of the FRQS. SB is the recipient of Canadian Urological Association Scholarship Funds and Canadian Institute for Health Research Grant #258229. The funders had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Author contributions

CRG designed and performed the experiments and analyzed the data. GB and DV performed the experiments. AC analysed TCGA and GSE13507 datasets. CRG wrote the manuscript and SC and AC revised it. SB and FP supervised the study and revised the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript

Acknowledgments

We thank Solange Landreville, Bastien Paré and Isabelle Lorthois for their critical comments and experimental input. This work was supported by a Bladder Cancer Canada Grant (FP and CRG) and a Ferring Grant (SB). CRG and AC are recipient of a Doctoral Research Award from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS). FP is a Research Scholar of the FRQS. SB is the recipient of Canadian Urological Association Scholarship Funds and Canadian Institutes of Health Research Grant #258229.

References

1. Pugashetti N, Alibhai SMH, Yap SA. Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: Review of Diagnosis and Management. *Journal of Current Clinical Care*. 2015; 5:40–50.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2016; 66:7–30.
3. Kamat AM, M Hahn N, A Efstathiou J, P Lerner S, Malmstrom P-U, Choi W, et al. Bladder cancer. *The Lancet*. Elsevier Ltd; 2016; 388:2796–810.
4. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, et al. Bladder cancer. *Nature Publishing Group*. Macmillan Publishers Limited; 2017; 3:1–19.
5. Mari A, Campi R, Tellini R, Gandaglia G, Albisinni S, Abufaraj M, et al. Patterns and predictors of recurrence after open radical cystectomy for bladder cancer: a comprehensive review of the literature. *World J Urol*. Springer Berlin Heidelberg; 2018; 36:157–70.
6. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* American Society for Clinical Investigation; 2009; 119:1420–8.
7. Bryan RT, Tselepis C. Review Articles Cadherin Switching and Bladder Cancer. *Journal of Urology*. Elsevier Inc; 2010; 184:423–31.
8. Ringuette-Goulet C, Bernard G, Tremblay S, Chabaud S, Bolduc S, Pouliot F. Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-Associated Fibroblasts through TGF β Signaling. *Molecular Cancer Research*. American Association for Cancer Research; 2018;1–25.
9. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6:392–401.
10. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*. 2014;211:1503–23.

11. Tao L, Huang G, Song H, Chen Y, Chen L. Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment (Review). *Oncol Lett.* 2017;1–10.
12. Augsten M. Cancer-Associated Fibroblasts as Another Polarized Cell Type of the Tumor Microenvironment. *Front. Oncol. Frontiers*; 2014; 4:1–8.
13. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2014;6: a016295–5.
14. Abana CO, Bingham BS, Cho JH, Graves AJ, Koyama T, Pilarski RT, et al. IL-6 variant is associated with metastasis in breast cancer patients. Coleman WB, editor. *PLoS ONE.* 2017;12: e0181725–15.
15. Shang G-S, Liu L, Qin Y-W. IL-6 and TNF- α promote metastasis of lung cancer by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Lett.* 2017; 13:4657–60.
16. Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology.* 2018; 15: 234-248.
17. Chang CH, Hsiao CF, Yeh YM, Chang GC, Tsai YH, Chen YM, Huang MS, Chen HL, Li YJ, Yang PC, Chen CJ, Hsiung CA, Su WC. Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Int J Cancer.* 2013 May 1;132(9):1977-85.
18. Shintani Y, Fujiwara A, Kimura T, Kawamura T, Funaki S, Minami M, Okumura M. IL-6 Secreted from Cancer-Associated Fibroblasts Mediates Chemoresistance in NSCLC by Increasing Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling. *J Thorac Oncol.* 2016 Sep;11(9):1482-92.

19. Chen MF, Lin PY, Wu CF, Chen WC, Wu CT. IL-6 Expression Regulates Tumorigenicity and Correlates with Prognosis in Bladder Cancer. *PLoS ONE*. 2013;8:e61901–10.
20. Ringuette-Goulet C, Bernard G, Chabaud S, Couture A, Langlois A, Neveu B, et al. Tissue-engineered human 3D model of bladder cancer for invasion study and drug discovery. *Biomaterials*. 2017; 145:233–41.
21. Chou R, Selph SS, Buckley DI, Gustafson KS, Griffin JC, Grusing SE, et al. Treatment of muscle-invasive bladder cancer: A systematic review. *Cancer*. 2016; 122:842–51.
22. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, Hinoue T, Laird PW, Hoadley KA, Akbani R, Castro MAA, Gibb EA, Kanchi RS, Gordenin DA, Shukla SA, Sanchez-Vega F, Hansel DE, Czerniak BA, Reuter VE, Su X, de Sa Carvalho B, Chagas V, Mungall KL, Sadeghi S, Pedamallu CS, Lu Y, Klimczak LJ, Zhang J, Choo C, Ojesina AI, Bullman S, Leraas KM, Lichtenberg TM, Wu CJ, Schultz N, Getz G, Meyerson M, Mills GB, McConkey DJ; TCGA Research Network, Weinstein JN, Kwiatkowski DJ, Lerner SP. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*. 2017 Oct 19;171(3):540-556.e25.
23. Kim WJ, Kim EJ, Kim SK, Kim YJ, Ha YS, Jeong P, Kim MJ, Yun SJ, Lee KM, Moon SK, Lee SC, Cha EJ, Bae SC. Predictive value of progression-related gene classifier in primary non-muscle invasive bladder cancer. *Mol Cancer*. 2010 Jan 8; 9:3.
24. Breyer J, Gierth M, Shalekenov S, Aziz A, Schäfer J, Burger M, et al. Epithelial–mesenchymal transformation markers E-cadherin and survivin predict progression of stage pTa urothelial bladder carcinoma. *World J Urol*. 2016; 34:709–16.
25. Imani S, Hosseinifard H, Cheng J, Wei C, Fu J. Prognostic Value of EMT-inducing Transcription Factors (EMT-TFs) in Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Meta- analysis. *Sci. Rep.* Nature Publishing Group; 2016;6:1–10.

26. Wan T, Zhang T, Si X, Zhou Y. Overexpression of EMT-inducing transcription factors as a potential poor prognostic factor for hepatocellular carcinoma in Asian populations: A meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8:59500–8.
27. Catalano V, Turdo A, Di Franco S, Dieli F, Todaro M, Stassi G. Tumor and its microenvironment: A synergistic interplay. *Seminars in Cancer Biology*. Elsevier Ltd; 2013; 23:522–32.
28. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19:1423–37.
29. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2008;9:239–52.
30. Dvorak HF, Weaver VM, Tlsty TD, Bergers G. Tumor microenvironment and progression. Leong S, editor. *J. Surg. Oncol*. 2011;103:468–74.
31. Kharraishvili G, Simkova D, Bouchalova K, Gachechiladze M, Narsia N, Bouchal J. The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance. 2014;14:1–8.
32. Yamaguchi H, Sakai R. Direct Interaction between Carcinoma Cells and Cancer Associated Fibroblasts for the Regulation of Cancer Invasion. *Cancers*. 2015;7:2054–62.
33. Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, et al. Reciprocal Activation of Prostate Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts Stimulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stemness. *Cancer Research*. 2010;70:6945–56.
34. Zhuang J, Lu Q, Shen B, Huang X, Shen L, Zheng X, et al. TGFβ1 secreted by cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through lncRNA-ZEB2NAT. *Sci. Rep*. 2015;5:11924–13.

35. Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP. Cancer-Associated Fibroblasts Drive the Progression of Metastasis through both Paracrine and Mechanical Pressure on Cancer Tissue. *Molecular Cancer Research*. 2012;10:1403–18.
36. Verheyen EM, Gottardi CJ. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by protein kinases. *Dev. Dyn*. 2010;239:34–44.
37. Stamos JL, Weis WI. The B-Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Cold Spring Harbor Lab; 2013;5:a007898–8.
38. Jamieson C, Sharma M, Henderson BR. Wnt signaling from membrane to nucleus: β -catenin caught in a loop. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2012;44:847–50.
39. Wang L, Cao L, Wang H, Liu B, Zhang Q, Meng Z, Wu X, Zhou Q, Xu K. Cancer-associated fibroblasts enhance metastatic potential of lung cancer cells through IL-6/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017 Jun 28;8(44):76116-76128.
40. Wu YS, Chung I, Wong WF, Masamune A, Sim MS, Looi CY. Paracrine IL-6 signaling mediates the effects of pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition via Stat3/Nrf2 pathway in pancreatic cancer cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017 Feb;1861(2):296-306.
41. Xiong S, Wang R, Chen Q, Luo J, Wang J, Zhao Z, Li Y, Wang Y, Wang X, Cheng B. Cancer-associated fibroblasts promote stem cell-like properties of hepatocellular carcinoma cells through IL-6/STAT3/Notch signaling. *Am J Cancer Res*. 2018 Feb 1;8(2):302-316.
42. Wu X, Tao P, Zhou Q, Li J, Yu Z, Wang X, Li J, Li C, Yan M, Zhu Z, Liu B, Su L. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017 Mar 28;8(13):20741-20750.

43. Zhu L, Cheng X, Ding Y, Shi J, Jin H, Wang H, Wu Y, Ye J, Lu Y, Wang TC, Yang CS, Tu SP. Bone marrow-derived myofibroblasts promote colon tumorigenesis through the IL6/JAK2/STAT3 pathway. *Cancer Lett.* 2014 Feb 1;343(1):80-9.
44. Andrews B, Shariat SF, Kim JH, Wheeler TM, Slawin KM, Lerner SP. Preoperative plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor predict disease recurrence and survival of patients with bladder cancer. *J Urol.* 2002 Mar;167(3):1475-81.
45. Kumari N, Agrawal U, Mishra AK, Kumar A, Vasudeva P, Mohanty NK, Saxena S. Predictive role of serum and urinary cytokines in invasion and recurrence of bladder cancer. *Tumour Biol.* 2017 Apr;39(4):1010428317697552.
46. Chen CL, Cen L, Kohout J, Hutzen B, Chan C, Hsieh FC, Loy A, Huang V, Cheng G, Lin J. Signal transducer and activator of transcription 3 activation is associated with bladder cancer cell growth and survival. *Mol Cancer.* 2008 Oct 21; 7:78.
47. Chen MF, Lin PY, Wu CF, Chen WC, Wu CT. IL-6 expression regulates tumorigenicity and correlates with prognosis in bladder cancer. *PLoS One.* 2013 Apr 30; 8(4):e61901.
48. Kato T, Noma K, Ohara T, Kashima H, Katsura Y, Sato H, Komoto S, Katsube R, Ninomiya T, Tazawa H, Shirakawa Y, Fujiwara T. Cancer-Associated Fibroblasts Affect Intratumoral CD8⁺ and FoxP3⁺ T Cells Via IL6 in the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res.* 2018 Oct 1;24(19):4820-4833.

Figures

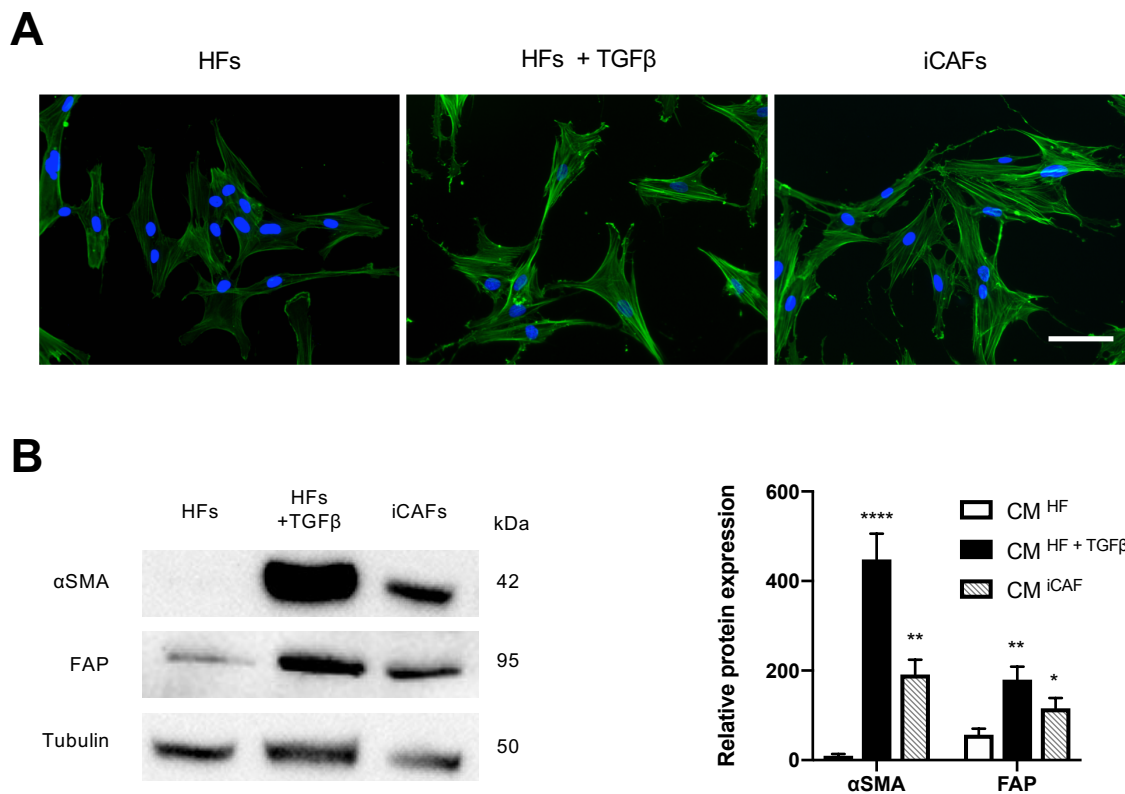


Figure 4.1 | Healthy vesical primary fibroblasts (HF_s) treated with bladder cancer-derived exosomes exhibit characteristics of cancer-associated fibroblasts (CAF_s).

HF_s were treated with 1 mg/mL of bladder cancer cells-derived exosomes for 48 h to induce their activation in CAF_s (iCAF_s). HF_s treated with TGF β 1 (4 ng/mL) served as a positive control. **A.** Cells were examined by immunocytochemistry for the expression of α SMA (α -smooth muscle actin, green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 100 μ m. **B.** The protein expression of α SMA, fibroblast-activating protein (FAP) was determined by western blot. The tubulin was used as loading control. The graph shows mean \pm SD. The difference between groups was analyzed by one-way ANOVA followed by post hoc analysis using Dunnett's multiple comparison tests. * P <0.05, ** P <0.01, **** P <0.0001, n =3.

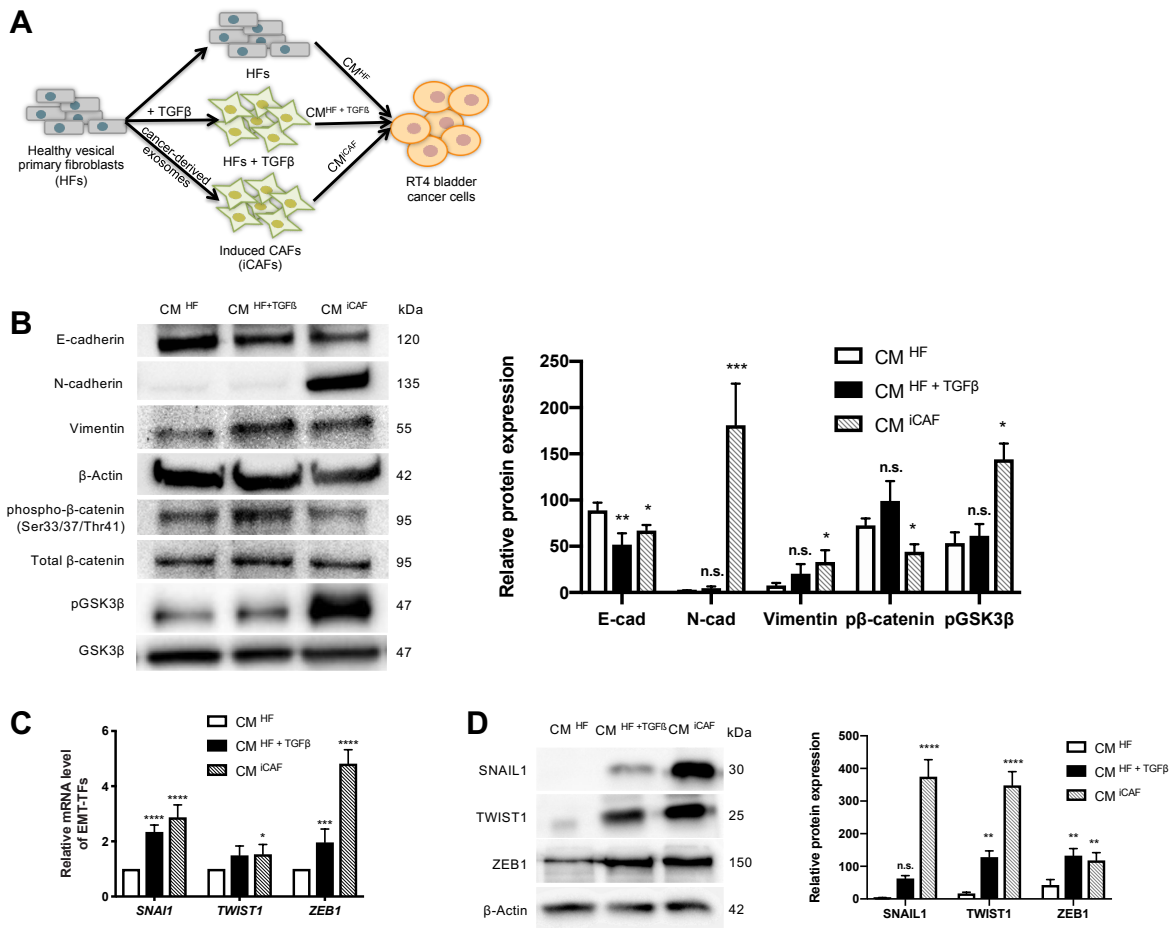


Figure 4.2 | The conditioned medium (CM) from CAFs induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) programming in RT4 bladder cancer cells.

A. Experimental design. **B.** The expression of epithelial markers E-cadherin, phospho-β-catenin (control: total β-catenin) and phospho-GSK3β (control: GSK3β total) and of mesenchymal markers N-cadherin and vimentin was analyzed by Western blotting. The β-actin was used as loading control. **C.** The expression of EMT-related transcription factors (EMT-TFs) was determined by qPCR or **D.** Western blotting. The graphs show mean +/- SD. The difference between groups was analyzed by one-way ANOVA followed by post hoc analysis using Dunnett's multiple comparison tests. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001, n.s. = non-significant, n=3-5.

