

Université Pierre et Marie Curie

Università degli Studi di Milano

Ecole doctorale 394 Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Groupe de Recherche Clinique 05 – OncotypeUro

Scuola dottorale di Medicina Molecolare e Traslazionale

Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche “L. Sacco”

**«Profils moléculaires prédictifs du potentiel métastatique du
carcinome urothélial de la vessie de stade pT1 ou supérieur»**

Par M Luca LUNELLI

Thèse de doctorat en cotutelle internationale Franco-Italienne

Dirigée par M le Pr Olivier CUSSENOT,

co-directrice Mme le Pr Daria TRABATTONI

Présentée et soutenue publiquement le 20 Décembre 2017

Devant un jury composé de :

M le Professeur Olivier CUSSENOT, Directeur de thèse

Mme le Professeur Eva COMPERAT, Examineur

M le Professeur Stéphane LARRE, Rapporteur

M le Professeur Alexandre ESCARGUEIL, Examineur

Mme le Professeur Daria TRABATTONI, Co-directrice de thèse

Mme le Professeur Manuela NEBULONI, Examineur

M le Docteur Pietro ZERBI, Rapporteur

M le Professeur Andrea SALONIA, Examineur



A mes grands-parents.

Remerciements

Ce manuscrit est l'aboutissement de trois années de travail entre clinique et recherche, et je souhaite remercier les personnes qui m'ont accompagnée tout au long de cette thèse. J'adresse mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, le Pr Olivier Cussenot, pour m'avoir permis de prendre goût à la recherche à travers ce sujet très actuel, et ceci à l'interface de plusieurs disciplines, entre théorie et clinique. Je le remercie d'avoir guidé mes premiers pas dans le monde hospitalier français en m'accueillant au sein du Service d'Urologie de l'Hôpital Tenon. Je le remercie aussi de m'avoir laissé prendre des initiatives et pour la confiance qu'il m'a témoignée pendant ces trois ans.

Je remercie les membres de mon jury de thèse, qui ont accepté de m'aider à franchir cette étape importante qu'est la soutenance. En premier lieu, je remercie le Pr Stéphane Larré, le Dr Pietro Zerbi pour leur lecture attentive de mon manuscrit, leurs critiques pertinentes ainsi que leurs suggestions. Je remercie vivement le Pr Eva Comperat, le Pr Alexandre Escargueil, le Pr Daria Trabattoni et le Pr Manuela Nebuloni et le Pr Andrea Salonia de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail. Merci en particulier au Dr Roberta Rossi et au Dr Pietro Zerbi pour leurs remarques et leurs conseils, qui ont commencé en 2007 lors de mon premier externat en anatomie pathologique à Milan.

Ces trois années ont été très riches en collaborations, contacts scientifiques et humains. Je remercie Mme Géraldine Cancel-Tassin pour m'avoir accueilli au GRC05-OncotypeUro au sein de son groupe, pour ses conseils précieux et pour sa lecture critique de ce manuscrit. J'adresse mes remerciements aux chercheurs de ce groupe, Valérie Ondet et Cécile Gaffory. Je remercie également le Pr Franco Gaboardi (Università Vita Salute San Raffaele) pour les discussions intéressantes que nous avons eues et pour l'intérêt montré vers ce projet. Un grand merci au service d'anatomie pathologique de l'Hôpital Tenon de Paris et de l'Ospedale Sacco di Milano, en particulier au Dr Thomas Reilland et à Mme Anita Rodenas. Sans analyses immunohistochimiques, cette thèse n'aurait pas vu le jour.

Ce travail naît d'une exploration clinique et a été rendu possible grâce à toute l'équipe des services d'urologie de Tenon à Paris et de l'hôpital Sacco de Milan. Pouvoir dialoguer avec mes collègues et bénéficier de leur expertise a été une grande chance pour moi. Ceci a sans aucun doute contribué au plaisir que j'ai eu à faire ma thèse et leur passion a renforcé

mon désir de continuer dans la recherche. Merci à Mme Maria Couso-Correia pour son aide polyvalente et sa disponibilité.

Je ne saurais bien sûr oublier de remercier mes prédécesseurs de l'UPMC, qui ont donné à ces trois années une dimension humaine particulière et dont l'exemple reste un modèle. Une pensée spéciale au Dr Raphaële Renard-Penna, que j'ai eu l'honneur de rencontrer la première fois dans le cloître de l'UPMC lors des journées des doctorants, et qui est maintenant une référence incontournable.

Merci au Dr Mohamed Tligui pour m'avoir accompagné dans mon intégration et pour m'avoir appris les gestes endoscopiques. Je remercie Jean-Baptiste pour nos discussions entre quatre yeux. Merci également à Marie pour son soutien, ainsi qu'à Steeve, Sabrina Simon et Florie.

Mes remerciements vont de tout cœur à mes proches, famille, belle-famille et amis (de Paris, de Milan et d'ailleurs), qui m'ont constamment supportée dans tous les sens du terme. Je remercie en particulier mes parents et mes grands-parents pour leur soutien et tout ce qu'ils m'ont appris. Enfin, et plus que tout, je voudrais te remercier, Elise, pour l'amour et la confiance que tu m'as témoignés pendant tout ce temps, ainsi que pour ta patience, ton encouragement et ton aide. C'est un bonheur indescriptible de partager nos vies, et d'accompagner notre Victor vers son autonomie.