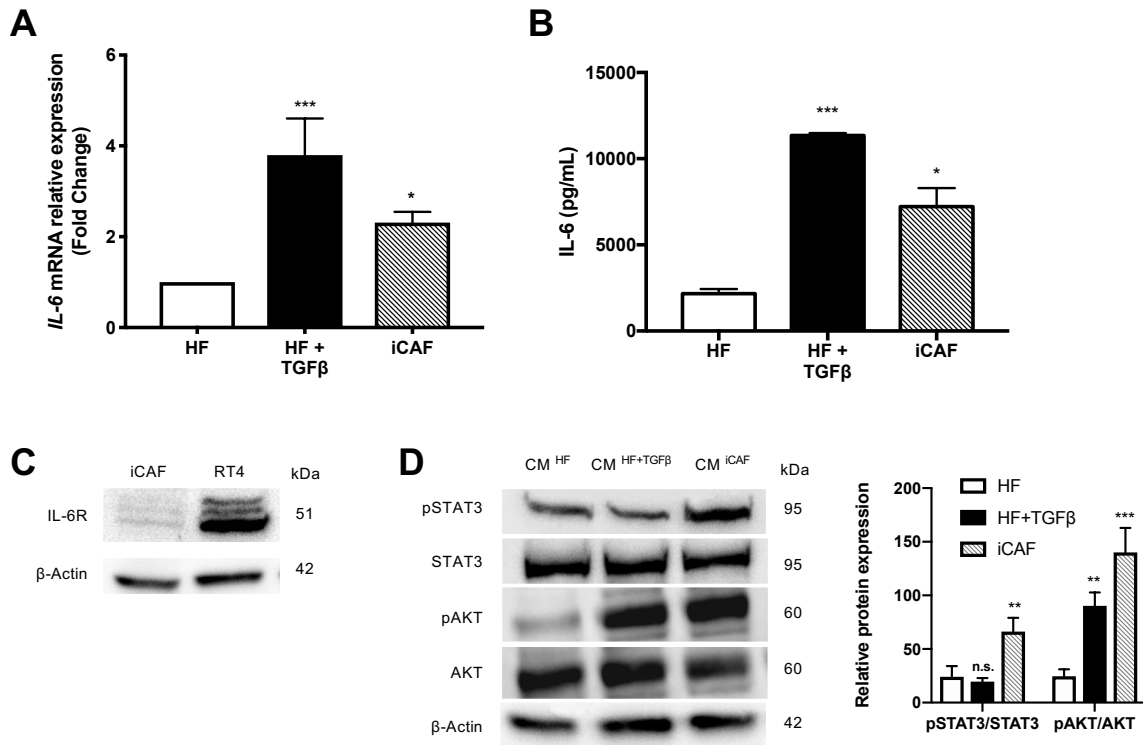


Figure 4.3 | iCAFs express IL-6 and induce the activation of the STAT3 signaling pathway in RT4 bladder cancer cells.

A. Interleukin-6 (IL-6) mRNA expression levels in HFs, HFs+TGFβ and iCAFs cells were determined by qPCR. **B.** The expression of the IL-6 protein was measured in supernatants from HFs, HFs+TGFβ and iCAFs cells using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **C.** The presence of the IL-6 receptor (IL-6R) in iCAFs and RT4 cells was detected by Western blotting. **D.** The activation of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and AKT signaling pathway in RT4 cells cultured in conditioned medium (CM) was evaluated by Western blotting. The graphs show mean \pm SD. The difference between groups was analyzed by one-way ANOVA followed by post hoc analysis using Dunnett's multiple comparison tests. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P = 0.001$, n.s. = non-significant, $n = 3-5$.

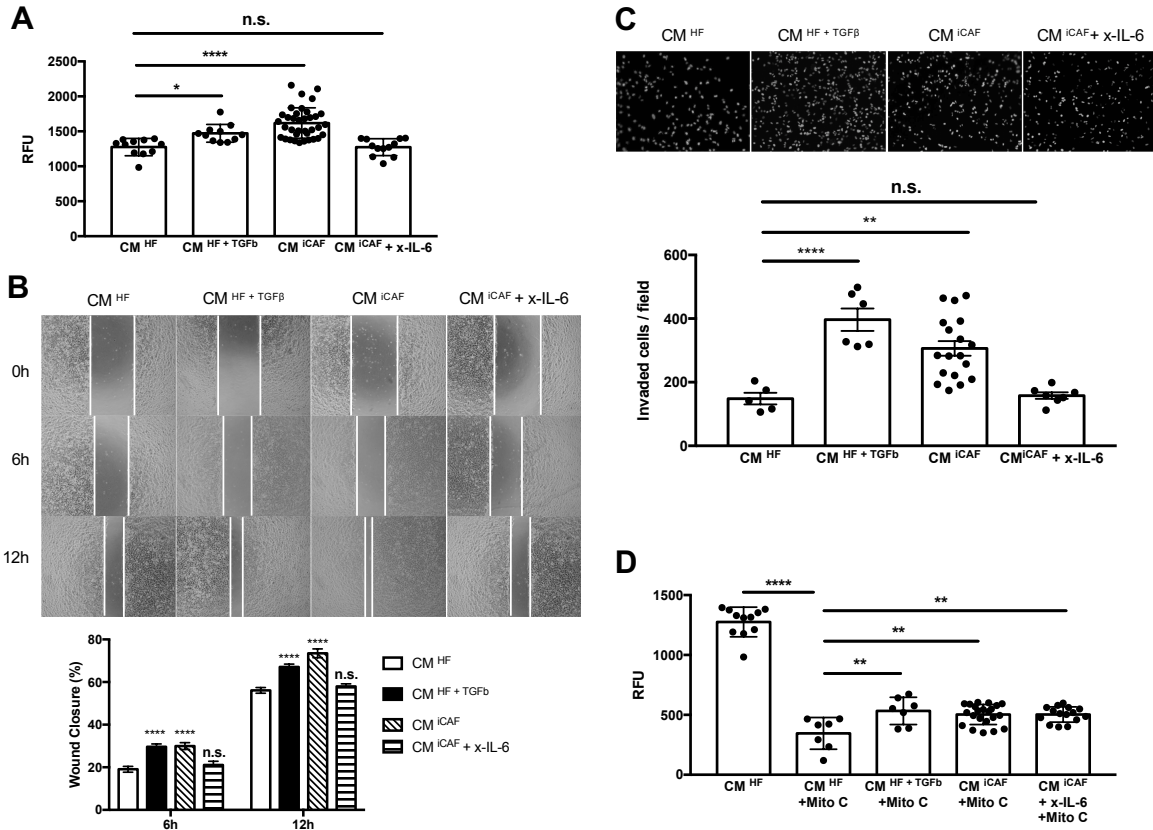


Figure 4.4 | CAFs-derived IL-6 enhances survival and promotes migration and invasion in RT4 bladder cancer cells.

RT4 cells were cultured in the CM from HFs, HFs+TGFβ or iCAFs with or without the anti-IL-6 antibody (1 μg/mL; x-IL-6). **A.** The proliferation of the RT4 cells was evaluated using the CyQUANT Kit. **B.** The migration of RT4 cells was determined by using Ibidi-silicone insert. Insert margins were marked by white vertical lines on optical micrographs. After 6h and 12h, the percentage of wound closure was evaluated by measuring migration distances (spaces between the white vertical lines). **C.** The invasion of RT4 cells was measured by transwell assays. Cells that had migrated through the membrane were fixed and nuclei were stained with DAPI. Representative photographs of migratory cells on the membrane are shown. The relative cell migration was determined by the number of migrated cells in 10 randomly selected fields. **D.** The sensitivity of RT4 cells to mitomycin C (0.5 μg/mL; Mito C) was evaluated using The CyQUANT Kit. RFU means relative fluorescence unit. All values are averages of three independent replicates. The graphs show mean +/- SD. The difference between groups was analyzed by one-way ANOVA followed

by post hoc analysis using Dunnett's multiple comparison tests. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001, n.s.= non-significant, n=5-25.

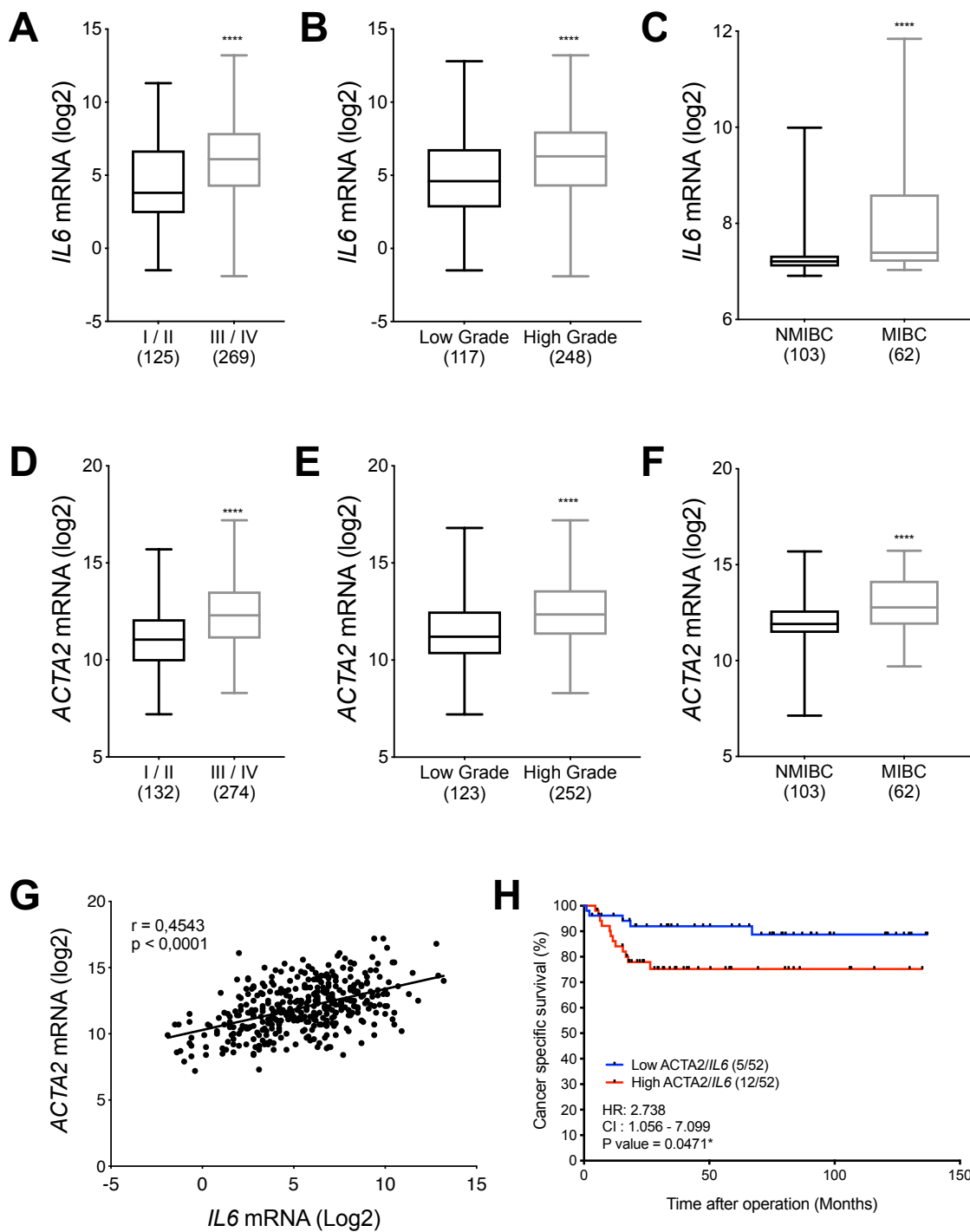
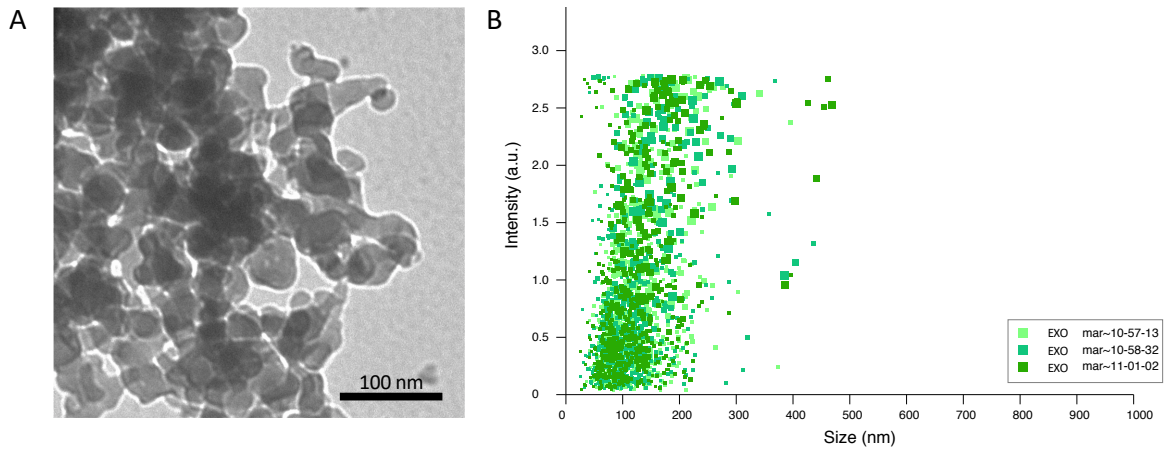


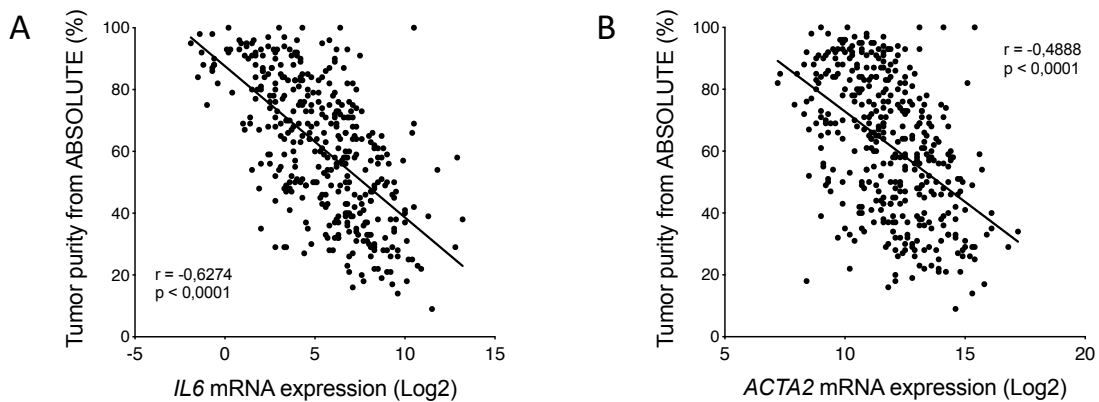
Figure 4.5 | *IL6* mRNA expression is up-regulated in aggressive bladder cancer patient tumor specimens, correlates with CAF marker *ACTA2* expression, and is associated

with poor prognosis. Boxplots of *IL6* (A-C) and *ATCA2* (D-F) mRNA expression with respect to tumor stage, grade or invasiveness for TCGA (A-B, D-E, G) and GSE13507 (C, F, H) bladder cancer data. Number of tissues in each group is shown in brackets. The difference between groups was analyzed by Mann-Whitney test. ****P<0.0001. **G.** Spearman's correlation between *ACTA2* and *IL6* gene expression (r=0.4543; ****P<0.0001). **H.** Kaplan-Meier cancer specific survival curves according to lower versus higher half of *ACTA2/IL6* mRNA co-expression level in bladder cancer patients (HR=2.738; *P=0.0471). Non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC); muscle invasive bladder cancer (MIBC).

Additional files



Additional file 1: Exosomes characterization. **A.** TEM micrographs showing morphology of exosomes immunoprecipitated with anti-CD9 mAb from bladder cancer cells. Exosomes were stained with 2% uracyl acetate after being placed on carbon-coated TEM grid. **B.** NanoSight analysis show three repeated measures of exosomes isolate according to their size.



Additional file 2. Correlation of tumor purity scores obtained by using the ABSOLUTE algorithm with mean *IL6* (A) and *ACTA2* (B) expression.

Chapitre 5 - Les CAF altèrent la composition de la matrice extracellulaire et induisent l'EMT des cellules urothéliales saines dans un modèle vésical 3D

Auteurs :

Cassandra R Goulet, Geneviève Bernard, Stéphane Chabaud, Frédéric Pouliot & Stéphane Bolduc.

Contributions des auteurs :

J'ai participé à la conception des expériences, à leur réalisation, à la conception des méthodes d'analyse, à l'analyse des résultats, à la conception et à la préparation des tableaux et des figures. J'ai rédigé l'ensemble de la première version du manuscrit et participé au peaufinage de la version finale. Geneviève Bernard a réalisé certaines expériences. Stéphane Chabaud a participé à l'écriture du manuscrit. Les Prs Frédéric Pouliot et Stéphane Bolduc ont supervisé les travaux.

Article soumis dans : *Carcinogenesis* 15 août 2018

Résumé

Les fibroblastes associés au cancer (CAF) sont l'un des types cellulaires le plus abondant dans pratiquement toutes les tumeurs solides. Les CAF favorisent la progression maligne en fournissant aux cellules cancéreuses des capacités prolifératives, migratrices, de survie et invasives. Un élément caractéristique du cancer de la vessie est sa récurrence fréquente, cependant on connaît peu la façon dont les CAF modulent le microenvironnement, et particulièrement la matrice extracellulaire (MEC), pour optimiser les conditions de la récurrence tumorale. Dans cette étude, nous avons d'abord caractérisé la composition de la MEC dérivée des CAF et nous avons trouvé une matrice fibreuse et réactive, enrichie de MMP, de dépôts de fibronectine-EDA et de ténascine C, ainsi qu'une présence accrue de LOX-1. L'effet des CAF sur la croissance des cellules urothéliales saines a été évalué. Les cellules urothéliales saines ont été cultivées sur de la MEC dérivée des CAF dans une co-culture en 3D. En utilisant ce modèle 3D, nous avons démontré que la matrice dérivée des CAF favorise la prolifération des cellules urothéliales saines et induit la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) dans ces cellules. En effet, la croissance des cellules urothéliales sur un modèle vésical 3D composé de CAF a montré une diminution de l'expression du marqueur épithélial E-cadhérine et une augmentation de l'expression du marqueur mésenchymateux N-cadhérine. Prises ensemble, ces données démontrent que les cellules urothéliales et les CAF interagissent via un réseau complexe de composants de la MEC entraînant une modulation de la croissance et de la différenciation cellulaire, ce qui facilite la formation de tumeurs dans un microenvironnement stromal permissif et favorise la progression tumorale. Comprendre le rôle de la MEC dérivée des CAF dans l'induction de l'EMT chez les cellules urothéliales pourrait fournir une nouvelle piste pour le traitement du cancer de la vessie.

Cancer-associated fibroblasts alter extracellular matrix composition and promote EMT of normal urothelial cells in a 3D vesical model

Cassandra Ringuette Goulet^{1,2,3}, Geneviève Bernard^{1,2}, Stéphane Chabaud^{1,2}, Frédéric Pouliot^{2,3} & Stéphane Bolduc^{1,2}.

¹ Centre de recherche en organogénèse expérimentale/LOEX, Regenerative Medicine Division, CHU de Québec Research Center, Quebec, QC, Canada

² Department of Surgery, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, QC, Canada

³ Oncology Division, CHU de Québec Research Center, Quebec, QC, Canada

Running title: Cancer-associated fibroblasts promote EMT in urothelial cells

Keywords: Bladder cancer, cancer-associated fibroblasts, ECM

*** Corresponding author:**

Stéphane Bolduc

Centre de Recherche en Organogénèse Expérimentale / LOEX

CHU de Québec Research Center – Hôpital de l'Enfant-Jésus

1401, 18th Street

Quebec city, Quebec, Canada, G1J 1Z4

stephane.bolduc@fmed.ulaval.ca

Fax: 1-418-990-8248

Conflict of interest statement: The authors declare no potential conflicts of interest.