Grazie.

Sommaire

Remerciements	2
Sommaire	4
I. Préambule.....	6
II. Introduction générale sur les tumeurs urothéliales.....	7
II.1 Epidémiologie et facteurs de risque.....	7
II.2 Classification	8
II.3 Evaluation du risque de récurrence ou progression des TVNIM	10
II.4 Traitements	12
II.5 Suivi des TVNIM	13
II.6 Traitement et suivi des TVIM	15
II.7 Tumeurs urothéliales de la voie excrétrice supérieure (TVES).....	16
II.8 Nouvelle taxonomie des cancers urothéliaux : sous-types basal et luminal.....	17
II.9 Mutations géniques somatiques.....	19
II.9.1 TP53	19
II.9.2 FGFR3	20
II.9.3 STAG2	21
II.9.4 Profil mutationnel global des tumeurs de vessie selon le TCGA.....	22
II.10 Altérations chromosomiques du carcinome urothélial selon les données du TCGA	23
III. Analyse moléculaire des altérations chromosomiques et mutations du carcinome urothélial.....	26
III.1 Introduction.....	26
III.2 Analyse moléculaire des altérations chromosomiques par puce CGH BCA-Oligo sur tissu tumoral congelé.....	28
III.2.1 Patients et Méthodes.....	28
III.2.2 Extraction d'ADN à partir de tissus congelés	28
III.2.3 Test BCA-oligo	29
III.2.4 Résultats	30
III.3 Analyse moléculaire des altérations chromosomiques par puce CGH BCA-oligo et des mutations du gène FGFR3 à partir d'ADN urinaire de patients présentant un carcinome urothélial.....	34
III.3.1 Matériels et méthodes.....	34
III.3.2 Protocole de collection et analyse des urines	34
III.3.3 Résultats	35
III.3.4 Conclusion.....	37
IV. Analyse immunohistochimique des tumeurs urothéliales.....	39
IV.1 Introduction : Marqueurs pronostiques candidats pour des études en immunohistochimie.....	39
IV.1.1 Marqueur de prolifération : Ki67/MIB1.....	39
IV.1.2 Marqueur lié à la stabilité de l'ADN: P53, STAG2, AURORA.....	39
IV.1.2.1 P53	39
IV.1.2.2 STAG2	41
IV.1.2.3 AURORA Kinase A.....	41
IV.1.3 Typologie luminale-basale : CK5/6, CK14, P63, FOXA1, GATA3.....	41
IV.1.3.1 P63	41

IV.1.3.2	Cytokératine 5/6 et cytokératine 14 : typologie basale	42
IV.1.3.3	FOXA1: typologie luminale	42
IV.1.3.4	GATA3 : typologie luminale	43
IV.2	Présentation de l'étude	43
IV.3	Matériels et méthodes	44
IV.3.1	Population étudiée	44
IV.3.2	Choix des marqueurs et Immunohistochimie	47
IV.3.3	Statistiques	51
IV.3.4	Résultats	52
IV.3.5	Discussion	62
IV.3.5.1	Analyse en Composantes Principales des rapports entre tumeur primitive et métastase 67	
V.	Conclusion.....	70
VI.	Annexes.....	71
VI.1	Annexe 1 – Article Publié.....	71
VI.2	Annexe 2 – Mots clés.....	78
VII.	Glossaire.....	79
VIII.	Table des illustrations.....	80
IX.	Table des tableaux	82
X.	Bibliographie.....	83
XI.	Résumé - Abstract :	1
XI.1	Profils moléculaires prédictifs du potentiel métastatique du carcinome urothélial de la vessie de stade pT1 ou supérieur	2
XI.2	Predictive Molecular Profiles of the Metastatic Potential of Urothelial Carcinoma of the Bladder Stage pT1 or Greater	4
XI.3	Profili molecolari predittivi del potenziale metastatico del carcinoma uroteliale della vescica di stadio pT1 o superiore	5

I. Préambule

Le carcinome ou tumeur de la vessie (TV) est le 5ème carcinome le plus répandu aux États-Unis et le 7ème en Europe. Aux États-Unis, 69 250 nouveaux cas de cancer de la vessie ont été diagnostiqués et environ 14 990 décès sont survenus en 2011. Diverses interactions gènes / environnement mènent au développement d'un carcinome de la vessie. Les principaux facteurs de risque du cancer de la vessie sont le tabagisme, l'exposition à des cancérogènes chimiques ou à des radiations, et l'inflammation liée à une infection chronique. Des facteurs environnementaux et génétiques peuvent conjointement avoir un effet sur le développement du cancer de la vessie. La tumeur de vessie non envahissant le muscle (TVNIM) a le plus haut taux de récurrence de tout carcinome. De plus, la progression d'un cancer non invasif de haut grade vers un cancer invasif se produit dans 10 à 20% des cas.