Word count: 4,109

Number of figures: 4

Abstract

Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are one of the most abundant stromal cell types in solid tumors. CAFs favor malignant progression by providing cancer cells with proliferative, migratory, survival and invasive capacities. A distinctive element in the bladder cancer progression is its propensity to relapse, but little is known about how CAFs modulate the microenvironment to optimize the conditions for tumor relapsing. Here, we induce the activation of healthy primary fibroblasts (HFs) into CAF-like cells (iCAFs) to characterize the iCAF-derived extracellular matrix (ECM) composition and we found a fibrotic and reactive stroma enriched with MMPs, fibronectin-EDA and tenascin C deposits, and an increased expression of LOX-1. The effect of iCAFs on the growth of urothelial cells representative of the pre-neoplastic bladder disease was assessed. iCAFs were grown with non-tumorigenic urothelial cells in 3D co-cultures. Using this 3D vesical model, we demonstrated that iCAFs-derived ECM promoted the proliferation of healthy urothelial cells and induced EMT state in these cells. Indeed, the growth of urothelial cells on the 3D vesical model composed of iCAFs showed a decreased expression of the epithelial marker E-cadherin, while the expression of the mesenchymal marker N-cadherin was increased. Taken together, these data demonstrate that urothelial cells and iCAFs interact via a complex network of ECM components resulting in modulation of cell growth and differentiation, which facilitates the tumor formation in a permissive and tumor-promoting stromal microenvironment. Understanding the role of iCAFs-derived ECM in inducing the urothelial cell EMT may provide a new perspective on the treatment of bladder cancer.

Introduction

The cancer disease initiation and progression have traditionally been attributed to the accumulation of genetic lesions in key oncogenic driver genes within the cell. In recent years, the tumor microenvironment (TME) is increasingly recognized for its significant contribution to the tumor progression, as well as the initiation of the transformation process (1,2). Tumor cells induce the recruitment and activation of non-malignant cells such as fibroblasts, endothelial cells, and immune cells in the TME through different mechanisms, which collectively support the tumor progression (2-4). The TME also includes abnormal acellular components, comprising a variety of soluble factors and the extracellular matrix (ECM) (5,6).

The tumor reactive stroma is characterized by an accumulation of type I collagen that is extensively cross-linked by the lysyl oxidase (LOX) or tissue transglutaminase (tTG) (7,8). Collagen crosslinking confers proteolytic resistance and increases stiffness to the stroma, which promotes tumor cell proliferation, migration and invasion (9,10). Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family that comprises more than 25 members, which act as important regulators of the tumor stroma by remodelling the ECM. The expression of oncofetal ECM fibrils such as fibronectin-EDA and tenascin C has also been observed in tumors and found to be associated with poor patient prognosis (11).

The epithelial–mesenchymal transition (EMT) is defined as a multistep biological process during which changes in epithelial plasticity are evidenced by the loss of epithelial markers, such as the adherence junction component E-cadherin, and by an increase of the expression of mesenchymal proteins, such as N-cadherin. Adherens junctions are anchored to the actin cytoskeleton via the β -catenin, which can bind to the cytoplasmic domain of E-cadherin (CDH1). When losing of cell adhesion, as it occurs in EMT, the E-cadherin is endocytosed and the β -catenin is released in the cytosol. This free β -catenin is phosphorylated by GSK3 β , which leads to its ubiquitination and proteosomal destruction or is translocated to the nucleus to promote the transcription of EMT-related genes (12,13). These epithelial alterations are followed by an enzymatic degradation of the basement membrane, a layer of ECM components that separates the epithelium from the underlying stromal compartment, and the migration of epithelial cells into the surrounding tissue. Laminin-332, a major component of the basement membrane, is expressed mainly by epithelial cells and its expression was found to be increased in several types of tumors (14).

The $\alpha6\beta4$ integrin, expressed at the cellular membrane of urothelial cells, nucleates the formation of hemidesmosomes that link the cytokeratin cytoskeleton to the laminin-332 found in the basement membrane. During the EMT process, the $\alpha6\beta4$ integrin is phosphorylated and released from hemidesmosomes to promote cell motility (15). Increased expression of the $\alpha6\beta4$ integrin is a poor prognostic factor in various solid tumors and is associated with an invasive and metastatic phenotype (16-18).

Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are one of the most abundant cell types in the TME (19). In bladder cancer, CAFs have been shown to increase tumor growth, cells migration and proliferation via lactate, CXCL1, TGF β and Kindlin-2 secretion (20-23). We have previously shown that primary fibroblasts are activated into CAFs-like cells by the TGF β contained in cancer cell-derived exosomes (24). CAFs are a major source of cytokines, growth factors and ECM that have been shown to be important stimuli of EMT. CAFs play also an essential role in EMT and subsequent tumor invasion by upregulating the production of ECM components and by excessive ECM remodelling via ECM-modifying enzymes (25). MMPs are secreted by CAFs in the TME, and mediate the breakdown of the basement membrane barrier (26). Some studies highlight the role played by stromal fibroblasts in establishing a niche for the tumor initiation. Their results showed that CAFs stimulated the preneoplastic cell growth *in vitro* and in xenograft models and induced epithelial cell alterations leading to the malignant transformation of a non-tumorigenic epithelial cells (27-29). Conversely, normal fibroblasts have been reported to convert malignant prostate and skin epithelia to morphologically benign lesions (30, 31).

A distinctive element in the bladder cancer progression is its propensity to relapse and little is known about whether CAFs modulate the ECM to optimize conditions for the tumor relapsing. Whereas the importance of CAFs in tumor progression is well established, the mechanisms by which the CAF-derived ECM affects non-tumorigenic epithelial cells and contributes to tumorigenesis are more poorly defined. Therefore, the aim of this study is to describe interactions of CAF-derived ECM and normal urothelial cells.

Materials and Methods

Ethics statement

Bladder tissues were harvested during non-oncological surgeries were obtained at the CHU de Québec Research Center in accordance with recognized ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and with our institutional review board. All patients provided their formal, informed, written consent, each agreeing to supply a biopsy for this study.

Cell isolation and culture

Healthy vesical fibroblasts (HFs) were isolated from human bladder biopsies as previously described (24, 32). Briefly, the stroma was separated from the urothelium after an incubation overnight at 4°C in HEPES buffer with 500µg/mL thermolysin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO). The fibroblasts were enzymatically dissociated from the ECM by treating the stroma with 0.125U/mL collagenase H (Roche, Mississauga, Canada) for 3h at 37°C under gentle agitation. Then, fibroblasts were cultured in Dulbecco-Vogt modified Eagle's media (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Burlington, Canada) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 25 µg/ml gentamicin; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO). T24 and SW1710 bladder cancer cell lines were obtained from the ATCC (HTB-4™) and DSMZ (ACC 426) respectively and cultured in DMEM containing 10% FBS and antibiotics. All cells were cultured fewer than 5 passages after receiving them for all the experiments and routinely tested for mycoplasma contamination. The cells were authenticated under short tandem repeat analysis by the cell bank.

Exosomes production and isolation

Exosomes were isolated as previously described (24). Briefly, the serum was treated with the FBS Exosome Depletion Kit (Norgen Biotek Corp., ON, Canada) according to manufacturer's instructions, in order to remove any residual bovine exosomes from the FBS. Muscle-invasive bladder cancer cells (T24 and SW1710) were cultured in DMEM containing 10% exosome-depleted FBS for 48h. Then, the conditioned medium was centrifuged to 2000 g for 30 min to remove cells and debris, and the supernatant was mixed with 0.5 volumes of the Total Exosomes Isolation Reagent (Invitrogen, Burlington, Canada). Samples were vortexed and incubated at 4°C overnight. Then, they were centrifuged at 10,000 g for 60 min at 4°C. Exosomes, contained in the pellet, were

resuspended in phosphate buffered saline (PBS). The protein concentration was measured with the BCA Kit (Pierce™, ThermoFisher, Waltham, MA).

CAF induction

HFs were induced in CAF-like cells (iCAFs) as previously described (24). Briefly, HFs were co-cultured with freshly isolated bladder cancer cells-exosomes (1 mg/mL) for 48 h in DMEM 10%FBS. rhTGFβ1 (4 ng/mL; Proteintech, Rosemont, IL) was used as a positive control for activated fibroblasts. iCAFs were confirmed by western blots using specific markers. Supernatants were collected and stored at -80 °C until performing MMPs array and MMPs activity assay. Proteins were collected in RIPA buffer containing protease inhibitors cOmplete (Roche, Mississauga, Canada), quantified with a BCA kit, and stored at -80 °C until performing Western blotting. The mRNA was extracted using the TRIZol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and stored at -80 °C until performing RT-qPCR assay.

Production of the 3D vesical model

To investigate the role of iCAFs into a full-thickness vesical tissue, we designed by tissue engineering an in vitro 3D human vesical model in which the stromal compartment contains iCAFs. The self-assembly technique was used as previously described for the production of a 3D vesical model (32). Briefly, the HFs or iCAFs were seeded at a concentration of 3×10^4 cells/cm² in 6-well plates and the culture medium was supplemented with 50 µg/mL ascorbate for 21 days until their neosynthesized ECM proteins were sufficiently assembled to form a sheet. Three stromal sheets were superimposed and cultured for four more days to allow their fusion. For some experiments, urothelial cells were seeded on top of the 3D stroma at a concentration of 3×10^4 cells/cm² and cultured in DH medium composed of 1:1 DMEM: Ham's F12 medium (Life Technologies, Burlington, ON, Canada)). The vesical model was then elevated to the air/liquid interface for 21 days until its differentiation into a mature urothelium. For some experiments, the 3D vesical model was decellularized by washing it three times in sterile water during 48h for each wash. Then, urothelial cells were seeded on top of the decellularized model at a concentration of 3×10^4 cells/cm² and cultivated in DH medium. The decellularization of the model allows to get rid of the fibroblasts in order to preserve only their secreted ECM and to recover only proteins from urothelial cells for subsequent

analyses. The 'HFs' 3D model was generated with three HF sheets, the 'iCAFs' 3D model was produced with three iCAF sheets and the 'Mixed' 3D model was created using one iCAF sheet sandwiched between two HF sheets. Proteins were collected in RIPA buffer containing protease inhibitors cOMplete (Roche, Mississauga, Canada), quantified with a BCA kit, and stored at -80 °C until performing Western blotting.

Immunofluorescence

3D vesical models were snap-frozen in OCT and cut into 7 µm sections using a Leica cryostat. Methanol-fixed cross-sections were labelled with tenascin C (1/1,000; Millipore, Billerica, MA), fibronectin-EDA (1/1,000; Abcam, San Francisco, CA), Ki67 (1/500; R&D Systems, Minneapolis, MN), AE1/AE3 (1/1,000; Millipore, Billerica, MA), vimentin (1/1,000; Life Technologies, Carlsbad, CA) or laminin-322 (1/400, Millipore, Billerica, MA) primary antibodies diluted in 1% w/v bovine serum albumin (BSA; BioBasic) in phosphate buffered saline (PBS) for 60 min at room temperature, rinsed in PBS and then incubated for 45 min with Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibodies (1/1,000; Invitrogen, Carlsbad, CA). Negative controls were performed by incubating cross-sections with an IgG1 isotypic antibody (Dako, Burlington, ON, Canada). Nuclei were stained with Hoechst 33258 (5 mg/mL; Sigma-Aldrich, Saint- Louis, MO) and samples were observed using a Zeiss Axio Imager M2 microscope equipped with an AxioCam HR Rev3 camera (Oberkochen, Allemagne).

Human MMP protein array

HFs, HFs + TGFβ and iCAFs were seeded at 2.5×10^4 cells/well in a 24-well plate and incubated for 24h at 37°C and 8% CO₂. Media were collected and stored at -80°C prior to their use on MMP Antibody Array Membranes (Abcam, San Francisco, CA). Briefly, conditioned media were incubated overnight on array membranes at 4°C. The following day, membranes were washed and incubated 2h at room temperature in 1 mL of biotin-conjugated antibody. Membranes were then washed and incubated in 2 mL of HRP-conjugated streptavidin overnight at 4°C, then washed and submitted to chemiluminescence detection. Protein dots were imaged by using the Fusion Fx7 imager (Vilber Lourmat, Manne-la-Valée, France) and analyzed with the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

MMPs activity assay

The MMPs activity was determined using the MMP Activity Assay Kit (Abcam, San Francisco, CA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, HFs, HFs + TGF β or iCAFs cells were seeded at 5×10^4 cells/well into 12-well plates and allowed to adhere overnight. The conditioned medium was mixed with 50 μ l of 2 mM APMA working solution and incubated for 15 min at RT followed by the addition of 100 μ l of the fluorogenic peptide substrate solution. The fluorescence signal was read after 60 min with the Varioskan Flash microplate reader (Thermo Electron Corporation).

Western blotting

Ten μ g of proteins were loaded into 5-12% polyacrylamide gels, resolved by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked for 30 min in PBS containing 5% non-fat milk and 0.05% Tween 20 in PBS. Membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4°C followed by 45 min at RT with HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). The protein expression was detected using the Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Bands were imaged by using the Fusion Fx7 imager (Vilber Lourmat, France) and analyzed with the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). The following antibodies were used: Collagen I (1/1,000; Millipore, Burlington, MA), fibronectin-EDA (1/1,000; Abcam, San Francisco, CA), tenascin C (1/5,000; Novus Biologicals, Littleton, CO), E-cadherin (1/500; R&D Systems, Minneapolis, MN), N-cadherin (1/1,000; Millipore, Burlington, MA), α 6 β 4 integrin (1/2,000; R&D Systems, Minneapolis, MN), phospho- β -Catenin Ser33/37/Thr41 (1/500; R&D Systems, Minneapolis, MN), total β -Catenin (1/1,000; Millipore, Burlington, MA) and tubulin (1/1,000; Novus Biologicals, Littleton, CO).

RT-qPCR

The RNA was extracted using the EZ-10 Spin Column Total RNA Miniprep Super Kit (BioBasic, Markham, ON, Canada). The RNA quality was assessed on a bioanalyzer using the Agilent RNA 600 Nano kit. One μ g of RNA was used to reverse transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster

City, CA). qPCR was performed using the DyNAmo HS SYBR Green qPCR kit (ThermoFisher, Waltham, MA), following the manufacturer's instructions. The gene expression was normalized with the β 2-microglobulin transcript.

Gelatinase activity and immunocytochemistry

HF_s, HF_s + TGF β and iCAF_s were seeded at a density of 5×10^3 cells/well on 8-well Millicell EZ slides (Millipore, Burlington, MA), and were subjected to overnight incubation with 100 mg/mL of highly quenched fluorescein-labeled gelatin (DQTM Gelatin D-12054, Molecular Probes^H, Eugene, Oregon). The cells were then washed with PBS and fixed with 4% v/v paraformaldehyde/PBS for 30 minutes. For immunocytochemistry, the permeabilization was performed using 0.25% v/v Triton X-100/PBS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) for 30 min followed by blocking using PBS 5% BSA for 1 h. Incubation with the primary antibody MMP9 (1/200; Abcam, San Francisco, CA) was performed at room temperature for 1h in PBS 5% BSA. The cells were rinsed in PBS before incubation with the anti-rabbit Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (1/1,000; Invitrogen, Carlsbad, CA) in PBS for 1 h. Cells were then mounted and counterstained using the VECTASHIELD mounting medium with 49,6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) (Vector Laboratories, Peterborough, UK).

ELISA

The LOX-1 protein level was evaluated in supernatants by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) following the manufacturer's protocol.

Collagen gel contraction assay

Collagen gels were prepared with the PureCol[®] EZ Gel solution (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) in DMEM 20% FBS supplemented with 100 IU/ml penicillin and 25 μ g/ml gentamicin, as well as 2.5×10^3 iCAF cells. The mixture (500 μ L) was cast into a 24-well culture plate and allowed to polymerize at 37°C for 90 min. After polymerization, the gels were gently released from the plate with a blade. After 24h, the surface area of the gels was measured with the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). The values were normalized to control gels without cells and the % of initial area was calculated.

Cell proliferation assay

To assess the proliferation of urothelial cells on the CAF-derived ECM, punch biopsies of 4 mm were removed from the decellularized 3D equivalents and placed separately in single wells of a 96-well opaque culture plate (BD Falcon). The CellTiter-Glo® 3D reagent was added to each well and the luminescence signal was read after 30 min with the Orion II microplate reader (Berthold Detection Systems).

Statistical analysis

GraphPad Prism was used for the graphical representation of data and statistical analyses. The results are expressed as mean \pm standard error. Differences between the groups were considered significant at $P < 0.05$. Data were interpreted using one- or two-way analysis of variance (ANOVA).

Results

ECM composition is altered in iCAFs stroma

To define the composition of the iCAF-derived ECM, we analyzed the mRNA and protein expression of type I collagen, fibronectin-EDA and tenascin C in iCAF lysates. Results showed that compared to HFs, fibronectin-EDA and tenascin C, but not type I collagen expression was increased in iCAFs (Figure 1A-B). These results were confirmed in 3D vesical models (Figure 1C). Collagen is the predominant component of the ECM, and determines the physico-mechanical nature of the ECM, such as its stiffness and its rigidity, which further affects the tumor malignancy (33-35). Although the secretion of collagen was not affected in iCAFs, its crosslinking level was increased in many solid tumors (8, 26, 36, 37). Thus, we measured by ELISA the expression of LOX-1, an ECM-modifying enzyme that catalyze the collagen fiber crosslinking, and found that it was increased in iCAF supernatants (Figure 1D). To further evaluate the ability of iCAFs for collagen contraction, HFs, HFs + TGF β and iCAFs cells were embedded in type I bovine collagen. After 24h, the contraction of the collagen gels was quantitatively determined by measuring the gel area. HFs + TGF β and iCAFs induced a strong collagen contraction compared to HF cells (Figure 1E).

Characterization of MMP expression and activity in iCAFs

As MMPs are the major ECM remodelling enzymes, we characterized their expression and their activity in iCAF cells. The gene expression of MMPs was studied in iCAFs using qPCR and revealed that the MMP-3 and MMP-9 expression was significantly higher in iCAFs compared to HF cells (Figure 2A). To investigate the secreted levels of several MMPs in iCAFs, we used an MMP array with iCAFs supernatants. Concentrations of MMP-2, MMP-3 and MMP-9 were increased in iCAFs supernatant compared to HFs (Figure 2B). As MMPs are synthesized as inactive zymogens, they require a proteolytic removal of the pro-peptide domain for their activation. To determine the activation levels of MMPs in iCAFs supernatants, pro-MMPs were treated with APMA, a widely used MMPs activator, revealing enzymatically active MMPs. After APMA treatment, an increase in MMP-2, MMP-3 and MMP-9 activity was observed in the medium from iCAFs compared to control HFs (Figure 2C). In contrast, MMPs activity was significantly decreased in HFs

+ TGF β cells. We also examined the gelatinase activity on cells grown in culture. Cells were overlaid on fluorescein-conjugated gelatin (DQ gelatin), revealing an increase in fluorescence in the HFs + TGF β and iCAFs cells compared with to control cells, which is a measure of the proteolytic activity of the gelatinase (Figure 2D).