Le carcinome de la vessie est le cancer le plus couteux par patient entre son diagnostic et son décès, en raison de son taux de récurrence de 50% à 80%. Traduire la complexité génétique des cancers urologiques en une gestion personnalisée des patients est un enjeu majeur. Le développement de systèmes intégrés pour la génération et l'interprétation de signatures moléculaires et cellulaires est essentiel pour déterminer la stratégie diagnostique et thérapeutique optimale pour les patients. Ces signatures intègrent non seulement les paramètres des populations de cellules tumorales pour évaluer leur agressivité intrinsèque et leur résistance au traitement, mais aussi les paramètres des populations hôte pour évaluer des processus aussi divers que la stimulation de la réponse à la tumeur, ou la susceptibilité aux effets secondaires des traitements. Le développement d'un programme intégré permettant des analyses multidimensionnelles est également essentiel en termes de recherche translationnelle ou de stratégie biopharmaceutique pour la prise en charge préclinique et clinique en oncurologie. De telles signatures seront également pertinentes dans une application de routine clinique.

II. Introduction générale sur les tumeurs urothéliales

II.1 Epidémiologie et facteurs de risque

Le cancer de la vessie est le deuxième cancer urologique, après celui de la prostate. Le nombre de cas de cancers de la vessie augmente régulièrement. A l'heure actuelle, près de 10 000 nouveaux cas de cancer de la vessie par an en France et 350 000 nouveaux cas sont diagnostiqués dans le monde. Cela représente 3% des décès par cancer en France (1). Ces décès concernent majoritairement les hommes qui en totalisent 75% (2-4), principalement du fait d'un tabagisme et d'une exposition plus élevés aux carcinogènes environnementaux (3, 5, 6).

Un individu a 3,6 % de risque au cours de sa vie de développer une tumeur de vessie (TV). Les carcinogènes environnementaux sont importants à considérer dans la carcinogène urothéliale. Le tabagisme (7) et l'exposition professionnelle aux produits chimiques sont reconnus comme des facteurs de risque. Une étude a récemment montré que le tabac provoquait une hypo méthylation au sein des cellules de l'urothélium provoquant une immortalisation des cellules qui deviennent tumorales (8).

Les amines aromatiques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont deux groupes de substances cancérogènes connues pour induire le cancer de la vessie. Ces facteurs environnementaux peuvent interagir avec des facteurs génétiques pour conférer à un individu un risque accru de cancer de la vessie. La consommation d'alcool, les facteurs alimentaires et l'utilisation de teintures capillaires ont également été suggérés comme facteurs de risque de cancer de la vessie (9-13).

Sa prévalence plus importante dans certaines populations illustre bien la complexité des interactions entre facteurs génétiques et non génétiques dans la compréhension de l'étiopathogénie des carcinomes urothéliaux (14).

L'implication de facteurs de risque génétiques a été récemment confirmée par l'identification de polymorphismes génétiques associés au risque de TV, son initiation ou sa récurrence (15, 16). Ces polymorphismes génétiques peuvent être regroupés selon la fonction des gènes dans lesquels ils sont localisés : gènes du métabolisme, de la carcinogène, de la

réparation de l'ADN, du contrôle du cycle cellulaire, de l'inflammation, de l'apoptose, de la méthylation, ou gènes qui codent pour des protéines G ou des molécules d'adhésion cellulaire.

II.2 Classification

Le cancer de la vessie est provoqué par la multiplication anormale de cellules de la paroi de la vessie. Cette paroi est constituée de plusieurs couches. La grande majorité de ces tumeurs se forme à partir de l'urothélium (épithélium de revêtement des voies excrétrices urinaires) et est détectée avant d'envahir le muscle vésical (détrusor).

On distingue 4 types de tumeurs malignes de la vessie (1):

- * Le carcinome urothélial, représentant 90 % des cas
- * Le carcinome épidermoïde (malpighien), représentant 6 % des cas
- * L'adénocarcinome, représentant 2 % des cas
- * Le carcinome indifférencié, représentant <1 % des cas.

Deux critères anatomo-pathologiques permettent de classifier les TV : le grade et le stade tumoral, et de déterminer le traitement requis.

Les tumeurs de haut grade ont un taux de progression significatif et nécessitent une prise en charge plus agressive. La classification par stade tumoral des TV est présentée dans la Figure 1 ci-dessous.



Figure 1 : Tumeurs de vessie selon le stade tumoral.

Une présentation de la classification par stade selon les recommandations du Tumor, Nodes and Metastasis (TNM) est reportée dans le Tableau 1:

T- Tumeur primitive	
TX	La tumeur primitive ne peut pas être évaluée
T0	Absence de signes de tumeur primitive
Ta	Carcinome papillaire non invasif
Tis	Carcinome <i>in situ</i>
T1	La tumeur envahit le tissu connectif sous-épithélial
T2	La tumeur envahit le muscle
	T2a La tumeur envahit le muscle superficiel (moitié interne)
	T2b La tumeur envahit le muscle profond (moitié externe)
T3	La tumeur envahit le tissu péri-vésical
	T3a Microscopiquement
	T3b Macroscopiquement
T4	La tumeur envahit une de ces structures : stroma prostatique, vésicules séminales, utérus, vagin, paroi pelvienne, paroi abdominale
	T4a La tumeur envahit le stroma prostatique, les vésicules séminales, l'utérus ou le vagin
	T4b La tumeur envahit la paroi pelvienne ou abdominale
N- ganglions lymphatiques régionaux	
Nx	Les ganglions régionaux ne peuvent pas être évalués
N0	Absence de métastase ganglionnaire régionale
N1	Métastase en un ganglion unique pelvien (hypogastrique, obturateur, iliaque externe, pré-sacral)
N2	Métastase dans plusieurs ganglions pelviens (hypogastrique, obturateur, iliaque externe, pré-sacral)
N3	Métastase dans un ou plusieurs ganglions iliaques communs
M- Métastase à distance	
M0	Absence de métastase à distance
	M1a Ganglions lymphatiques non régionaux
	M1b Autres métastases à distance