The presence of iCAFs in the 3D vesical models induces the proliferation of urothelial cells

To investigate whether the proliferation ability of urothelial cells was affected by the presence of iCAFs, we used the proliferation marker Ki67 to stain cross sections of 3D vesical models. As shown in Figure 3A, iCAFs promoted the proliferation of urothelial cells. In order to measure only the proliferation of urothelial cells (without that of the fibroblasts), urothelial cells were seeded onto decellularized 3D vesical models. After 21 days, the proliferation of urothelial cells was evaluated with the CellTiter-Glo® 3D Kit, and our analyses revealed that the iCAF-derived ECM increases proliferation (Figure 3B).

iCAF-derived ECM induces an EMT state in urothelial cells in a 3D vesical model

The transition between epithelial and mesenchymal cell phenotypes is not only characterized by the expression of EMT markers, but also the biological-functional and behavioral phenotypes. Dissemination of cells during EMT would be expected to require enhanced migration ability. To determine whether the iCAF-derived ECM has the capacity to modulate the motility of urothelial cells, we observed their behavior in our 3D vesical models by immunofluorescence. As shown in Figure 4A, the ‘HFs’ 3D vesical model presented intact basement membrane where no invasive activity have been discerned. By contrast, urothelial cells from ‘iCAFs’ and ‘Mixed’ 3D vesical models acquired migration and invasion abilities since we observed that several normal urothelial cells have crossed the basement membrane to invade the stromal compartment (Figure 4A). Laminin-332 is a major component of the basement membrane, a layer that separates the epithelium from the stroma. To define urothelial cell-basement membrane interactions in a 3D culture setting, the localization of laminin-332 proteins was analyzed in 3D vesical models. Immunofluorescent staining in the ‘HFs’ 3D vesical model clearly identified the basement membrane intercalated between the urothelium and the stromal compartment, as revealed by a strong and continuous presence of laminin-332 staining at the urothelial-stromal

junction (Figure 4B). Meanwhile, 'iCAFs' and 'Mixed' 3D vesical models presented a thinner laminin-332 staining than the 'HFs' 3D vesical model. Interestingly, infiltrated urothelial cells expressed high levels of laminin-332. To determine the effects of the iCAF-derived ECM in promoting EMT in urothelial cells, we analyzed the expression of EMT-associated proteins. In order to measure only the expression of urothelial cell EMT-associated proteins (without that of the fibroblasts), urothelial cells were seeded onto decellularized 3D vesical models. The downregulation of E-cadherin, an epithelial marker, combined to an upregulation of the N-cadherin, a mesenchymal marker, are early indications of EMT (34). Western blot analysis of E- and N-cadherin expression in urothelial cells after 21 days onto decellularized 3D vesical models showed that E-cadherin protein levels were decreased, while N-cadherin protein levels were increased in the 'iCAFs' 3D vesical model compared to the 'HFs' model (Figure 4C). Moreover, as cell adhesion molecules play important roles in EMT, we analyzed their expression. Western blots revealed an increased expression of $\alpha 6\beta 4$ integrin and total β -Catenin in 'iCAFs' and 'Mixed' 3D vesical models compared to the control. The phospho- β -Catenin expression was upregulated in the 'iCAFs' 3D vesical model but not in 'HFs' and 'Mixed' models.

Discussion

Bladder cancer is a complex disease in which stromal and epithelial cells are engaged in active communication. Tumor stromal cells and their extracellular matrix which they deposit, play a key role in supporting tumorigenesis (5, 39, 40). CAFs are considered as crucial players in the TME, which could enhance the tumor cell progression (41). Different *in vitro* models have been used to demonstrate paracrine mechanisms by which the stromal microenvironment acts to promote tumorigenesis (42, 43). However, whether the CAF-derived ECM affects non-cancerous epithelial cells and contributes to tumorigenesis are more poorly defined. Understanding the role of CAFs-derived ECM on EMT in bladder cancer can provide insight into the mechanisms of bladder cancer initiation and recurrence, which are currently lacking.

Here, we first characterized the iCAF-derived ECM. Fibrillar collagen is the principal structural component of the ECM surrounding solid tumors, and it has been demonstrated that the collagen cross-linking by LOX enzymes promotes stromal activation and desmoplasia, facilitating the tumor cell invasion (36, 44). Moreover, the tenascin C can affect the invasiveness and metastatic potential of carcinoma tumors as its expression has been correlated with lymph node metastasis in breast, colon, liver and oral squamous cell carcinomas (11, 39, 45, 46). Although increased type I collagen expression was not detected, we found a highly reactive stroma with the presence of oncofetal EDA-fibronectin and tenascin C proteins, combined to an increased ECM-related enzyme expression such as LOX-1 and MMPs in iCAFs. Although there is an increase in the gene expression of MMPs in HF + TGF β , it does not correlate with the protein expression, where MMP2 is increased, MMP3 is decreased and MMP9 is unchanged, nor with the enzymatic activity of these MMPs, which is decreased. MMPs are synthesized and secreted as inactive proenzymes. The activation is done in the extracellular media by proteolysis which removes the pro-peptide at the N-terminus of the molecule and releases the active site. The activating peptidases are numerous: plasmin, kalikrein, elastase, or the MMPs themselves. Therefore, the MMPs activity isn't proportional to MMPs expression. Moreover, as TGF β is a common regulator for MMP expression and activity, it could explain these divergent results (47, 48). Furthermore, the contraction of iCAF-derived stroma was also significantly enhanced. Collectively, these observations demonstrated that the presence of iCAFs in the stroma impacts on the ECM composition and biomechanical properties.

Only a few reports have addressed the effects of CAFs on the behavior of non-cancerous epithelial cells rather than on the behavior of carcinoma cells and none have studied it on urothelial cells (27, 28). In addition, to the best of our knowledge, no study has investigated the impact of the CAF-derived stroma on healthy epithelial cells. To identify potential interplay between urothelial cells and CAFs, novel models of the TME are needed. However, reconstitution of the microenvironment is a major challenge for *in vitro* models. Recently, sophisticated 3D culture systems have been designed to better recapitulate microenvironmental aspects of *in vivo* tumor growth (32, 49, 50). Therefore, we recreated a controlled 3D microenvironment by using tissue engineering to demonstrate the impact of the iCAF-derived ECM on urothelial cell behavior. To our knowledge, this is the first time that a 3D model has been used to study urothelium/iCAF-derived ECM interactions. This 3D vesical model recapitulates the scenario of a stroma activated and remodelled by tumor cells. The ‘iCAFs’ 3D vesical model, composed of the iCAF-derived ECM, promotes the proliferation of urothelial cells compared to the ‘HFs’ 3D model. We showed that the presence of the iCAFs-derived ECM in 3D vesical tissues resulted in an increase in the capacity of urothelial cells to invade the stromal compartment. In addition, when cultured onto iCAF-derived 3D stroma, urothelial cells acquired an EMT state, represented by a loss of epithelial markers in favor of mesenchymal markers. Such observations emphasize the CAF-derived ECM as a key determinant of malignancy. Further studies are warranted to determine the mechanism by which CAFs are regulating EMT in urothelial cells.

Bladder cancer is characterized by the highest recurrence rate, as about 70% of patients with bladder cancer will have a relapse (51, 52). Our data provide a first glimpse into the role of CAFs in bladder cancer progression, as well as recurrence. In this study, we demonstrated that changes in the stromal ECM composition after the activation of HFs into iCAFs resulted in an EMT state of urothelial cells, in a minor but sufficient level to represent some of the tumor cell properties. These observations are consistent with the idea that the stroma remodelling by CAFs induces pro-tumorigenic signals that supported residual disease. Deep understanding of potential molecular mechanisms will be helpful for the development of effective cancer therapies that can target both the epithelial and stromal compartments.

Acknowledgments

We thank Solange Landreville for her careful reading of the manuscript and Bastien Paré and Isabelle Lorthois for their critical comments and experimental input. This work was supported by a Bladder Cancer Canada Grant (FP and CRG) and a Ferring Grant (SB). CRG is the recipient of a Doctoral Research Award from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS). FP is a Research Scholar of the FRQS. SB is the recipient of Canadian Urological Association Scholarship Funds and Canadian Institutes of Health Research Grant #258229.

Author contributions

CRG designed and performed the experiments and analyzed the data. GB performed the experiments. SB made the recruitment and clinical assessment of patients. CRG wrote the manuscript and SC revised it. SB and FP supervised the work and revised the manuscript.

References

1. Catalano, V. *et al.* (2013) Tumor and its microenvironment: A synergistic interplay. *Seminars in Cancer Biology*, **23**, 522–532.
2. Quail, D.F. *et al.* (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, **19**, 1423–1437.
3. Giannoni, E. *et al.* (2010) Reciprocal Activation of Prostate Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts Stimulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stemness. *Cancer Research*, **70**, 6945–6956.
4. Comito, G. *et al.* (2013) Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. DOI: 10.1038/onc.2013.191.
5. Malik, R. *et al.* (2015) Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends in Biotechnology*, **33**, 230–236.
6. Liu, C.-C. *et al.* (2018) Collagen XVII/laminin-5 activates epithelial-to-mesenchymal transition and is associated with poor prognosis in lung cancer. *Oncotarget*, **9**, 1656–1672.
7. Erler, J.T. *et al.* (2006) Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, **440**, 1222–1226.
8. Baker, A.M. *et al.* (2012) Lysyl oxidase enzymatic function increases stiffness to drive colorectal cancer progression through FAK. DOI: 10.1038/onc.2012.202.
9. Levental, K.R. *et al.* (2009) Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell*, **139**, 891–906.
10. Kasashima, H. *et al.* (2014) Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) from stromal fibroblasts stimulates the progression of gastric cancer. *Cancer Letters*, **354**, 438–446.
11. Ni, W.-D. *et al.* (2017) Tenascin-C is a potential cancer-associated fibroblasts marker and predicts poor prognosis in prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **486**, 607–612.
12. Gopal, S.K. *et al.* (2016) Extracellular vesicles: their role in cancer biology and epithelial-mesenchymal transition. *Biochemical Journal*, **474**, 21–45.
13. Shang, S. *et al.* (2017) The regulation of β -catenin activity and function in

- cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget*, **8**, 33072–33989.
14. Kim, B.G. *et al.* (2011) Laminin-332-Rich Tumor Microenvironment for Tumor Invasion in the Interface Zone of Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*, **178**, 373–381.
 15. Rabinovitz, I. *et al.* (1999) Protein Kinase C-dependent Mobilization of the $\alpha 6 \beta 4$ Integrin from Hemidesmosomes and Its Association with Actin-rich Cell Protrusions Drive the Chemotactic Migration of Carcinoma Cells. *J Cell Biol*, **146**, 1147–1159.
 16. Mercurio, A.M. *et al.* (2001) Towards a mechanistic understanding of tumor invasion—lessons from the $\alpha 6 \beta 4$ integrin. *Seminars in Cancer Biology*, **11**, 129–141.
 17. Carpenter, B.L. *et al.* (2015) Integrin $\alpha 6 \beta 4$ Promotes Autocrine Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling to Stimulate Migration and Invasion toward Hepatocyte Growth Factor (HGF). *J. Biol. Chem*, **290**, 27228–27238.
 18. Colburn, Z.T. *et al.* (2017) $\alpha 6 \beta 4$ Integrin Regulates the Collective Migration of Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **56**, 443–452.
 19. Kalluri, R. *et al.* (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 392–401.
 20. Shi H. *et al.* (2015) Overexpression of monocarboxylate anion transporter 1 and 4 in T24-induced cancer-associated fibroblasts regulates the progression of bladder cancer cells in a 3D microfluidic device. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **14**:3058–65.
 21. Zhuang J. *et al.* (2015). TGF β 1 secreted by cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through lncRNA-ZEB2NAT. *Sci. Rep.* **5**:11924.
 22. Miyake M. *et al.* (2016) CXCL1-mediated interaction of cancer cells with tumor-associated macrophages and cancer-associated fibroblasts promotes tumor progression in human bladder cancer. *Neoplasia*. **18**:636–646.
 23. Wu J. *et al.* (2017) Effects of increased Kindlin-2 expression in bladder cancer stromal fibroblasts. *Oncotarget*. **8**:50692–50703.
 24. Ringuette-Goulet, C. *et al.* (2018) Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-Associated Fibroblasts through TGF β Signaling. *Molecular*

Cancer Research, DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0784.

25. Li, J. *et al.* (2016) Carcinoma-Associated Fibroblasts Lead the Invasion of Salivary Gland Adenoid Cystic Carcinoma Cells by Creating an Invasive Track. *PLoS ONE*, **11**, e0150247–15.
26. Jolly, L.A. *et al.* (2016) Fibroblast-Mediated Collagen Remodeling Within the Tumor Microenvironment Facilitates Progression of Thyroid Cancers Driven by BrafV600E and Pten Loss. *Cancer Research*, **76**, 1804–1813.
27. Barcellos-Hoff *et al.* (2000) Irradiated Mammary Gland Stroma Promotes the Expression of Tumorigenic Potential by Unirradiated Epithelial Cells. *Cancer Research*, **60**, 1254–1260.
28. Hayward, S.W. *et al.* (2001) Malignant Transformation in a Nontumorigenic Human Prostatic Epithelial Cell Line. *Cancer Research*, **61**, 8135–8142.
29. Bhowmick, N.A. *et al.* (2004) TGF-Beta Signaling in Fibroblasts Modulates the Oncogenic Potential of Adjacent Epithelia. *Science*, **303**, 848–851.
30. Cooper, M. *et al.* (1977) Intrauterine Transplantation of Rat Basal Cell Carcinoma as a Model for Reconversion of Malignant to Benign Growth. *Cancer Research*, **37**, 2544–2552.
31. Hayashi, N. *et al.* (1991) Mesenchyme-induced Changes in the Neoplastic Characteristics of the Dunning Prostatic Adenocarcinoma. *Cancer Research*, **51**, 4924–4930.
32. Ringuette-Goulet, C. *et al.* (2017) Tissue-engineered human 3D model of bladder cancer for invasion study and drug discovery. *Biomaterials*, **145**, 233–241.
33. Dozmorov, M.G. *et al.* (2006) Analysis of the interaction of extracellular matrix and phenotype of bladder cancer cells. *BMC Cancer*, **6**, 10–12.
34. Zustiak, S.P. *et al.* (2015) Three-dimensional matrix stiffness and adhesive ligands affect cancer cell response to toxins. *Biotechnol. Bioeng*, DOI: 10.1002/bit.25709.
35. Mulhaupt, H.A.B. *et al.* (2016) Extracellular matrix component signaling in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **97**, 28–40.
36. Cox, T.R. *et al.* (2013) LOX-Mediated Collagen Crosslinking Is Responsible for Fibrosis-Enhanced Metastasis. *Cancer Research*, **73**, 1721–1732.

37. Reynaud, C. *et al.* (2017) Lysyl Oxidase Is a Strong Determinant of Tumor Cell Colonization in Bone. *Cancer Research*, **77**, 1–12.
38. Wu, K. *et al.* (2013) Slug contributes to cadherin switch and malignant progression in muscle-invasive bladder cancer development. *URO*, **31**, 1751–1760.
39. De Wever, O. (2004) Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent proinvasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *The FASEB Journal*, DOI: 10.1096/fj.03-1110fje.
40. Attieh, Y. *et al.* (2017) Cancer-associated fibroblasts lead tumor invasion through integrin- β 3-dependent fibronectin assembly. *J Cell Biol*, **80**, jcb.201702033–12.
41. Augsten, M. (2014) Cancer-Associated Fibroblasts as Another Polarized Cell Type of the Tumor Microenvironment. *Front. Oncol*, **4**, 1–8.
42. Teng, F. *et al.* (2016) Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis. *Journal of Hematology & Oncology*, **9**, 1–15.
43. Santi, A. *et al.* (2015) Cancer associated fibroblasts transfer lipids and proteins to cancer cells through cargo vesicles supporting tumor growth. *BBA - Molecular Cell Research*, **1853**, 3211–3223.
44. Neri, S. *et al.* (2015) Cancer cell invasion driven by extracellular matrix remodeling is dependent on the properties of cancer-associated fibroblasts. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, DOI: 10.1007/s00432-015-2046-7.
45. Yang, Z. *et al.* (2017) Tenascin C is a prognostic determinant and potential cancer-associated fibroblasts marker for breast ductal carcinoma. *Experimental and Molecular Pathology*, **102**, 262–267.
46. Tucker, R.P. *et al.* (2009) The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments. *BBA - Molecular Cell Research*, **1793**, 888–892.
47. Krstic, J. *et al.* (2014) Transforming Growth Factor-Beta and Matrix Metalloproteinases: Functional Interactions in Tumor Stroma-Infiltrating Myeloid Cells. *The Scientific World Journal*, **2014**, 1–14.
48. Gomes, L.R. *et al.* (2012) TGF- β 1 modulates the homeostasis between MMPs

and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC Cancer*, **12**, 26.

49. Hill, D.S. *et al.* (2015) A Novel Fully Humanized 3D Skin Equivalent to Model Early Melanoma Invasion. *Molecular Cancer Therapeutics*, **14**, 2665–2673.
50. Gibot, L. *et al.* (2017) Tissue-engineered 3D human lymphatic microvascular network for in vitro studies of lymphangiogenesis. *Nat Protoc*, **12**, 1077–1088.
51. van der Heijden, A.G. *et al.* (2009) Recurrence, Progression, and Follow-Up in Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer. *European Urology Supplements*, **8**, 556–562.
52. Sanli, O. *et al.* (2017) Bladder cancer. *Nature Publishing Group*, **3**, 1–19.

Figures

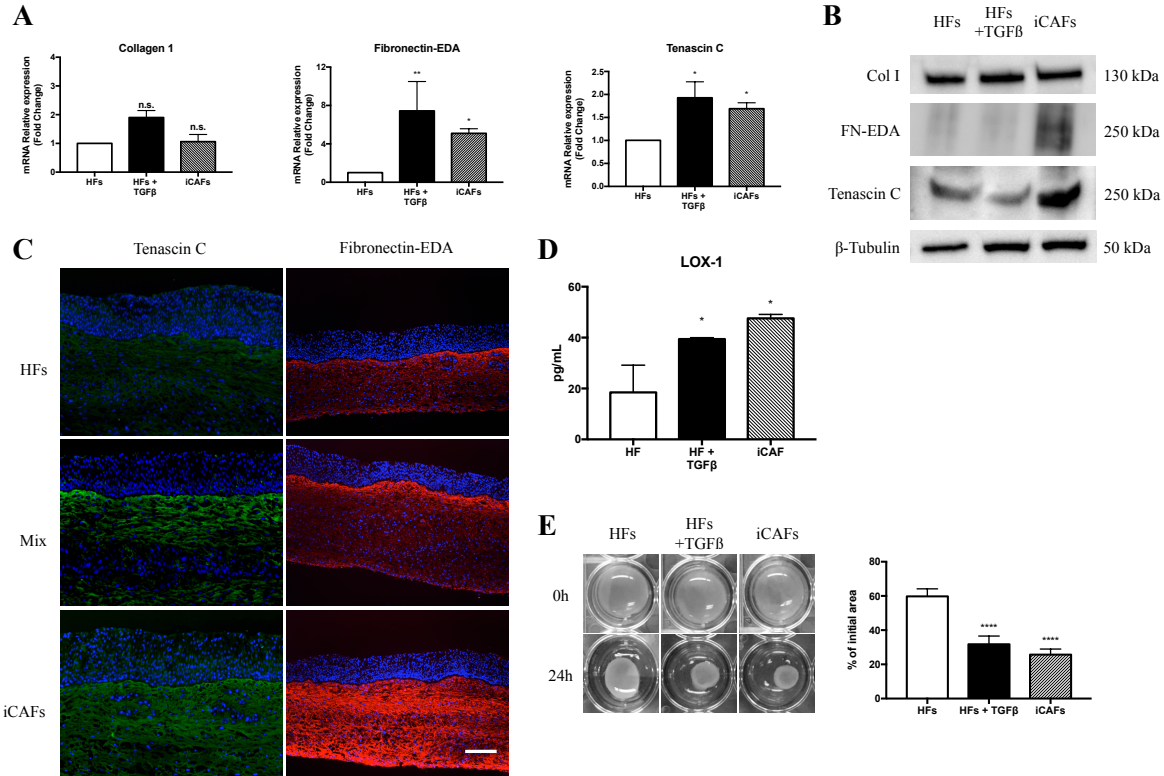


Figure 1 | Altered ECM protein expression in iCAFs.

A. mRNA expression of tenascin C and fibronectin-EDA in HF or iCAF lysates. **B.** Protein expression of tenascin C and fibronectin-EDA in HF, HF + TGFβ and iCAF lysates. β-Tubulin served as loading control. **C.** HF and iCAF were cultured in order to produce ECM sheets. Three sheets were stacked together and urothelial cells were seeded on the top to create a 3D vesical model. Tenascin C (green) and fibronectin-EDA (red) were labeled with specific antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 100 μm. **D.** Protein expression of LOX-1 in HF, HF + TGFβ and iCAF supernatants. **E.** Illustrative images from collagen gels with HF, HF + TGFβ and iCAF and quantification of gel contraction after 24h. Graphs show mean ± SD. The difference between groups was analyzed by one-way ANOVA followed by post hoc analysis using Dunnett's multiple comparison tests. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, n.s.=non-significant compared to the HF control group (n=4).

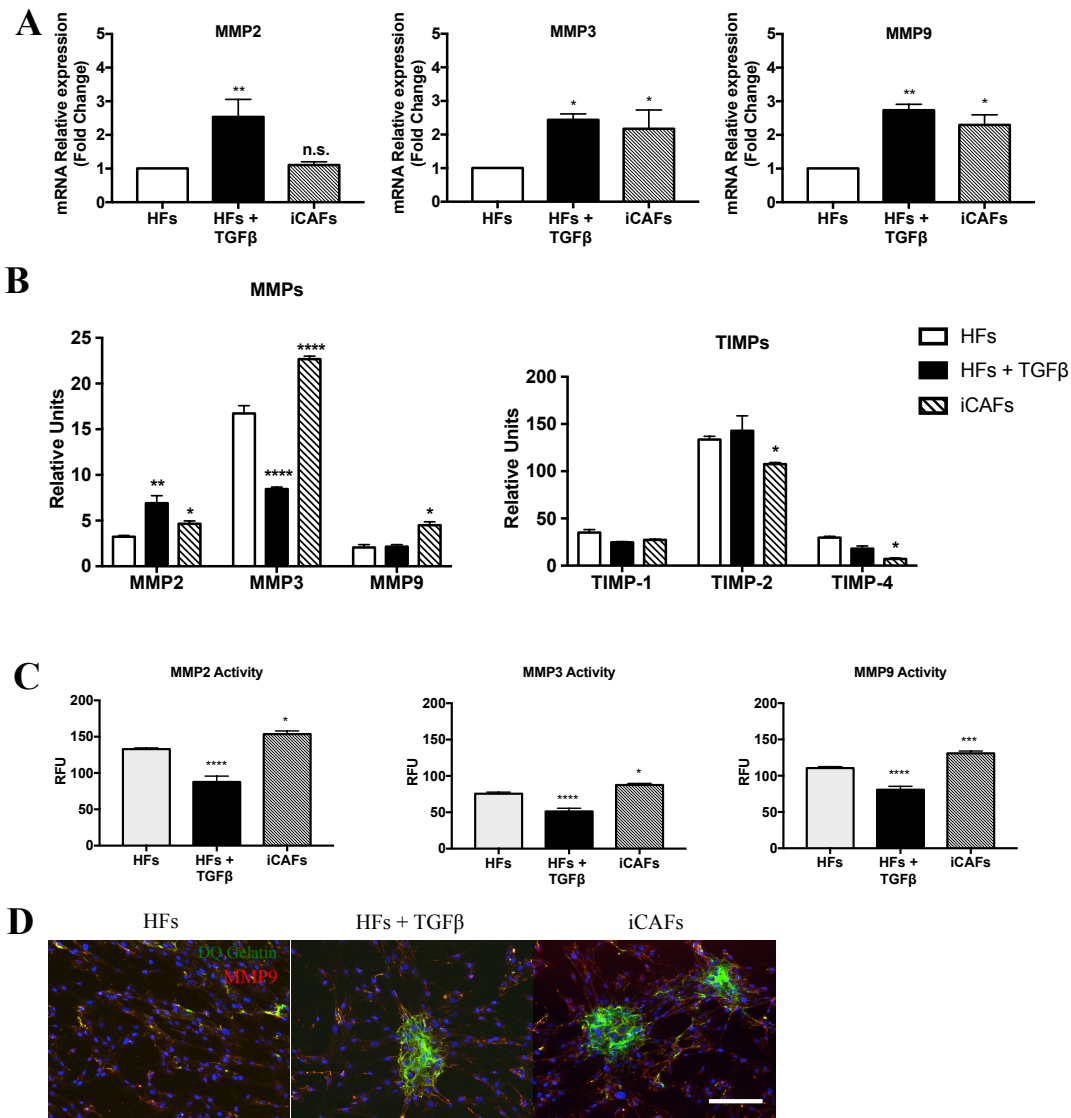


Figure 2 | Characterization of iCAF-derived MMP expression and activity.

A. mRNA expression of MMP2 and MMP9 in HF or iCAF supernatants. **B.** MMP and TIMP protein arrays using HF or iCAF supernatants. **C.** The MMP activity was evaluated with the MMP Activity Assay Kit. RFU=Relative fluorescence units. **D.** Fluorescence microscopy images of HF and iCAF exposed to the DQTM gelatin. The green fluorescence corresponds to gelatin degradation and the red fluorescence corresponds to MMP9. The difference between groups was analyzed by one-way ANOVA followed by post hoc analysis using Dunnett's multiple comparison tests. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, n.s.=non-significant compared to the HF control group (n=4).

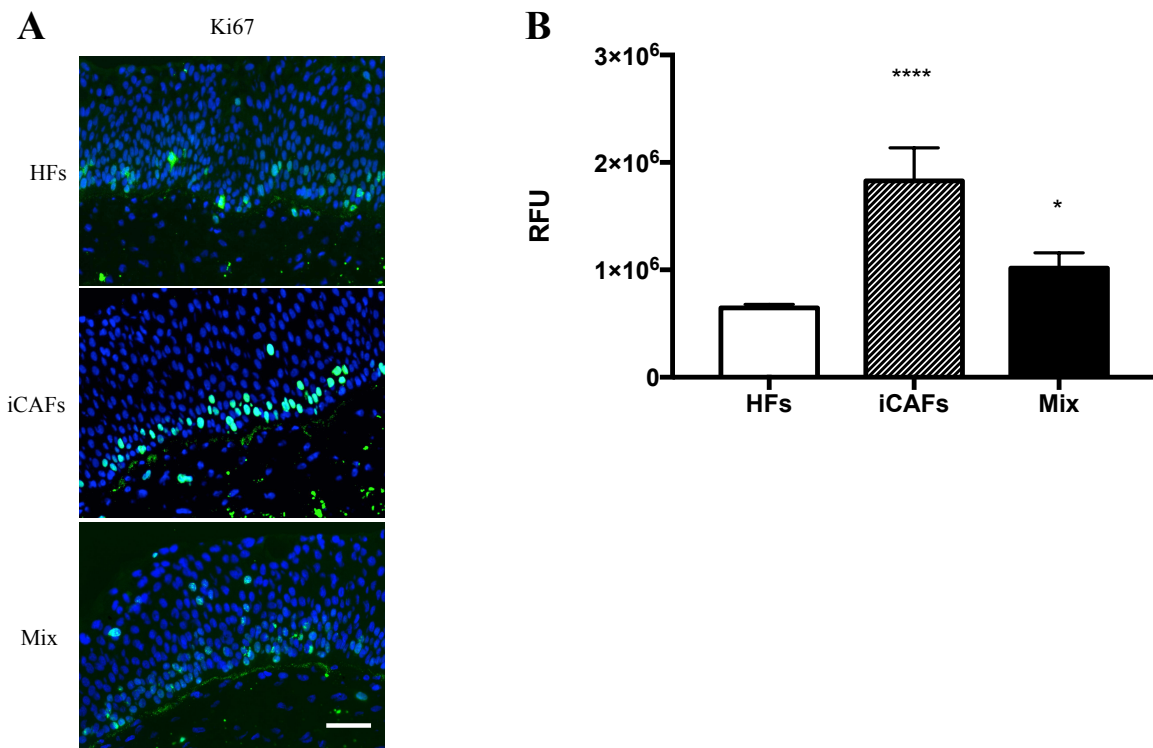


Figure 3 | The presence of iCAFs in the stroma of 3D vesical models induces the proliferation of urothelial cells.

A. Cell proliferation was evaluated in 3D vesical models with Ki67 staining (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 50 μ m. **B.** The proliferation of urothelial cells was quantified in decellularized 3D vesical models with the CellTiter-Glo® 3D Kit. The difference between groups was analyzed by one-way ANOVA followed by post hoc analysis using Dunnett's multiple comparison tests. RFU=Relative fluorescence units. * P <0.05, **** P <0.0001 compared to the HF control group (n=4).

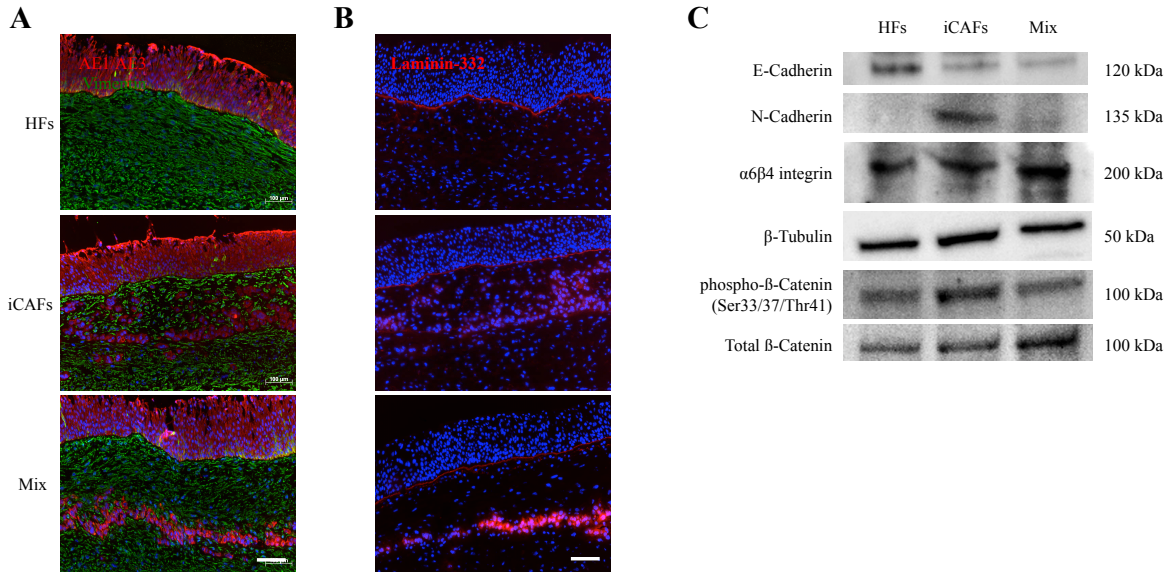


Figure 4 | The iCAF-derived ECM promotes an EMT state in urothelial cells.

A. HF and iCAF were cultured in order to produce ECM sheets. Three sheets were stacked together and urothelial cells were seeded on the top to create 3D vesical models. The localization of the cells was analyzed by immunofluorescent staining. Urothelial cells, labelled with the cytokeratin marker AE1/AE3 (red), migrate into the stromal compartment, labeled by vimentin (green), in ‘Mixed’ and ‘iCAF’ 3D vesical models. **B.** Invasive urothelial cells secrete high level of laminin-332 (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 100 μ m. **C.** Urothelial cells were seeded on the top of three decellularized and merged stromal sheets. Common EMT markers were analyzed by Western blotting in the urothelial cell lysate. The β -tubulin served as loading control.

Chapitre 6 - Discussion et conclusion

Le cancer a longtemps été considéré comme une pathologie dont l'initiation et l'évolution dépendent uniquement de l'acquisition par les cellules cancéreuses d'anomalies génétiques et épigénétiques. Il est maintenant reconnu qu'il s'agissait d'une vision plutôt restrictive du cancer et que le microenvironnement tumoral joue un rôle crucial dans le développement de cette maladie. Sachant que le pronostic du cancer est directement lié au potentiel invasif de la tumeur primitive et à ses éventuelles métastases, l'acquisition de connaissances fondamentales sur les mécanismes de l'oncogenèse liée au microenvironnement tumoral représente une orientation scientifique essentielle pour l'amélioration des thérapies anti-cancéreuses actuelles et le développement de nouvelles approches thérapeutiques telles que les nanothérapies, les virus oncolytiques ou encore les CAR T.

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales du microenvironnement tumoral dans le contexte du cancer de la vessie. Mes travaux ont démontré que les cellules cancéreuses de la vessie sécrètent une quantité importante de TGF β contenu à l'intérieur d'exosomes. La culture de fibroblastes vésicaux sains en présence de ces exosomes active la voie de signalisation TGF β /Smad et induit la différenciation de ces fibroblastes en CAF. À leur tour, les CAF, via une sécrétion accrue d'IL-6, augmentent la prolifération, la migration et l'invasion et favorisent l'expression de marqueurs de l'EMT chez les cellules cancéreuses. La composition de la MEC sécrétée par les CAF est caractérisée par une présence plus importante de protéines oncofœtales comme la fibronectine-EDA et la ténascine C. De plus, on observe une augmentation de l'expression et de l'activité de certaines MMP et de la LOX-1. Enfin, cette matrice induit la migration de cellules urothéliales saines dans un modèle vésical 3D et augmente l'expression de marqueurs de l'EMT dans ces cellules non cancéreuses.

Les exosomes, un véhicule de communication pour les cellules cancéreuses

Depuis leur première description il y a trois décennies, où on les considérait comme de simple débris, jusqu'à aujourd'hui où on reconnaît leur implication dans la communication intercellulaire, les rôles des exosomes dans le microenvironnement tumoral ne commencent

qu'à être découverts. Ainsi, la capacité des exosomes à transporter localement ou à distance des messagers cellulaires leur permet de reprogrammer phénotypiquement les cellules du microenvironnement (Kahlert & Kalluri 2013; Milane et al. 2015). Pour cette raison, il ne fait aucun doute que les exosomes sont des acteurs importants dans les étapes majeures du développement du cancer, de l'évasion immune, en passant par la reprogrammation du microenvironnement tumoral et l'établissement de métastases.

Bien que les CAF soient largement associés à une progression tumorale accrue, peu d'études se sont intéressées aux mécanismes impliqués dans leur activation. Mes travaux ont montré que les exosomes produits par les cellules cancéreuses de la vessie étaient en mesure d'induire des fibroblastes vésicaux primaires sains en CAF. Les cellules cancéreuses modulent ainsi leur environnement pour leur bénéfice en utilisant les exosomes comme intermédiaires.

Une question subsiste quant à savoir s'il est, dans un contexte physiologique, essentiel de générer des exosomes pour survivre. Pour y répondre, nous devons en apprendre davantage sur la biogénèse des exosomes et leurs rôles biologiques précis. Généralement, les études sur le rôle fonctionnel des exosomes dans la facilitation de la communication cellule-cellule sont basées sur des expériences *in vitro* dans des systèmes de culture isolés, utilisant des concentrations d'exosomes qui sont, au mieux, approximatives et non physiologiquement similaires. Par conséquent, la génération de souris transgéniques dans lesquelles il y aurait une suppression spécifique et complète des exosomes, pourrait permettre de répondre à cette question.

De par leur importance dans la communication entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral, les exosomes pourraient constituer une nouvelle cible thérapeutique. Alors que certaines études visent à inhiber les effecteurs contenus dans les exosomes, d'autres études se concentrent sur une approche plus générale qui consiste à bloquer la production d'exosomes tumoraux. Un inhibiteur de la sphingomyélinase, le GW4869, peut ainsi être utilisé pour empêcher la formation d'ILV et/ou la libération d'exosomes par la fusion des MVB aux membranes plasmiques (Luberto et al. 2002; Kosaka et al. 2010; Fabbri et al. 2012). Le traitement des cellules au GW4869 induit une

réduction significative du nombre d'exosomes sécrétés (Nakamura et al. 2017). D'autres études ont montré que la sécrétion des exosomes peut être altérée en inhibant différents gènes impliqués dans la biogenèse des exosomes, comme RAB27A ou nSMase2 (Peinado et al. 2012; Kosaka et al. 2013; Ostrowski et al. 2009). Ainsi, *in vivo*, la croissance tumorale est entravée et la formation de métastases est diminuée lorsque la communication médiée par les exosome est inhibée (Peinado et al. 2012; Kosaka et al. 2013). Il serait intéressant de développer des modèles d'étude *in vivo* dans lesquels la sécrétion des exosomes serait affectée spécifiquement dans les cellules cancéreuses en inactivant un ou plusieurs gènes impliqués dans la biogenèse des exosomes. Ce type de modèles contribuerait à la compréhension du rôle des exosomes au cours de l'initiation et de la progression de la tumeur, en abordant leur implication dans le développement du cancer. Néanmoins, ces protéines inhibées pourraient également être engagées dans la sécrétion de d'autres protéines, non liées aux exosomes, comme c'est le cas de RAB27A, qui est également responsable de la sécrétion, entre autres, de la MMP-9 (Bobrie et al. 2012). Ceci met en évidence le besoin de contrôles solides puisque ce n'est que dans ce cadre que nous pourrions pleinement comprendre les phénotypes directement attribuables à une inhibition de la sécrétion d'exosomes, plutôt que des effets secondaires dus à l'altération de la sécrétion d'autres facteurs.

Le TGF β au cœur de la différenciation des fibroblastes en CAF

Conformément aux résultats d'autres études (Lohr et al. 2001; Cat 2006; Casey et al. 2008; Lewis et al. 2004; Giannoni et al. 2010; Mitra et al. 2012; X. Wu et al. 2013) démontrant l'effet d'un facteur dérivé de la tumeur dans la différenciation des cellules stromales en CAF, mes travaux montrent que les exosomes sécrétés par les cellules cancéreuses de vessie sont impliqués dans le processus de différenciation des fibroblastes vésicaux en CAF, vraisemblablement par le transfert de TGF β de la cellule cancéreuse vers le fibroblaste (chapitre 3).

La présence de TGF β associé aux exosomes a déjà été rapportée par d'autres équipes (F. Huang et al. 2018; Borges et al. 2013), mais il est toujours possible que ce TGF β ait été co-isolé avec les exosomes pendant les étapes de purification. Il existe plusieurs méthodes afin

d'isoler les exosomes du surnageant, soit l'ultracentrifugation à haute vitesse, la précipitation des exosomes dans une solution contenant des polymers, l'immunoprécipitation ou encore l'ultrafiltration. Bien que chacune de ces techniques possèdent leurs avantages et leurs limites, l'absence d'un mécanisme d'isolement sélectif approprié compromet inévitablement la pureté des exosomes isolés, ce qui nuit à l'analyse en aval. Par exemple, des co-précipitations d'exosomes avec d'autres constituants cellulaires, en particulier d'autres vésicules extracellulaires, des agrégats de protéines ou même des protéines très abondantes ont été observées (Li et al. 2018). Ici, les exosomes ont été isolés à l'aide d'une solution commerciale contenant du polyéthylène glycol. Toutefois, mes travaux montrent que le TGF β est à l'intérieur de l'exosome, ce qui permet d'affirmer que ce TGF β n'est pas un artéfact de manipulation. Il faut cependant garder en tête que l'isolat d'exosomes peut ne pas être pur et contenir d'autres protéines. Un traitement doux à la protéase serait un bon moyen de purifier l'isolat.