Tableau 1 : Classification TNM (Tumor, Nodes and Metastasis) 2017 pour le tumeur de vessie (17)

Depuis 2004, la classification par grade tumoral a été revue et distingue les tumeurs de bas grade ou de haut grade (remplaçant l'ancienne classification : G1, G2, G3) (18). Depuis

2016, une nouvelle classification basée uniquement sur les données histologiques est utilisée (voir Tableau 2)

Carcinome urothélial in situ
Carcinome urothélial papillaire de bas grade
Carcinome urothélial papillaire de haut grade
Néoplasie urothélial papillaire de bas
Papillome urothélial
Papillome urothélial inversé
Prolifération urothéliale de potentiel de malignité incertain (hyperplasie)
Dysplasie urothéliale

Tableau 2 : Classification OMS 2016 des lésions urothéliales non infiltrantes (19).

Au moment du diagnostic, environ 70% des tumeurs sont à un stade non infiltrant le muscle vésical TVNIM, contrairement aux 30% restantes qui sont invasives. Ces lésions non infiltrantes se divisent en 75% de lésions pTa et 25% de lésions pT1. Les lésions pTa sont de bon pronostic mais ont tendance à récidiver sur le même mode (taux de récurrence proche dans certains cas de 70%) (20).

II.3 Evaluation du risque de récurrence ou progression des TVNIM

L'évaluation du risque forme la pierre angulaire des choix thérapeutiques. En s'appuyant sur les données de l'European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), Sylvester et al. ont développé des tables prédictives de récurrence et progression (21). Aucune décision thérapeutique n'est actuellement prise à l'aide de marqueurs moléculaires dans la pratique clinique quotidienne, alors qu'il en existe de nombreux. En pratique, la présence d'un haut grade ou d'un bas grade guide la plupart des décisions thérapeutiques pour les tumeurs n'infiltrant pas le muscle (TVNIM).

La méthode standard pour déterminer le risque d'un patient donné consiste à utiliser les facteurs de risque associés à la récurrence ou à la progression qui sont issus d'analyses multivariées de cohorte de patients. L'EORTC a proposé un score pronostique pour les tumeurs de vessie en affectant un certain nombre de points en fonction des signes cliniques et

de l'analyse anatomopathologique (21). Le calcul peut être fait sur un site internet gratuit (<http://www.eortc.be/tools/bladdercalculator/default.htm>).

	Facteur	Récidive	Progression
Nombre de tumeurs	Unique	0	0
	2 à 7	3	3
	>7	6	3
Taille de la tumeur	<3 cm	0	0
	≥ 3 cm	3	3
Récidives	Premier épisode	0	0
	≤ 1 récidive /an	2	2
	> 1 récidive /an	4	2
Stade T	Ta	0	0
	T1	1	4
Carcinome in situ	Absence	0	0
	Présence	1	6
Grade	G1	0	0
	G2	1	0
	G3	2	5
Score total		0-17	0-23

Tableau 3 : Table de l'EORTC pour la prédiction de la récurrence et de la progression des tumeurs de vessie n'envahissant pas le muscle (22).

A partir de ces données, les patients sont habituellement classés (Tableau 3), en fonction à la fois de leur risque de récurrence et de progression, en risque faible (50%), intermédiaire (35%) ou élevé (15%) et, à chaque groupe, correspond une approche thérapeutique différente.

Risque	Caractéristiques tumorales
Faible	Premier diagnostic et Ta et bas grade ou LMP (<i>low malignancy potential</i>) (grade 1) et unique et diamètre < 3 cm
Intermédiaire	Ta bas grade ou LMP (grade 1–2) multifocale et/ou récidivante, T1 bas grade (grade 1–2)
Élevé	Haut grade (grade 3) (quel que soit le stade) ou T1 récidivante ou CIS

Tableau 4 : Caractéristiques des 3 groupes de risque de tumeurs vésicales.

II.4 Traitements

Pour les TVNIM, le traitement initial consiste en une résection trans-urétrale de vessie (RTUV) plus ou moins associée, suivant le risque de récurrence et/ou progression, à une instillation intra vésicale soit par chimiothérapie (Mitomycine C – MMC), soit par immunothérapie (Bacille Calmette Guérin – BCG) (Tableau 5). Le suivi de ces patients est ensuite effectué en suivant l'algorithme décrit dans la Figure 2 ci-dessous. Il est de plus en plus recommandé d'effectuer une instillation post opératoire immédiate (IPOP) d'amétycine pour diminuer le risque de récurrence (22, 23).

Risque faible	Surveillance simple
Risque intermédiaire	Instillations hebdomadaires de mitomycine (MMC) sur 8 semaines consécutives après cicatrisation vésicale (4 à 6 semaines). Le BCG peut être discuté en alternative aux instillations de MMC de première intention ou en cas d'échec du traitement par la mitomycine.
Risque élevé	Instillations endovésicales de BCG (sauf contre-indications) après cicatrisation vésicale (4 à 6 semaines). Si les instillations de BCG sont bien supportées, intérêt d'un traitement d'entretien. En cas d'échec du traitement par BCG, la cystectomie totale demeure le traitement de choix. Après la RTUV, une cystectomie d'emblée peut être discutée en RCP dans certaines formes de mauvais pronostic chez des patients jeunes.

Tableau 5 : Recommandations 2010 en onco-urologie pour la prise en charge des tumeurs urothéliales non infiltrantes en fonction de leur risque de récurrence et/ou progression (24).

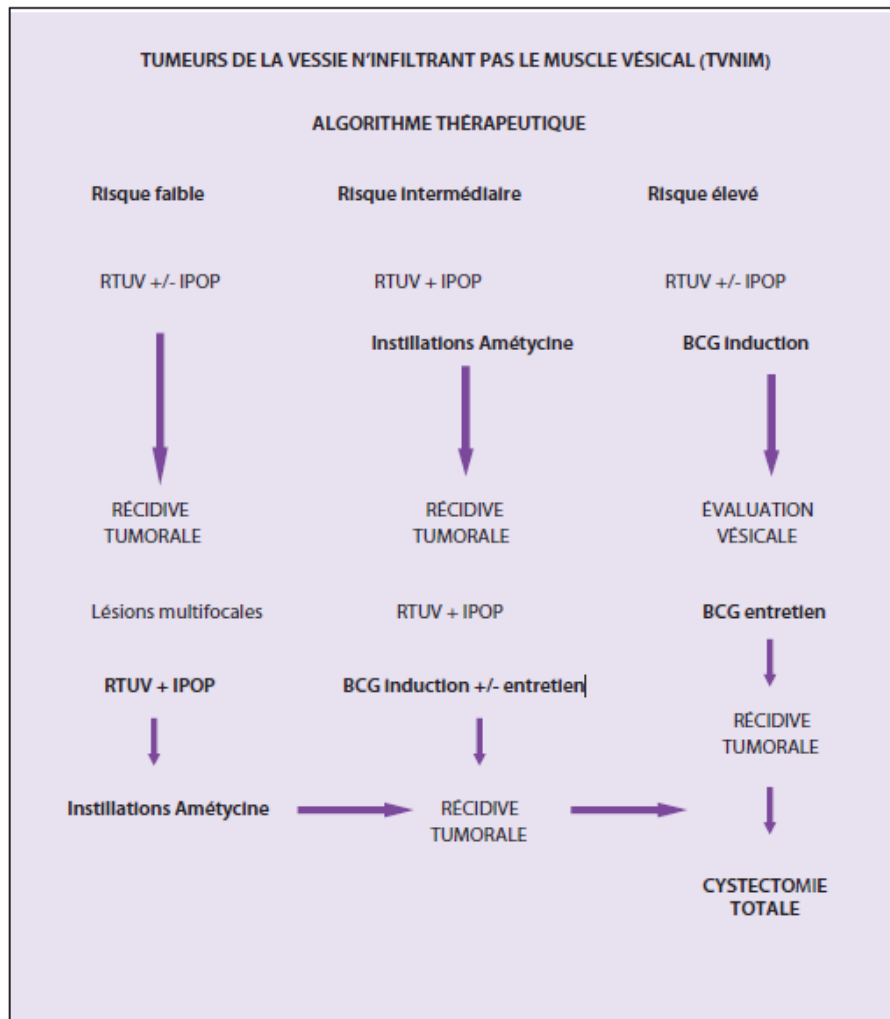


Figure 2 : Algorithme issu des recommandations 2010 en onco-urologie pour le suivi des TVNIM en fonction du risque de récurrence et/ou progression (24).

Pour les tumeurs vésicales infiltrant le muscle (TVIM), la cystectomie demeure le traitement curatif de référence (cystectomie totale à ciel ouvert associée à un curage ilio-obturateur), plus ou moins associée à une chimiothérapie néo adjuvante (24). Lorsqu'une chirurgie radicale est contre-indiquée ou refusée par le patient, différentes alternatives thérapeutiques conservatrices sont possibles, comme la résection de tumeur de vessie seule de façon itérative, la cystectomie partielle, la chimiothérapie, la radiothérapie ou la combinaison de certains de ces traitements (24, 25).

II.5 Suivi des TVNIM

Après résection trans-urétrale éventuellement associée à un traitement adjuvant (immunothérapie ou chimiothérapie endovésicale), l'histoire naturelle des lésions

superficielles est marquée par deux risques : la récurrence et la progression. Ainsi les tumeurs superficielles de vessie nécessitent une surveillance particulièrement vigilante.

Actuellement, utilisées conjointement, la cystoscopie et la cytologie urinaire sont les deux méthodes dites de référence pour le suivi des tumeurs de vessie, selon les recommandations internationales et française (22, 24). Cette surveillance, essentiellement fondée sur le couple cystoscopie–cytologie, est le plus souvent négative, imposant une morbidité inutile au patient.