Le TGF β est reconnu pour être un acteur clé dans l'activation des fibroblastes en myofibroblastes dans un contexte cicatriciel (Lewis et al. 2004; Anon 2002). En se liant à son récepteur, il déclenche la phosphorylation des Smads 2/3 ce qui permet le recrutement de Smad4 et la migration de ce complexe vers le noyau. Puisqu'en théorie le niveau maximal de phosphorylation des Smads est atteint en environ 30 à 60 minutes (Wrana et al. 1994) et que dans mes travaux nous observons plutôt un délai de 48h avant l'activation de la voie des Smad dans les fibroblastes traités aux exosomes, nous pourrions penser que cette activation est la conséquence du traitement aux exosomes qui aurait stimulé la production/sécrétion de TGF β par les fibroblastes. En d'autres mots, le traitement aux exosomes pourrait déclencher chez les fibroblastes une augmentation de la sécrétion de TGF β et que l'activation de ceux-ci en CAF s'opèrerait de manière autocrine. Pour creuser la question, les fibroblastes vésicaux ont été traités avec de la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse des protéines, tout juste avant d'ajouter les exosomes. Puisque la synthèse des protéines est bloquée dans les cellules, seul le TGF β exosomal peut activer la signalisation Smad. J'ai donc évalué l'activation de la voie Smad et trouvé une augmentation du niveau de phosphorylation chez les fibroblastes traités aux exosomes par rapport aux fibroblastes non traités, confirmant le rôle du TGF β exosomal dans l'activation

des CAF. Toutefois, ces résultats ne permettent pas d'expliquer le délai d'activation de la voie Smad.

Le TGF β est synthétisé sous une forme inactive dû à la présence du pro-domaine latent LAP. Pour exercer une activité biologique, le TGF β nécessite une activation qui implique la dissociation de LAP et du TGF β . Mes travaux ont montré qu'environ seulement 1,5-3% du TGF β exosomal est actif.

Bien que le mécanisme précis de libération et d'activation du TGF β exosomal latent ne soit pas connu, ces résultats suggèrent que le TGF β , localisé à l'intérieur de l'exosome, doit être libéré de ce dernier pour ensuite être activé avant de se lier aux récepteurs du TGF β à la surface des fibroblastes, ce qui pourrait expliquer le délai dans l'activation de la voie Smad observé dans mes travaux. Ainsi, il est possible que les exosomes éclatent après un certain temps dans le milieu extracellulaire libérant ainsi leur TGF β . Il est possible aussi que le contenu des exosomes, une fois internalisé, soit recyclé par les endosomes et ensuite sécrété par exocytose, libérant le TGF β dans le milieu extracellulaire.

Le CAF, architecte du microenvironnement tumoral

Les fibroblastes ont une plasticité phénotypique exceptionnelle et une capacité à sécréter une grande variété de facteurs solubles, de composantes matricielles et de vésicules extracellulaires. Alors que dans des conditions physiologiques les fibroblastes régulent l'homéostasie tissulaire et la cicatrisation des tissus lésés, dans les tumeurs solides ils co-évoluent avec la maladie pour se différencier en CAF et altérer la structure biochimique et physique du microenvironnement tumoral ainsi qu'influencer le comportement des cellules endothéliales et cancéreuses environnantes. Par conséquent, les CAF sont des régulateurs importants de la progression tumorale et influencent ainsi le devenir de la maladie. Des efforts croissants sont consacrés à mieux comprendre la biologie des CAF pour développer des stratégies thérapeutiques complémentaires ciblant spécifiquement ce type cellulaire.

Poursuivant cet objectif, mes travaux ont démontré que les CAF, une fois activés par les cellules cancéreuses, acquièrent un nouveau profil sécrétoire, produisant une variété de cytokines et facteurs de croissance pro-tumoraux (chapitre 4). Les CAF interagissent avec les cellules cancéreuses et modifient leur phénotype en les rendant plus malignes. Ainsi, on

peut observer l'apparition d'un état EMT, caractérisé par une perte de marqueurs épithéliaux au profit de marqueurs mésenchymateux, ainsi que par l'augmentation de l'expression de facteurs de transcription associés à l'EMT, suite à la culture de la lignée cellulaire non métastatique RT4 dans du milieu conditionné par les CAF. Nous avons également observé que les CAF favorisent la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de la vessie, et ce, via la voie de signalisation IL-6/STAT3. De plus, les CAF diminuent l'efficacité du traitement à la mitomycine C, la molécule la plus couramment utilisée en clinique contre le cancer de la vessie, en protégeant les cellules cancéreuses de l'apoptose. Globalement, nos résultats révèlent que l'IL-6 sécrétée par les CAF favorise le comportement malin des cellules cancéreuses de la vessie par l'activation du programme EMT. À notre connaissance, il s'agit de la première étude qui montre que l'IL-6 sécrétée par les CAF est suffisante pour transformer une lignée cellulaire non métastatique (RT4) en cellules métastatiques. Ces résultats fournissent une explication mécanistique quant au rôle de l'IL-6 dans le microenvironnement du cancer de la vessie ainsi que la corrélation observée entre les niveaux élevés d'IL-6 et le potentiel métastatique chez les patients atteints de cancer (Chen et al. 2013; K. Jin et al. 2018; Abana et al. 2017; Ben Andrews et al. 2002). Enfin, nous avons montré que l'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-IL-6 inhibe l'effet pro-tumorigène des CAF sur les cellules cancéreuses. Ces données soutiennent ainsi les traitements qui ciblent la signalisation de l'IL-6 dans la lutte contre le cancer. D'autres études ont aussi montré que la croissance tumorale et les capacités invasives des cellules cancéreuses de la vessie étaient inhibées lorsque ces dernières étaient traitées avec un anticorps neutralisant anti-IL-6 (Chen et al. 2013). En dépit de ces données précliniques, il y a un manque d'essais cliniques portant sur des approches ciblées, telles que l'inhibition de la signalisation de l'IL-6, dans le cas du cancer de la vessie.

De nombreux cancers ne progressent jamais vers un phénotype invasif *in situ*, probablement en raison des facteurs de l'hôte qui empêchent ce développement, un phénomène appelé « cancer sans maladie ». Ceci souligne le fait qu'une cellule transformée en elle-même n'est pas suffisante pour provoquer un cancer léthal, mais que la carcinogénèse nécessite le recrutement d'un microenvironnement tumoral permissif à la croissance tumorale et au développement de métastases (Judah Folkman 2004). On peut ainsi émettre

l'hypothèse qu'à l'inverse, une cellule épithéliale saine pourrait développer un phénotype pro-tumoral lorsqu'elle est en contact avec un stroma remodelé par les cellules cancéreuses. Toutefois, l'impact des CAF sur les cellules épithéliales saines n'a que très peu été étudié jusqu'à maintenant (Pazolli et al. 2009; Hayward et al. 2001; Bhowmick et al. 2004). Or, le cancer de la vessie est caractérisé par sa récurrence fréquente (van der Heijden & Witjes 2009). Alors que l'importance des CAF dans la progression tumorale est bien établie, les mécanismes par lesquels la MEC dérivée des CAF affecte les cellules épithéliales non tumorigènes et contribue à la tumorigénèse sont mal définis. Ainsi, nous avons étudié de quelle façon les CAF modulent la MEC afin d'induire un phénotype pro-tumoral chez les cellules urothéliales saines (chapitre 5). Nous avons d'abord caractérisé la composition de la MEC dérivée des CAF et nous avons trouvé un stroma fibrotique et réactif, enrichi de fibronectine-EDA et de ténascine C, ainsi qu'une expression accrue des enzymes MMPs et LOX-1. Comme les systèmes de culture 2D conventionnels ne parviennent pas à reproduire la complexité, la diversité et la nature dynamique du microenvironnement tumoral, nous avons utilisé le génie tissulaire pour concevoir un modèle vésical 3D qui incorpore des CAF. En utilisant ce modèle 3D, nous avons démontré que la matrice dérivée des CAF favorise la prolifération et la migration des cellules urothéliales saines et induit l'état EMT dans ces cellules. Ainsi, en plus de leurs effets paracines, les CAF exercent un impact direct sur les cellules urothéliales aussi bien saines que cancéreuses via la MEC qu'ils génèrent. Sur la base de ces observations, nous proposons donc qu'une boucle de régulation existe entre les cellules cancéreuses de la vessie, les CAF, la MEC et les cellules urothéliales, étant susceptible de potentialiser la récurrence du cancer de la vessie.

Exosomes, CAF, récurrence et métastases

Le cancer de la vessie est caractérisé par son haut taux de récurrence (van der Heijden & Witjes 2009). Puisque les exosomes produits par les cellules cancéreuses se retrouvent en bonne quantité dans l'urine, il est possible que ceux-ci activent les fibroblastes sains en CAF à distance de la tumeur primaire. La résection transurétrale est le traitement chirurgical par excellence dans le cas du cancer de la vessie (Chou et al. 2016). Bien qu'une attention particulière au moment de la chirurgie soit portée à dégager les tissus affectés par la maladie, il est possible qu'une portion du stroma réactif subsiste à l'intérieur de la vessie.

La présence résiduelle de CAF après la chirurgie pourrait expliquer en partie la récurrence chez certains patients, puisqu'ils induisent la prolifération, la migration et l'invasion via la sécrétion d'IL-6 ainsi que la résistance à la mitomycine C (chapitre 3), ainsi que la production d'une MEC favorisant l'invasion et l'apparition de marqueurs de l'EMT (chapitre 4). De futures études pourront explorer ces hypothèses.

Parmi les cas de récurrence, 10% à 20% des patients voient leur cancer progresser vers la forme métastatique (Kamat et al. 2016). La propagation métastatique des cellules cancéreuses, du site primaire vers d'autres tissus du corps, est la principale cause de mortalité du cancer, mais reste l'aspect le moins bien compris de la carcinogénèse. En continuant à s'appuyer sur l'hypothèse du 'seed and soil' de Paget, le concept de formation de niche métastatique sur des sites secondaires est bien établi et ce, grâce à un important travail démontrant des changements oncogéniques distincts, incluant la restructuration de la matrice extracellulaire et le recrutement de facteurs pro-tumorigènes au site métastatique (Paget 1889). Dans le but d'initier le processus métastatique, la tumeur primaire sécrète un éventail de molécules qui permettent la création d'un nouvel environnement favorable pour l'établissement des cellules cancéreuses. Les cellules saines du microenvironnement tumoral sont connues pour influencer le comportement métastatique et il existe des preuves démontrant que la formation réussie d'une métastase dépend du remodelage préalable de la niche métastatique favorisant l'attachement et la croissance des cellules cancéreuses (Kaplan et al. 2005). Puisque les exosomes s'infiltrent librement dans tous les fluides corporels, ils accèdent aisément à tous les organes et créent un vaste réseau de communication. D'ailleurs, le suivi *in vivo* d'exosomes de mélanome marqués puis injectés par voie intraveineuse à des souris a montré que les exosomes circulants sont rapidement absorbés dans les tissus, y compris le foie, les poumons, les reins et la rate (Takahashi et al. 2013). De plus, des études ont montré la présence de fibroblastes activés dans la niche pré-métastatique (Psaila & Lyden 2009; Giannoni et al. 2010). Ainsi, il est possible que ces exosomes participent à l'activation des fibroblastes sains du site pré-métastatique en CAF. De plus amples études devront être réalisées afin de valider cette hypothèse.

Enfin, mes travaux ont contribué à mieux connaître les mécanismes d'action des CAF et confirment le rôle central du microenvironnement tumoral sur la carcinogénèse. Le cancer

est une maladie qui ne peut être complètement vaincue sans le remodelage du microenvironnement tumoral qui l'accompagne puisque celui-ci offre une niche idéale aux cellules cancéreuses résiduelles. Ainsi, une thérapie ciblant conjointement les cellules cancéreuses et les CAF pourrait s'avérer prometteuse.

Bibliographie

- Abana, C.O. et al., 2017. IL-6 variant is associated with metastasis in breast cancer patients W. B. Coleman, ed. *PLOS ONE*, 12(7), pp.e0181725–15.
- Abusamra, A.J. et al., 2005. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8⁺ T-cell apoptosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(2), pp.169–173.
- Adur, J. et al., 2014. Colon Adenocarcinoma Diagnosis in Human Samples by Multicontrast Nonlinear Optical Microscopy of Hematoxylin and Eosin Stained Histological Sections. *Journal of Cancer Therapy*, 05(13), pp.1259–1269.
- Al-Nedawi, K. et al., 2008. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biology*, 10(5), pp.619–624.
- Albregues, J. et al., 2018. Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nature Communications*, 6, pp.1–15.
- Ali, M.R.K. et al., 2017. Targeting cancer cell integrins using gold nanorods in photothermal therapy inhibits migration through affecting cytoskeletal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(28), pp.E5655–E5663.
- Allory, Y. et al., 2014. Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Mutations in Bladder Cancer: High Frequency Across Stages, Detection in Urine, and Lack of Association with Outcome. *European Urology*, 65(2), pp.360–366.
- Amatangelo, M.D. et al., 2005. Stroma-Derived Three-Dimensional Matrices Are Necessary and Sufficient to Promote Desmoplastic Differentiation of Normal Fibroblasts. *Matrix Pathobiology*, 167(2), pp.475–488.
- Anderson, D.E.J. & Hinds, M.T., 2012. Extracellular matrix production and regulation in micropatterned endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 427(1), pp.159–164.
- Andrews, B. et al., 2002. Preoperative plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor predict disease recurrence and survival of patients with bladder cancer. *J Urol*. 167(3):1475-81.
- Aoto, K. et al., 2018. Complex formation between platelet-derived growth factor receptor β and transforming growth factor β receptor regulates the differentiation of mesenchymal stem cells into cancer-associated fibroblasts. *Oncotarget*, 9(75), pp.34090-34102.
- Augsten, M., 2014. Cancer-Associated Fibroblasts as Another Polarized Cell Type of the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Oncology*, 4(62), pp.1–8.
- Azzi, S., Hebda, J.K. & Gavard, J., 2013. Vascular permeability and drug delivery in cancers. 3, pp.1–14.
- Bahrini, I. et al., 2015. Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating

- complement factors in microglia. *Scientific Reports*, 5(1), pp.243–8.
- Baker, A.M. et al., 2012. Lysyl oxidase enzymatic function increases stiffness to drive colorectal cancer progression through FAK. pp.1–6.
- Balbás-Martínez, C. et al., 2013. Recurrent inactivation of STAG2 in bladder cancer is not associated with aneuploidy. *Nature Publishing Group*, 45(12), pp.1464–1469.
- Barker, H.E., Cox, T.R. & Erler, J.T., 2012. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nature Publishing Group*, 12(8), pp.540–552.
- Batagov, A.O., Kuznetsov, V.A. & Kurochkin, I.V., 2011. Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. *BMC Genomics*, 12, pp.1–14.
- Beckham, C.J. et al., 2014. Bladder Cancer Exosomes Contain EDIL-3/Dell1 and Facilitate Cancer Progression. *Journal of Urology*, 192(2), pp.583–592.
- Berrondo, C. et al., 2016. Expression of the Long Non-Coding RNA HOTAIR Correlates with Disease Progression in Bladder Cancer and Is Contained in Bladder Cancer Patient Urinary Exosomes. *PLOS ONE*, 11(1), pp.1–21.
- Bhowmick, N.A. et al., 2004. TGF-Beta Signaling in Fibroblasts Modulates the Oncogenic Potential of Adjacent Epithelia. *Science*, 303, pp.848–851.
- Birk, J.W. et al., 2014. Second Harmonic Generation Imaging Distinguishes Both High-Grade Dysplasia and Cancer from Normal Colonic Mucosa. *Digestive Diseases and Sciences*, 59(7), pp.1529–1534.
- Bobrie, A. et al., 2011. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. *Traffic*, 12, pp.1659–1668.
- Bobrie, A. et al., 2012. Rab27a Supports Exosome-Dependent and -Independent Mechanisms That Modify the Tumor Microenvironment and Can Promote Tumor Progression. *Cancer Research*, 72(19), pp.4920–4930.
- Bochner, B.H. et al., 1995. Angiogenesis in Bladder Cancer: Relationship Between Microvessel Density and Tumor Prognosis. *J Natl Cancer Inst*, 87, pp.1603–1612.
- Bockstal, M.V. et al., 2014. Differential regulation of extracellular matrix protein expression in carcinoma-associated fibroblasts by TGF- β 1 regulates cancer cell spreading but not adhesion. *Oncoscience*, 1(10), pp.634–648.
- Borges, F.T. et al., 2013. TGF-1-Containing Exosomes from Injured Epithelial Cells Activate Fibroblasts to Initiate Tissue Regenerative Responses and Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(3), pp.385–392.
- Brouwers, J.F. et al., 2013. Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes. *Proteomics*, 13, pp.1660–1666.

- Brunner, A. & Tzankov, A., 2007. The Role of Structural Extracellular Matrix Proteins in Urothelial Bladder Cancer (Review). *Biomarker Insights*, 2, pp.BMI.S294–427.
- Burnet, M., 1957. Cancer - A Biological Approach. *British Medical Journal*, pp.779–786.
- Cai, J. et al., 2011. Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness. *Carcinogenesis*, 33(1), pp.20–29.
- Calon, A. et al., 2012. Dependency of Colorectal Cancer on a TGF- β -Driven Program in Stromal Cells for Metastasis Initiation. *Cancer Cell*, 22(5), pp.571–584.
- Calon, A., Tauriello, D.V.F. & Batlle, E., 2014. TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 25, pp.15–22.
- Canoglu, A. et al., 2004. Microvessel density as a prognostic marker in bladder carcinoma: Correlation with tumor grade, stage and prognosis. *International Urology and Nephrology*, 36, pp.401–405.
- Caradec, J. et al., 2014. Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods. *Clinical Biochemistry*, pp.1–7.
- Carapuca, E.F. et al., 2016. Anti-stromal treatment together with chemotherapy targets multiple signalling pathways in pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Pathology*, 239, pp.286–296.
- Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9, pp.653-660.
- Casey, T.M. et al., 2008. Cancer associated fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF- β 1) increase invasion rate of tumor cells: a population study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 110(1), pp.39–49.
- Castellani, P. et al., 2002. Differentiation between High- and Low-Grade Astrocytoma Using a Human Recombinant Antibody to the Extra Domain-B of Fibronectin. *The American Journal of Pathology*, 161(5), pp.1695–1700.
- Cat, B., 2006. Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species. *Journal of Cell Science*, 119(13), pp.2727–2738.
- Chang, H.Y. et al., 2002. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *PNAS*, 99(20), pp.12877–12882.
- Chen, H. et al., 2009. TGF- β -induced fibroblast activation protein expression, fibroblast activation protein expression increases the proliferation, adhesion, and migration of HO-8910PM. *Experimental and Molecular Pathology*, 87(3), pp.189–194.
- Chen, M.-F., Lin, P.-Y., Wu, C.-F., Chen, W.-C. & Wu, C.-T., 2013. IL-6 Expression Regulates Tumorigenicity and Correlates with Prognosis in Bladder Cancer P. Canoll, ed. *PLOS ONE*, 8(4), pp.e61901–10.

- Chou, R. et al., 2016. Treatment of muscle-invasive bladder cancer: A systematic review. *Cancer*, 122(6), pp.842–851.
- Claesson-Welsh, L., 2015. Vascular permeability—the essentials. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 120(3), pp.135–143.
- Colak, S. & Dijke, ten, P., 2017. Targeting TGF- β Signaling in Cancer. *TRENDS in CANCER*, 3(1), pp.56–71.
- Colombo, M. et al., 2013. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, 126(24), pp.5553–5565.
- Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C., 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 30, pp.255–289.
- Comito, G. et al., 2013. Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. pp.1–9.
- Cooper, M. & Pinkus, H., 1977. Intrauterine Transplantation of Rat Basal Cell Carcinoma as a Model for Reconversion of Malignant to Benign Growth. *Cancer Research*, 37, pp.2544–2552.
- Corrado, C. et al., 2014. Exosome-mediated crosstalk between chronic myelogenous leukemia cells and human bone marrow stromal cells triggers an Interleukin 8-dependent survival of leukemia cells. *Cancer Letters*, 348(1-2), pp.71–76.
- Crew, J.P. et al., 1997. Vascular Endothelial Growth Factor Is a Predictor of Relapse and Stage Progression in Superficial Bladder Cancer'. *Cancer Research*, 57, pp.5281–5285.
- De Wever, O., 2004. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent proinvasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *The FASEB Journal*, pp.1–24.
- Deng, G. et al., 2017. Gastric cancer-derived exosomes promote peritoneal metastasis by destroying the mesothelial barrier. *FEBS Letters*, 591(14), pp.2167–2179.
- Dobruch, J. et al., 2015. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *European Urology*, pp.1–11.
- Donmez, G. et al., 2009. Vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and thrombospondin-1 (TSP-1) expression in urothelial carcinomas. *Pathology -- Research and Practice*, 205(12), pp.854–857.
- Duda, D.G. et al., 2010. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), pp.21677–21682.
- Dunn, G. et al., 2002. Cancer immunoediting: from immuno-surveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), pp.991–998.