D'une part, la cystoscopie est dépendante du chirurgien qui la pratique et possède quelques limites techniques et d'interprétation (mauvaise vision liée à une hypertrophie bénigne de prostate ou à un saignement, carcinome in situ difficile à diagnostiquer car difficile à visualiser). D'autre part, si la cystoscopie est un examen performant, il est invasif, parfois mal toléré, peut être source de complications (sténoses de l'urètre ou infections urinaires après cystoscopie évaluées à 4%) (26, 27), et possède un coût propre. Or, chaque patient subit 4 à 8 cystoscopies dans les 2 ans qui suivent la résection d'une tumeur urothéliale superficielle.

Le cytodagnostic urinaire est un complément utile à la cystoscopie mais sa sensibilité pour les tumeurs de faible grade est médiocre et dépendante de l'anatomopathologiste effectuant l'examen (28). En effet, même si la cytologie des urines est un examen très spécifique (niveau de preuve III-2) (29-32), sa sensibilité est très variable, de 35 à 45 %, et son interprétation est clairement dépendante de l'expérience du cytologiste pour en déjouer les pièges : atypies réactionnelles, viroses, atypies post thérapeutiques (29, 30, 32-34).

Si la cytologie urinaire est très spécifique et peu onéreuse, sa sensibilité est médiocre, en particulier, pour les tumeurs de bas grade où elle est le plus souvent négative, avec une sensibilité de l'ordre de 4-29%. Dans les tumeurs de haut grade, la cytologie a une sensibilité plus acceptable de 69-92%, mais n'en fait pas un bon test de surveillance (35, 36).

Le calendrier de suivi est établi en fonction des groupes de risque et de la persistance du facteur de risque qu'est le tabagisme (Tableau 5) :

Risque	Examen de suivi
Faible (EORTC < 7)	Cystoscopie : au 3 ^e et 12 ^e mois puis annuelle pendant 10 ans (à vie si persistance de l'intoxication tabagique).
Intermédiaire (7 < EORTC < 13)	Cystoscopie : au 3 ^e , 6 ^e , 12 ^e mois puis annuelle pendant 15 ans (à vie si persistance de l'intoxication tabagique). Cytologie urinaire : recommandée, couplée à la cystoscopie Uro-TDM : tous les 2 ans et en cas de cytologie positive ou de symptôme en faveur d'une atteinte du haut appareil.
Élevé (EORTC > 14)	Cystoscopie : au 3 ^e , 6 ^e , 9 ^e , 12 ^e mois, puis tous les 6 mois la 2 ^e année, puis annuelle à vie. Cytologie urinaire : 3 ^e , 6 ^e , 9 ^e , 12 ^e mois, puis tous les 6 mois la 2 ^e année, puis annuelle à vie. Uro-TDM : tous les 2 ans ou si cytologie positive ou de symptôme en faveur d'une atteinte du haut appareil.

Tableau 6 : Calendrier de suivi des TVINM en fonction des groupes de risque

II.6 Traitement et suivi des TVIM

La tomodensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique peuvent être utilisées pour la stadification des TV, bien que la TDM soit préférée pour l'évaluation d'une extension pulmonaire. La cystectomie radicale ouverte avec une dissection étendue des ganglions lymphatiques (LND) reste le traitement de choix pour les échecs thérapeutiques dans les TVNIM et T2-T4aN0M0. Cependant, pour les patients bien informés, bien choisis et conformes, un traitement multimodal peut être proposé comme alternative, surtout si la cystectomie n'est pas une option. Le critère de comorbidité, et non celui de l'âge, doit être utilisée pour décider de la cystectomie radicale. Les patients doivent être encouragés à participer activement au processus de prise de décision, et un détournement urinaire du continent devrait être offert à tous les patients, à moins qu'il n'y ait des contre-indications spécifiques. Pour les patients en bonne santé, la chimiothérapie néoadjuvante à base de cisplatine doit toujours être discutée car elle améliore la survie globale. Pour les patients atteints d'une maladie métastatique, une chimiothérapie combinée contenant du cisplatine est

recommandée. Pour les patients inaptes, une chimiothérapie combinée au carboplatine ou des agents uniques peuvent être utilisés (25, 37).

II.7 Tumeurs urothéliales de la voie excrétrice supérieure (TVES)

Les tumeurs urothéliales de la voie excrétrice supérieure (TVES) sont rares et ne représentent que 5 à 10% des carcinomes urothéliaux (38), avec une incidence annuelle estimée dans les pays occidentaux de ~ 2 cas par 100 000 habitants. Les tumeurs pyélocalicyelles sont environ deux fois plus fréquentes que les tumeurs urétérales. Dans 17% des cas, un cancer de la vessie concomitant est présent (39). La récurrence dans la vessie se produit dans 22-47% des patients TVES (40), comparativement à 2-6% dans le tractus supérieur controlatéral (41). Soixante pour cent des TVES sont invasives au diagnostic, contre 15 à 25% des tumeurs de la vessie (42). Les TVES ont un pic d'incidence chez les personnes âgées de 70 à 90 ans et sont trois fois plus fréquentes chez les hommes.

Jusqu'en 2004, le classement de 1973 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) était le plus souvent utilisé, distingue seulement trois grades (G1-G3) (43). La récente classification OMS de 2004 considère des données histologiques permettant de distinguer les tumeurs non invasives: néoplasie papillaire urothéliale à faible potentiel de malignité, carcinomes de bas grade ou de haut grade.