- Egeblad, M., Littlepage, L. & Werb, Z., 2005. The Fibroblastic Coconspirator in Cancer Progression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 70(1), pp.383–388.
- Egeblad, M., Nakasone, E.S. & Werb, Z., 2010. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*, pp.884–901.
- Erler, J.T. et al., 2006. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, 440(7088), pp.1222–1226.
- Evans RA, et al. 2003. TGF- β 1-mediated fibroblast–myofibroblast terminal differentiation— the role of Smad proteins. *Exp Cell Res*. 15;282(2):90-100.
- Fabbri, M. et al., 2012. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. pp.E2110–E2116.
- Fader, C.M. et al., 2009. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *BBA - Molecular Cell Research*, 1793(12), pp.1901–1916.
- Fauconnet, 2009. Expression analysis of VEGF-A and VEGF-B: Relationship with clinicopathological parameters in bladder cancer. *Oncology Reports*, 21(6), pp.1–10.
- Filipazzi, P. et al., 2012. Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. *Seminars in Cancer Biology*, 22(4), pp.342–349.
- Franzen, C.A. et al., 2015. Urothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition after exposure to muscle invasive bladder cancer exosomes. *Oncogenesis*, 4(8), pp.e163–10.
- Frühbeis, C. et al., 2013. Neurotransmitter-Triggered Transfer of Exosomes Mediates Oligodendrocyte–Neuron Communication B. A. Barres, ed. *PLOS Biology*, 11(7), pp.e1001604–19.
- Fullár, A. et al., 2015. Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. ???, pp.1–16.
- Fuyuhiko, Y. et al., 2012. Cancer-associated orthotopic myofibroblasts stimulates the motility of gastric carcinoma cells. *Cancer Science*, 103(4), pp.797–805.
- Gaggioli, C. et al., 2007. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nature Cell Biology*, 9(12), pp.1392–1400.
- Gialeli, C. et al., 2014. PDGF/PDGFR signaling and targeting in cancer growth and progression: Focus on tumor microenvironment and cancer-associated fibroblasts. *Curr Pharm Des*, 20(17), pp.2843-2848.
- Giannoni, E. et al., 2010. Reciprocal Activation of Prostate Cancer Cells and Cancer-

- Associated Fibroblasts Stimulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stemness. *Cancer Research*, 70(17), pp.6945–6956.
- Goetz, J.G., Minguet, S., Navarro-Lérida, I., Lazcano, J.J., Samaniego, R., Calvo, E., Tello, M., Osteso-Ibáñez, T., Pellinen, T., Echarri, A., Cerezo, A., Klein-Szanto, A.J.P., Garcia, R., Keely, P.J., Sánchez-Mateos, P., Cukierman, E. & Del Pozo, M.A., 2011. Biomechanical Remodeling of the Microenvironment by Stromal Caveolin-1 Favors Tumor Invasion and Metastasis. *Cell*, 146(1), pp.148–163.
- Gordon, M.K. & Hahn, R.A., 2009. Collagens. *Cell and Tissue Research*, 339(1), pp.247–257.
- Grimm, S. et al., 2015. Malignancy of bladder cancer cells is enhanced by tumor-associated fibroblasts through a multifaceted cytokine-chemokine loop. *Experimental Cell Research*, 335(1), pp.1–11.
- Gross-Cohen, M. et al., 2016. Heparanase 2 expression inversely correlates with bladder carcinoma grade and stage. *Oncotarget*, 7(16), pp.22556–22565.
- Grugan, K.D. et al., 2010. Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor plays a functional role in esophageal squamous cell carcinoma invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(24), pp.11026–11031.
- Grum-Schwensen, B. et al., 2005. Suppression of Tumor Development and Metastasis Formation in Mice Lacking the S100A4(mts1) Gene. *Cancer Research*, 65(9), pp.3772–3780.
- Guan, J. et al., 2014. Retinoic acid inhibits pancreatic cancer cell migration and EMT through the downregulation of IL-6 in cancer associated fibroblast cells. *Cancer Letters*, 345(1), pp.132–139.
- Guo, P. et al., 2001. Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms Display Distinct Activities in Promoting Tumor Angiogenesis at Different Anatomic Sites. *Cancer Research*, 61, pp.8569–8577.
- Györfi, A.H., Matei, A.E. & Distler, J.H.W., 2018. Targeting TGF- β signaling for the treatment of fibrosis. *Matrix Biology*, pp.1–53.
- Halberg, N. et al., 2008. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 37(3), pp.753-xi.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Hanson, P.I. & Cashikar, A., 2012. Multivesicular Body Morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), pp.337–362.
- Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P., 1983. Receptor-Mediated Endocytosis of Transferrin and Recycling of the Transferrin Receptor in Rat Reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, 97(2), pp.329–339.

- Hayashi, N. & Cunha, G.R., 1991. Mesenchyme-induced Changes in the Neoplastic Characteristics of the Dunning Prostatic Adenocarcinoma. *Cancer Research*, 51, pp.4924–4930.
- Hayward, S.W. et al., 2001. Malignant Transformation in a Nontumorigenic Human Prostatic Epithelial Cell Line. *Cancer Research*, 61, pp.8135–8142.
- Henriksson, M.L. et al., 2011. Colorectal Cancer Cells Activate Adjacent Fibroblasts Resulting in FGF1/FGFR3 Signaling and Increased Invasion. *The American Journal of Pathology*, 178(3), pp.1387–1394.
- Hood, J.L., San, R.S. & Wickline, S.A., 2011. Exosomes Released by Melanoma Cells Prepare Sentinel Lymph Nodes for Tumor Metastasis. *Cancer Research*, 71(11), pp.3792–3801.
- Hoshino, A. et al., 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), pp.329–335.
- Hoshino, D. et al., 2013. Exosome Secretion Is Enhanced by Invadopodia and Drives Invasive Behavior. *CellReports*, 5(5), pp.1159–1168.
- Hsu, C. et al., 2010. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C. *The Journal of Cell Biology*, 189(2), pp.223–232.
- Huang, F. et al., 2018. Enhancement of Anti-Leukemia Immunity by Leukemia-Derived Exosomes Via Downregulation of TGF- β 1 Expression. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(1), pp.240–254.
- Huang, J.J. & Blobel, G.C., 2016. Dichotomous roles of TGF- β in human cancer. *Biochemical Society Transactions*, 44(5), pp.1441–1454.
- Huang, Z. & Feng, Y., 2017. Exosomes Derived From Hypoxic Colorectal Cancer Cells Promote Angiogenesis Through Wnt4-Induced β -Catenin Signaling in Endothelial Cells. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 25(5), pp.651–661.
- Huncharek, M. et al., 2000. Intravesical chemotherapy prophylaxis in primary superficial bladder cancer: a meta-analysis of 3703 patients from 11 randomized trials. *Journal of Clinical Epidemiology*, pp.676–680.
- Ishimoto, T. et al., 2017. Activation of Transforming Growth Factor Beta 1 Signaling in Gastric Cancer-associated Fibroblasts Increases Their Motility, via Expression of Rhomboid 5 Homolog 2, and Ability to Induce Invasiveness of Gastric Cancer Cells. *Gastroenterology*, 153(1), pp.191–204.e16.
- Jan, A.T. et al., 2019. Biology, Pathophysiological Role, and Clinical Implications of Exosomes: A Critical Appraisal. *Cells*, 8(2), 99.
- Jin, K., Pandey, N.B. & Popel, A.S., 2018. Simultaneous blockade of IL-6 and CCL5 signaling for synergistic inhibition of triple-negative breast cancer growth and

- metastasis. *20*(54), pp.1–10.
- Jobe, N.P. et al., 2018. Simultaneous blocking of IL-6 and IL-8 is sufficient to fully inhibit CAF-induced human melanoma cell invasiveness. *Histochemistry and Cell Biology*, pp.1–13.
- Johnstone, R.M. et al., 1987. Vesicle Formation during Reticulocyte Maturation. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(19), pp.9412–9420.
- Ju, J.A. et al., 2017. Hypoxia Selectively Enhances Integrin Receptor Expression to Promote Metastasis. *Molecular Cancer Research*, *15*(6), pp.723–734.
- Judah Folkman, R.K., 2004. Cancer without disease. *Nature*, *427*, p.787.
- Jung, Y., Kim, J.K., Shiozawa, Y., Wang, Jingcheng, Mishra, A., Joseph, J., Berry, J.E., McGee, S., Lee, E., Sun, H., Wang, Jianhua, Jin, T., Zhang, H., Dai, J., Krebsbach, P.H., Keller, E.T., Pienta, K.J. & Taichman, R.S., 2013a. Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nature Communications*, *4*, pp.1795–11.
- Jung, Y., Kim, J.K., Shiozawa, Y., Wang, Jingcheng, Mishra, A., Joseph, J., Berry, J.E., McGee, S., Lee, E., Sun, H., Wang, Jianhua, Jin, T., Zhang, H., Dai, J., Krebsbach, P.H., Keller, E.T., Pienta, K.J. & Taichman, R.S., 2013b. Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nature Communications*, *4*, pp.1795–23.
- Kahlert, C. & Kalluri, R., 2013. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *Journal of Molecular Medicine*, *91*(4), pp.431–437.
- Kamat, A.M. & Porten, S., 2014. Myths and Mysteries Surrounding Bacillus Calmette-Guérin Therapy for Bladder Cancer. *European Urology*, *65*(2), pp.267–269.
- Kamat, A.M. et al., 2016. Bladder cancer. *The Lancet*, *388*(10061), pp.2796–2810.
- Kamat, A.M. et al., 2015. Expert consensus document: Consensus statement on best practice management regarding the use of intravesical immunotherapy with BCG for bladder cancer. *Nature Publishing Group*, *12*(4), pp.225–235.
- Kaplan, R.N. et al., 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, *438*(7069), pp.820–827.
- Kaplan, R.N., Rafii, S. & Lyden, D., 2006. Preparing the “Soil”: The Premetastatic Niche. *Cancer Research*, *66*(23), pp.11089–11093.
- Kasashima, H. et al., 2014. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) from stromal fibroblasts stimulates the progression of gastric cancer. *Cancer Letters*, *354*(2), pp.438–446.
- Khan, S. et al., 2009. Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *British Journal of Cancer*, *100*(7), pp.1073–1086.

- Kim, K.K., Sheppard, D. & Chapman, H.A., 2018. TGF- β 1 Signaling and Tissue Fibrosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(4), pp.a022293–35.
- Kim, S.-A., Lee, E.K. & Kuh, H.-J., 2015. Co-culture of 3D tumor spheroids with fibroblasts as a model for epithelial–mesenchymal transition in vitro. *Experimental Cell Research*, pp.1–10.
- Knowles, M.A. & Hurst, C.D., 2015. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature Publishing Group*, 15(1), pp.25–41.
- Knuchel, S. et al., 2015. Fibroblast surface-associated FGF-2 promotes contact- dependent colorectal cancer cell migration and invasion through FGFR-SRC signaling and integrin. *Oncotarget*, 6(16), pp.14300–14317.
- Kosaka, N. et al., 2013. Neutral Sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent Exosomal Transfer of Angiogenic MicroRNAs Regulate Cancer Cell Metastasis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), pp.10849–10859.
- Kosaka, N. et al., 2010. Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), pp.17442–17452.
- Kucharzewska, P. et al., 2013. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *PNAS*, 110(18), pp.7312–7317.
- Kumar, D. et al., 2015. Mitigation of Tumor-Associated Fibroblast-Facilitated Head and Neck Cancer Progression With Anti–Hepatocyte Growth Factor Antibody Ficlaturumab. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 141(12), pp.1133–1139.
- Lachenal, G. et al., 2011. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(2), pp.409–418.
- Lakins, M.A. et al., 2018. Cancer-associated fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8+ T Cells to protect tumour cells. *Nature Communications*, pp.1–9.
- Lau, E.Y.T. et al., 2016. Cancer-Associated Fibroblasts Regulate Tumor-Initiating Cell Plasticity in Hepatocellular Carcinoma through c-Met/FRA1/HEY1 Signaling. *Cell Reports*, 15(6), pp.1175–1189.
- Lederle, W. et al., 2009. MMP13 as a stromal mediator in controlling persistent angiogenesis in skin carcinoma. *Carcinogenesis*, 31(7), pp.1175–1184.
- Lee, K.W. et al., 2015. Twist1 Is a Key Regulator of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Research*, 75(1), pp.73–85.
- Lee, Y., Jung, W.H. & Koo, J.S., 2018. Adipocytes can induce epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 153(2), pp.323–335.

- Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D.L. & Weaver, V.M., 2009b. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell*, 139(5), pp.891–906.
- Lewis, M.P. et al., 2004. Tumour-derived TGF- β 1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *British Journal of Cancer*, 90(4), pp.822–832.
- Li, C., 2015. CD97 promotes gastric cancer cell proliferation and invasion through exosome-mediated MAPK signaling pathway. *World Journal of Gastroenterology*, 21(20), pp.6215–15.
- Li, P. et al., 2018. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, 7(3), pp.789–804.
- Liakou, C.I. et al., 2007. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human bladder cancer. *Cancer Immunity*, 7, pp.10–17.
- Lipponen, P.K. et al., 1993. Tumour Infiltrating Independent Prognostic Factor in Transitional Cell Bladder Cancer. *Eur J Cancer*, 29A(1), pp.69–75.
- Liu, C. et al., 2006. Murine Mammary Carcinoma Exosomes Promote Tumor Growth by Suppression of NK Cell Function. *The Journal of Immunology*, 176(3), pp.1375–1385.
- Liu, C.-C. et al., 2018. Collagen XVII/laminin-5 activates epithelial-to-mesenchymal transition and is associated with poor prognosis in lung cancer. *Oncotarget*, 9(2), pp.1656–1672.
- Llorente, A. et al., 2013. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(7), pp.1302–1309.
- Lohr, M. et al., 2001. Transforming Growth Factor- 1 Induces Desmoplasia in an Experimental Model of Human Pancreatic Carcinoma. *Cancer Research*, 61, pp.550–555.
- Lu, X. & Kang, Y., 2007. Organotropism of Breast Cancer Metastasis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(2-3), pp.153–162.
- Luberto, C. et al., 2002. Inhibition of Tumor Necrosis Factor-induced Cell Death in MCF7 by a Novel Inhibitor of Neutral Sphingomyelinase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(43), pp.41128–41139.
- Mace, T.A. et al., 2013. Pancreatic Cancer-Associated Stellate Cells Promote Differentiation of Myeloid-Derived Suppressor Cells in a STAT3-Dependent Manner. *Microenvironment and Immunology*, 73(10), pp.1–13.
- Mack, G.S. & Marshall, A., 2010. Lost in migration. *Nature Publishing Group*, 28(3), pp.214–229.

- Malmström, P.-U. et al., 2009. An Individual Patient Data Meta-Analysis of the Long-Term Outcome of Randomised Studies Comparing Intravesical Mitomycin C versus Bacillus Calmette-Guérin for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *European Urology*, 56(2), pp.247–256.
- Mari, A. et al., 2018. Patterns and predictors of recurrence after open radical cystectomy for bladder cancer: a comprehensive review of the literature. *World Journal of Urology*, 36(2), pp.157–170.
- Marsh, T., Pietras, K. & McAllister, S.S., 2013. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(7), pp.1070–1078.
- Masaki Kobayashi, Kenjiro Sawada Tadashi Kimura, 2017. Potential of Integrin Inhibitors for Treating Ovarian Cancer: A Literature Review. *Cancers*, 9(12), pp.83–10.
- Massagué, J. 2012. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(10), pp. 616-630.
- Maxwell, P.J. et al., 2014. Tumor-derived CXCL8 signaling augments stroma-derived CCL2-promoted proliferation and CXCL12-mediated invasion of PTEN-deficient prostate cancer cells. *Oncotarget*, 5(13), pp.1–14.
- McCready, J. et al., 2010. Secretion of extracellular hsp90 α via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer*, 10(1), pp.663–10.
- Meehan, K. & Vella, L.J., 2015. The contribution of tumour-derived exosomes to the hallmarks of cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 53(2), pp.121–131.
- Melo, S.A. et al., 2015. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, 523(7559), pp.177–182.
- Meng, X.-M., Nikolic-Paterson, D.J. & Lan, H.Y., 2016. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nature Publishing Group*, 12(6), pp.325–338.
- Midgley, A.C. et al., 2013. Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)-stimulated Fibroblast to Myofibroblast Differentiation Is Mediated by Hyaluronan (HA)-facilitated Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and CD44 Co-localization in Lipid Rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 288(21), pp.14824–14838.
- Midwood, K.S. & Orend, G., 2009. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3(3-4), pp.287–310.
- Milane, L. et al., 2015. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *Journal of Controlled Release*, 219(C), pp.278–294.
- Mitra, A.K. et al., 2012. MicroRNAs Reprogram Normal Fibroblasts into Cancer-Associated Fibroblasts in Ovarian Cancer. *Cancer Discovery*, 2(12), pp.1100–1108.
- Miyake, M. et al., 2016. CXCL1-Mediated Interaction of Cancer Cells with Tumor-

- Associated Macrophages and Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Tumor Progression in Human Bladder Cancer. *NEO*, 18(10), pp.636–646.
- Montecalvo, A. et al., 2012. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*, 119(3), pp.756–766.
- Morelli, A.E., 2004. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104(10), pp.3257–3266.
- Mrazek, A. et al., 2014. Colorectal Cancer-Associated Fibroblasts are Genotypically Distinct. *Current Cancer Therapy Reviews*, 10(2), pp.97–218.
- Mu, W., Rana, S. & Zöller, M., 2013. Host Matrix Modulation by Tumor Exosomes Promotes Motility and Invasiveness. *NEO*, 15(8), pp.875–IN4.
- Nagasaki, T. et al., 2013. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour–stroma interaction. 110(2), pp.469–478.
- Nakamura, K. et al., 2017. Exosomes Promote Ovarian Cancer Cell Invasion through Transfer of CD44 to Peritoneal Mesothelial Cells. *Molecular Cancer Research*, 15(1), pp.78–92.
- Nazarenko, I. et al., 2010. Cell Surface Tetraspanin Tspan8 Contributes to Molecular Pathways of Exosome-Induced Endothelial Cell Activation. *Cancer Research*, 70(4), pp.1668–1678.
- Network, T.C.G.A.R., 2014. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 507(7492), pp.315–322.
- Ni, W.-D. et al., 2017. Tenascin-C is a potential cancer-associated fibroblasts marker and predicts poor prognosis in prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(3), pp.607–612.
- Nishimoto, S. et al., 2016. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Science Advances*, 2(3), pp.e1501332–e1501332.
- OConnell, J.T. et al., 2011. VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. 108(38), pp.16002–16007.
- Olaso, E., 1997. Tumor-dependent activation of rodent hepatic stellate cells during experimental melanoma metastasis. *Hepatology*, 26(3), pp.634–642.
- Olive, K.P. et al., 2009. Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science*, 324(5933), pp.1457–1461.
- Olumi, A.F. et al., 1999. Carcinoma-associated Fibroblasts Direct Tumor Progression of Initiated Human Prostatic Epithelium. *Cancer Research*, 59, pp.5002–5011.

- Orimo, A. et al., 2005. Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell*, 121(3), pp.335–348.
- Orr, B. et al., 2011. Identification of stromally expressed molecules in the prostate by tag-profiling of cancer-associated fibroblasts, normal fibroblasts and fetal prostate. 31(9), pp.1130–1142.
- Ostrowski, M. et al., 2009. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, 12(1), pp.19–30.
- Owusu, B.Y., Vaid, M. & Kaler, P., 2015. Prognostic and Predictive Significance of Stromal Fibroblasts and Macrophages in Colon Cancer. *Biomarkers in cancer*, 7(S1), pp.29–37.
- Oyama, F. et al., 1993. Coordinate Oncodevelopmental Modulation of Alternative Splicing of Fibronectin Pre-Messenger RNA at ED-A, ED-B, and CS1 Regions in Human Liver Tumors. *Cancer Research*, 53, pp.2005–2011.
- Öhlund, D. et al., 2017. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, 7, pp.jem.20162024–18.
- Page-McCaw, A., Ewald, A.J. & Werb, Z., 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp.221–233.
- Paget, S., 1889. Distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet*, pp.571–573.
- Pazolli, E. et al., 2009. Senescent Stromal-Derived Osteopontin Promotes Preneoplastic Cell Growth. *Cancer Research*, 69(3), pp.1230–1239.
- Peinado, H. et al., 2012. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18(6), pp.883–891.
- Pena, C. et al., 2013. STC1 Expression By Cancer-Associated Fibroblasts Drives Metastasis of Colorectal Cancer. *Cancer Research*, 73(4), pp.1287–1297.
- Psaila, B. & Lyden, D., 2009. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), pp.285–293.
- Pula, B. et al., 2013. Significance of podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts: A comprehensive review. *International Journal of Oncology*, 42, pp.1849–1857.
- Qian, L.-W. et al., 2003. Co-cultivation of pancreatic cancer cells with orthotopic tumor-derived fibroblasts: fibroblasts stimulate tumor cell invasion via HGF secretion whereas cancer cells exert a minor regulative effect on fibroblasts HGF production. *Cancer Letters*, 190(1), pp.105–112.
- Ramovs, V., Molder, te, L. & Sonnenberg, A., 2018. The opposing roles of laminin-binding

- integrins in cancer. *Matrix Biology*, pp.1–65.
- Raposo, G. et al., 1996. B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles. *Journal Experimental Medecin*, 183, pp.1161–1172.
- Räsänen, K. & Vaheri, A., 2010. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Experimental Cell Research*, 316(17), pp.2713–2722.
- Reynaud, C. et al., 2017. Lysyl Oxidase Is a Strong Determinant of Tumor Cell Colonization in Bone. *Cancer Research*, 77(2), pp.1–12.
- Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386, pp.671-674.
- Rizwani, W., Allen, A. & Trevino, J., 2015. Hepatocyte Growth Factor from a Clinical Perspective: A Pancreatic Cancer Challenge. *Cancers*, 7(3), pp.1785–1805.
- Sadlonova, A. et al., 2004. Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional in vitro co-culture. *Breast Cancer Research*, 7(1), pp.1–14.
- Sanli, O. et al., 2017. Bladder cancer. *Nature Publishing Group*, 3, pp.1–19.
- Sanz-Moreno, V. et al., 2011. ROCK and JAK1 Signaling Cooperate to Control Actomyosin Contractility in Tumor Cells and Stroma. *Cancer Cell*, 20(2), pp.229–245.
- Savina, A., Vidal, M. & Colombo, M.I., 2002. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *Journal of Cell Science*, 115, pp.2505–2515.
- Schulte, J. et al., 2012. Expression of the E-cadherin repressors Snail, Slug and Zeb1 in urothelial carcinoma of the urinary bladder: relation to stromal fibroblast activation and invasive behaviour of carcinoma cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 138(6), pp.847–860.
- Scott, R.W. et al., 2010. LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells. *The Journal of Cell Biology*, 191(1), pp.169–185.
- Serini, G. et al., 1998. The Fibronectin Domain ED-A Is Crucial for Myofibroblastic Phenotype Induction by Transforming Growth Factor- β 1. *The Journal of Cell Biology*, 142(3), pp.873–881.
- Sharma, P. et al., 2007. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *PNAS*, 4(10), pp.3967–3972.
- Shi, H. et al., 2015. Overexpression of monocarboxylate anion transporter 1 and 4 in T24-induced cancer-associated fibroblasts regulates the progression of bladder cancer cells in a 3D microfluidic device. *Cell Cycle*, pp.1–8.
- Skog, J. et al., 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10(12), pp.1470–1476.

- Smyth, M.J., Godfrey, D.I. & Trapani, J.A., 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology*, 2(4), pp.293–299.
- Société Canadienne du Cancer, 2017. Statistiques canadiennes sur le cancer. pp.1–147.
- Soldevilla, B. et al., 2013. Tumor-derived exosomes are enriched in Δ Np73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. *Human Molecular Genetics*, 23(2), pp.467–478.
- Steward, R.L. et al., 2011. Mechanical stretch and shear flow induced reorganization and recruitment of fibronectin in fibroblasts. *Scientific Reports*, 1(1), pp.878–12.
- Stoorvogel, W. et al., 1991. Late Endosomes Derive from Early Endosomes by Maturation. *Cell*, 65, pp.417–427.
- Stuelten, C.H., 2005. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF- and TGF. *Journal of Cell Science*, 118(10), pp.2143–2153.
- Stuffers, S. et al., 2009. Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. *Traffic*, 10, pp.925–937.
- Subramaniam, K.S. et al., 2013. Cancer-Associated Fibroblasts Promote Proliferation of Endometrial Cancer Cells J. W. Glod, ed. *PLOS ONE*, 8(7), pp.e68923–16.
- Sugimoto, H. et al., 2006. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biology Therapy*, 5(12), pp.1640–1646.
- Sukari, A. et al., 2016. Cancer Immunology and Immunotherapy. *Anticancer Research*, 36(11), pp.5593–5606.
- Surowiak, P. et al., 2006. Stromal myofibroblasts in breast cancer: relations between their occurrence, tumor grade and expression of some tumour markers. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 4(2), pp.111–116.
- Sylvester, R. et al., 2005. Bacillus Calmette-Guerin Versus Chemotherapy for the Intravesical Treatment of Patients with Carcinoma in Situ of the Bladder: a Meta-Analysis of the Published Results of Randomized Clinical Trials. *The Journal of Urology*, 174(1), pp.86–91.
- Sylvester, R.J. et al., 2016. 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? *European Urology*, 69(2), pp.231–244.
- Takahashi, Y. et al., 2013. Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *Journal of Biotechnology*, 165(2), pp.77–84.
- Tang, D. et al., 2015. Cancer-associated fibroblasts promote angiogenesis in gastric cancer

- through galectin-1 expression. *Tumor Biology*, pp.1–11.
- Taylor, D.D. & Gercel-Taylor, C., 2008. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 110(1), pp.13–21.
- Tchou, J. et al., 2012. Human breast cancer associated fibroblasts exhibit subtype specific gene expression profiles. *BMC Medical Genomics*, 5(39), pp.1–13.
- Teng, F. et al., 2016. Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis. *Journal of Hematology & Oncology*, 9(1), pp.1–15.
- Tucker, R.P. & Chiquet-Ehrismann, R., 2009. The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments. *BBA - Molecular Cell Research*, 1793(5), pp.888–892.
- Umezu, T. et al., 2014. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood*, 124(25), pp.3749–3757.
- Vakonakis, I. & Campbell, I.D., 2007. Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(5), pp.578–583.
- Van Agtmael, T. & Bruckner-Tuderman, L., 2009. Basement membranes and human disease. *Cell and Tissue Research*, 339(1), pp.167–188.
- van der Heijden, A.G. & Witjes, J.A., 2009. Recurrence, Progression, and Follow-Up in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *European Urology Supplements*, 8(7), pp.556–562.
- Vincent-Schneider, H. et al., 2002. Exosomes bearing HLA-DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells. *International Immunology*, 14(7), pp.713–722.
- Vona-Davis, L. & Gibson, L.F., 2013. Adipocytes as a critical component of the tumor microenvironment. *Leukemia Research*, 37(5), pp.483–484.
- Walton, K.L., Johnson, K.E. & Harrison, C.A., 2017. Targeting TGF- β Mediated SMAD Signaling for the Prevention of Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 8, pp.1231–11.
- Wieckowski, E.U. et al., 2009. Tumor-Derived Microvesicles Promote Regulatory T Cell Expansion and Induce Apoptosis in Tumor-Reactive Activated CD8⁺ T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 183(6), pp.3720–3730.
- Wilson, T.R. et al., 2012. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature*, 487(7408), pp.505–509.
- Woldu, S.L., Bagrodia, A. & Lotan, Y., 2017. Guideline of guidelines: non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU International*, 119(3), pp.371–380.
- Wolfers, J. et al., 2001. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature Medicine*, 7(3), pp.297–303.

- Wrana, J.L. et al., 1994. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*, 370, pp.341–347.
- Wu, M.-H. et al., 2011. Targeting Galectin-1 in Carcinoma-Associated Fibroblasts Inhibits Oral Squamous Cell Carcinoma Metastasis by Downregulating MCP-1/CCL2 Expression. *Clinical Cancer Research*, 17(6), pp.1306–1316.
- Wu, X. et al., 2013. Hepatocyte growth factor activates tumor stromal fibroblasts to promote tumorigenesis in gastric cancer. *Cancer Letters*, 335(1), pp.128–135.
- Xiang, X. et al., 2008. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *International Journal of Cancer*, 124(11), pp.2621–2633.
- Xue, M., Chen, W. & Li, X., 2015. Urothelial cancer associated 1: a long noncoding RNA with a crucial role in cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, pp.1–13.
- Yang, C.-C., Chu, K.-C. & Yeh, W.-M., 2004. The expression of vascular endothelial growth factor in transitional cell carcinoma of urinary bladder is correlated with cancer progression. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 22(1), pp.1–6.
- Yang, Z. et al., 2017. Tenascin C is a prognostic determinant and potential cancer-associated fibroblasts marker for breast ductal carcinoma. *Experimental and Molecular Pathology*, 102(2), pp.262–267.
- Yu, Y. et al., 2013. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. 110(3), pp.724–732.
- Zhang, H. et al., 2017. Exosome-delivered EGFR regulates liver microenvironment to promote gastric cancer liver metastasis. *Nature Communications*, 8, pp.1–11.
- Zhang, H.-G. et al., 2012. Exosomes and immune surveillance of neoplastic lesions: a review. *Biotechnic & Histochemistry*, 87(3), pp.161–168.
- Zhang, P. et al., 2018. Exosome-mediated delivery of MALAT1 induces cell proliferation in breast cancer. *OncoTargets and Therapy*, 11, pp.291–299.
- Zhang, X. et al., 2015. Exosomes in cancer: small particle, big player. *Journal of Hematology & Oncology*, 8(83), pp.1–13.
- Zhao, M., Mishra, L. & Deng, C.-X., 2018. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 14(2), pp.111–123.
- Zhou, W. et al., 2014. Cancer-Secreted miR-105 Destroys Vascular Endothelial Barriers to Promote Metastasis. *Cancer Cell*, 25(4), pp.501–515.
- Zhu, X. et al., 2016. Galectin-1 knockdown in carcinoma-associated fibroblasts inhibits migration and invasion of human MDA-MB-231 breast cancer cells by modulating MMP-9 expression. *Acta Biochim Biophys Sin*, 48(5), pp.462–467.

Zhuang, J. et al., 2015. TGF β 1 secreted by cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through lncRNA-ZEB2NAT. *Scientific Reports*, 5, pp.11924–13.

Annexe 1- Développement d'un modèle humain 3D de cancer de la vessie par génie tissulaire pour l'étude de la progression tumorale et la découverte de drogues

Auteurs :

Cassandra Ringuette Goulet, Geneviève Bernard, Stéphane Chabaud, Amélie Couture, Alexandre Langlois, Bertrand Neveu, Frédéric Pouliot, Stéphane Bolduc

Contributions des auteurs :

J'ai participé à la conception des expériences, à leur réalisation, à la conception des méthodes d'analyse, à l'analyse des résultats et à la conception et à la préparation des tableaux et des figures. J'ai rédigé l'ensemble de la première version du manuscrit et participé au peaufinage de la version finale. Geneviève Bernard, Amélie Couture et Alexandre Langlois ont participé aux expériences. Stéphane Chabaud a participé à l'écriture. Bertrand Neveu a relu le manuscrit. Les Prs Frédéric Pouliot et Stéphane Bolduc ont supervisé l'étude.

Article publié dans :

Biomaterials 2017; **145**: 233–241

Impact Factor : 8,4

Résumé :

The tumour microenvironment is critical to both the initiation and maintenance of tumorigenesis. Reconstitution of the microenvironment is a major challenge for *in vitro* cancer models. Indeed, conventional 2D culture systems cannot replicate the complexity, diversity and dynamic nature of the tumour microenvironment. In this study, we have developed a 3D endothelialized vesical equivalent by using tissue engineering from primary human cells in which non-invasive or invasive bladder cancer (BCa) cell lines, cultured as compact spheroids, were incorporated. Invasive BCa cells cross the basement membrane and invade the stromal compartment whereas non-invasive BCa cells are confined to the urothelium. Our 3D BCa model could be used as a reliable model for assessing drug responses, potentially reducing or partially replacing animal experiments, and thus should have applications in the identification of novel targets as well as toxicological evaluation of anticancer therapies.

Référence :

Ringuette-Goulet C, Bernard G, Chabaud S, Couture A, Langlois A, Neveu B *et al.* Tissue-engineered human 3D model of bladder cancer for invasion study and drug discovery. *Biomaterials* 2017; **145**: 233–241.

Annexe 2- Modélisation du cancer de la vessie

Auteurs :

Cassandra Ringuette Goulet, Stéphane Bolduc, Frédéric Pouliot

Contributions des auteurs :

J'ai rédigé l'ensemble de la première version du manuscrit et participé au peaufinage de la version finale. Les Prs Frédéric Pouliot et Stéphane Bolduc ont supervisé l'étude.

Article publié dans :

World Journal of Urology 2018 Jun 14

Impact Factor : 2,7

Résumé :

Bladder cancer is a major public health concern and the treatment options available are unable to significantly prevent the disease recurrence and progression. The need for experimental tumor models to efficiently reproduce the pathology of human cancers has prompted researchers to attempt various approaches. We review the advantages and limitations of currently available *in vitro* 2D and 3D bladder cancer models as well as *in vivo* rodent models. To date, despite the description of a variety of animal models (including transplantable, carcinogen-induced and genetically engineered models), the establishment of reliable, simple, practicable and reproducible animal models remains an ongoing challenge. Recently, sophisticated 3D culture systems have been designed to better recapitulate the phenotypic and cellular heterogeneity, as well as microenvironmental aspects of the *in vivo* tumor growth, while being more flexible to conduct repeated experiments. Selecting the most appropriate model for a specific application will maximize the conversion of potential therapies from the laboratory to clinical practice and requires an understanding of the various models available.

Référence :

Ringuette-Goulet, C., Bolduc, S., Pouliot, F. Modeling human bladder cancer. *World Journal of Urology* 2018. PMID: 29948049.

Annexe 3 - Différentes lignées cellulaires du cancer de la vessie adaptent leur profil d'agressivité à la tension de l'oxygène

Auteurs :

Stéphane Chabaud, Ève Pellerin, **Cassandra Ringuette-Goulet**, Frédéric Pouliot, Stéphane Bolduc.

Contributions des auteurs :

Stéphane Chabaud a participé à la conception des expériences, à leur réalisation, à la conception des méthodes d'analyse, à l'analyse des résultats, à la conception et à la préparation des tableaux et des figures. Il a rédigé l'ensemble de la première version du manuscrit et a participé au peaufinage de la version finale. Ève Pellerin a participé aux expériences. J'ai participé à l'écriture du manuscrit. Les Prs Frédéric Pouliot et Stéphane Bolduc ont supervisé l'étude.

Article soumis dans :

International Journal of Oncology

Annexe 4 - Les exosomes sécrétés par les fibroblastes dans un tissu 3D généré par génie tissulaire

Auteurs :

Bastien Paré, **Cassandra Ringuette-Goulet**, Nicolas Dupré, Stéphane Bolduc, François Gros-Louis.

Contributions des auteurs :

J'ai participé avec Bastien Paré à la conception des expériences, à leur réalisation, à la conception des méthodes d'analyse, à l'analyse des résultats, à la conception et à la préparation des tableaux et des figures. Nous avons rédigé l'ensemble de la première version du manuscrit et participé au peaufinage de la version finale. Les Prs Nicolas Dupré, Stéphane Bolduc et François Gros-Louis ont supervisé l'étude.

Article soumis dans :

Scientific Reports

Résumé :

Exosomes are small vesicles acting as messengers of intercellular communication by delivering various cellular components, such as lipids, proteins and RNA. A growing body of evidence suggests that exosomes may be used as diagnostic biomarkers as their molecular content have been shown to be specific to cell types and representative of the cellular states. Although the emergence of publications, especially in the cancer field, challenges and experimental difficulties remain for their isolation, purification and the analysis of their cargos. Non-cancerous fibroblasts are not known to be an efficient source of secreted exosomes when grown in conventional 2D cellular culture oppositely to cancer-associated fibroblasts. Here, we have developed a novel method for exosomes isolation and characterization from a tissue-engineered 3D culture system based on a sedimentation reagent, allowing efficient recovery of fibroblast-secreted exosomes with high purity. This method will allow a better characterization and analysis of the exosomal content, as well as to better understand the role of exosomes as prominent mediators of disease propagation and their potential use for biomarker discoveries. This will be highly useful for researchers who are interested in the fundamental aspects of exosomes as well as those working on the development of minimally invasive diagnostic tools.

Annexe 5 - Cellules souches adipeuses - Une source optimale pour la régénération de la voie urinaire ?

Auteurs :

Hazem Orabi, **Cassandra R. Goulet**, Julie Fradette et Stéphane Bolduc.

Contributions des auteurs :

J'ai rédigé avec Hazem Orabi l'ensemble de la première version du manuscrit et participé au peaufinage de la version finale. Julie Fradette a participé à l'écriture du manuscrit. Les Prs Julie Fradette et Stéphane Bolduc ont supervisé l'étude.

Chapitre publié dans :

Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine, 2014, InTech, ISBN 978-953-51-1731-5

Référence :

Orabi, H., **Goulet**, CR., Fradette, J., Bolduc, S. Adipose-Derived Stem Cells—Are They the Optimal Cell Source for Urinary Tract Regeneration? *Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine*, 2014, InTech, ISBN 978-953-51-1731-5

Annexe 6 - Les défis cliniques dans la reconstruction urétrale par génie tissulaire

Auteurs :

Sophie Ramsay, **Cassandra Ringuette Goulet**, Alexandre Langlois, Stéphane Bolduc.

Contributions des auteurs :

Sophie Ramsay a rédigé l'ensemble de la première version du manuscrit et participé au peaufinage de la version finale. J'ai participé à l'écriture du manuscrit avec Alexandre Langlois. Le Pr Stéphane Bolduc a supervisé l'étude.

Éditorial publié dans :

Transl Androl Urol. 2016 Apr; 5(2): 267–270

Référence :

Ramsay, S., **Ringuette-Goulet, C.**, Langlois, A., Bolduc, S. Clinical challenges in tissue-engineered urethral reconstruction. *Translational Andrology and Urology* 2016;**5** (2), 267