Les TVES qui envahissent la paroi musculaire ont généralement un mauvais pronostic. Le taux de survie à 5 ans est <50% pour pT2 / pT3 et <10% pour pT4 (44).

La prise en charge conservatrice du TVES peut être discutée dans les cas à faible risque lorsque le rein controlatéral est fonctionnel. La chirurgie conservatrice rénale pour TVES à faible risque permet d'épargner la morbidité associée à la chirurgie radicale ouverte, sans compromettre les résultats oncologiques et la fonction rénale (45). En outre, il peut également être considéré dans tous les cas impératifs (c'est-à-dire, insuffisance rénale ou rein fonctionnel solitaire). Cette prise en charge se réalise par urétéroscopie souple et vaporisation des lésions à l'aide d'un laser, ou peut être réalisée par résection segmentaire de l'uretère.

La néphro-urétérectomie radicale par voie ouverte avec excision de la coiffe vésicale est la norme pour les TVES à haut risque, indépendamment de l'emplacement de la tumeur. Une alternative est la néphro-urétérectomie par voie coelioscopique (46).

Le suivi des traitements conservateurs est rapproché et se réalise par nouvelle urétéroscopie tous les 3 à 6 mois et bilan radiologique par uro-scanner ou uro-IRM. Le suivi après traitement radical comporte un suivi radiologique par uro-scanner ou uro-IRM annuel. Dans tous les cas, un suivi de la fonction rénale et un suivi endoscopique de

II.8 Nouvelle taxonomie des cancers urothéliaux : sous-types basal et luminal

Les cancers urothéliaux de la vessie sont hétérogènes du point de vue moléculaire et, pour ce qui concernent les stades avancés (pT2 et supérieur) ont des résultats cliniques et des réponses à la chimiothérapie conventionnelle très variables. Quatre profils taxonomiques ont été établis, ces dernières années, par différents groupes d'étude : University of Northern California, University of Texas MD Anderson Cancer Center, The Cancer Genome Atlas (TCGA), et Lund University (Figure 3).

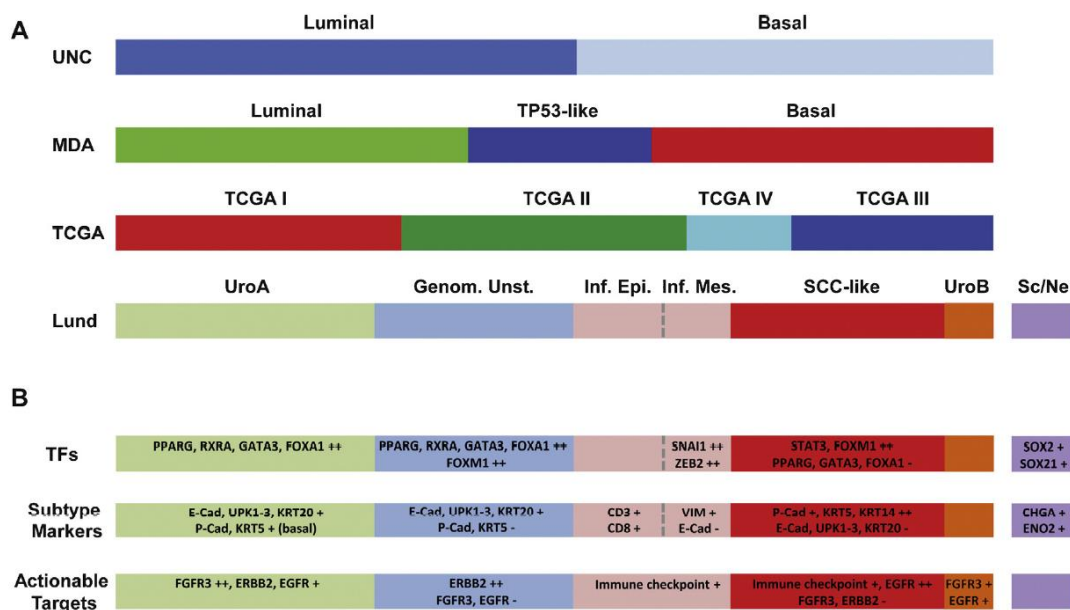


Figure 3 : Classifications de sous-groupes moléculaires du cancer de la vessie obtenues par 4 équipes différentes (UNC : University of Northern California, MDA : University of Texas MD Anderson Cancer Center, TCGA: The Cancer Genome Atlas, Lund: Lund University, Sweden) (A), et les gènes différentiellement exprimés pour chacun (B). D'après Aine et al. (47).

Pour obtenir ces taxonomies, les équipes ont comparé les profils des séquences génomiques obtenus par séquençage tout exome ou tout génome de nouvelle génération, les altérations chromosomiques de type copy number variation (CNV), les taux d'expression des ARNm, des micro-ARN et protéiques. Des groupements différents sur le plan de la nomenclature et différents sous-groupes ont été établis. Il existe toutefois une constante, c'est-à-dire la subdivision des tumeurs de vessie en type luminal et basal, qui rappelle précisément la subdivision identifiée pour le cancer du sein.

Les TVIM de type basal partagent des biomarqueurs avec les cancers du sein basaux, sont caractérisés par l'activation de p63, une différenciation squameuse et une maladie plus agressive à la présentation. Les TVIM de subtype luminal contiennent des caractéristiques de la transcription active des récepteurs PPAR γ et des récepteurs des estrogènes (ER), sont enrichies en mutations activatrices du gène FGFR3, et ont potentiellement une sensibilité aux inhibiteurs de FGFR. La nomenclature établie par le MD Anderson Cancer Center comporte un troisième sous-type : les TVIM de type p53 qui sont constamment résistants à la chimiothérapie néoadjuvante MVAC, et dont toutes les tumeurs chimiorésistantes adoptent un phénotype de type p53 après le traitement (48).

Ces deux groupes présentent cliniquement une différence significative en termes d'agressivité et de réponse au traitement chimiothérapique (49, 50). Les cancers infiltrants la musculature (TVIM) montrent une agressivité plus marquée et une survie plus courte s'ils sont de type luminal (48). Le type basal, à l'inverse, est associé à une meilleure réponse à la chimiothérapie par cisplatine et semble montrer une meilleure réponse à la chimiothérapie néoadjuvante (49).

Une toute nouvelle classification moléculaire des carcinomes urothéliaux vient d'être établie et publiée par le groupe du TCGA (The Cancer Genome Atlas). En effet, en 2014, dans le cadre de ce vaste projet, les résultats de l'analyse moléculaire de 131 tumeurs urothéliales envahissant la musculature TVIM ont été publiés permettant d'identifier 4 sous-groupes (Figure 3) (51). En Octobre 2017, une nouvelle version de classification, établie à partir de l'analyse de 412 TVIM, a permis d'identifier finalement 5 sous-groupes : 3 de type luminal, 1 basal et 1 neuronal (Figure 4) (52). Ces sous-groupes respectent la distinction luminal/basal, sont caractérisés par des altérations moléculaires et histologiques spécifiques et pourraient bénéficier d'approches thérapeutiques distinctes (Figure 4).

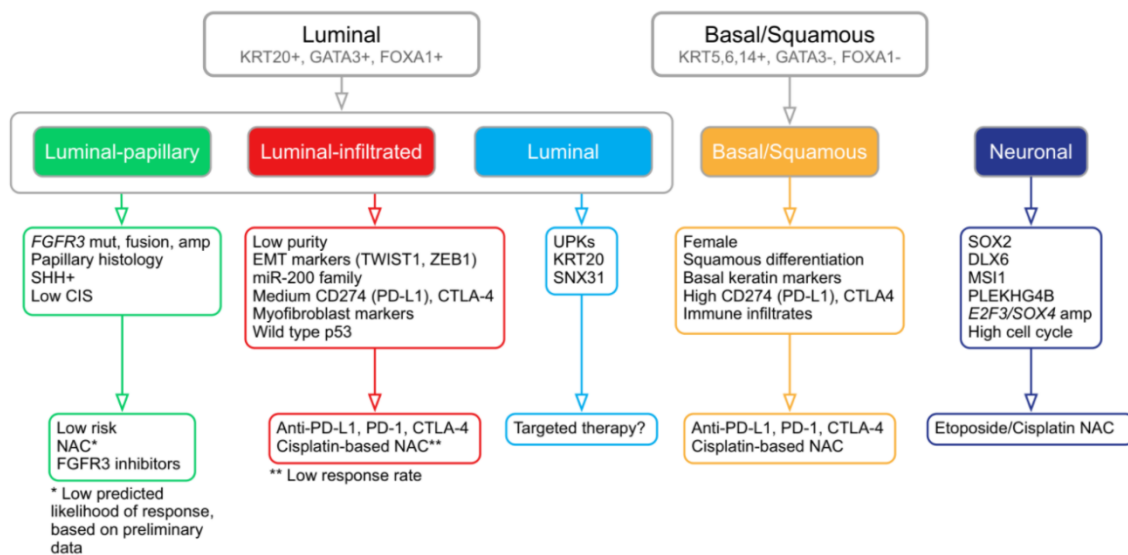


Figure 4 : Description des 5 sous-types moléculaires établies par le TCGA, leurs altérations spécifiques et l'approche thérapeutique envisageable pour chacun. D'après Robertson et al (52).

II.9 Mutations géniques somatiques

Deux voies majeures existent dans la cancérogenèse vésicale : l'une pour les tumeurs infiltrantes ou de haut grade caractérisée par l'altération du gène suppresseur de tumeur TP53 et l'autre pour les tumeurs non infiltrantes ou de bas grade impliquant des mutations du gène FGFR3 (53-56). Ainsi, les mutations de TP53 se produisent à la première étape de la voie du CIS, alors qu'elles se feraient beaucoup plus tard dans la voie Ta, ou T1G3 ou pour les TVIM.

II.9.1 TP53

Le gène codant la protéine p53 est localisé sur le chromosome 17, de même que les gènes BRCA1 et 2.

Ce gène TP53 code pour une phosphoprotéine nucléaire de masse moléculaire 53 KDa. La protéine p53 de type sauvage est présente dans une grande variété de cellules normales, mais la protéine a une demi-vie très courte et n'est donc présente qu'en petite quantité, généralement en dessous du niveau de détection des méthodes

immunohistochimiques. La mutation somatique du gène TP53 est un événement très fréquent dans le développement des cancers humains, et parce que, les protéines p53 mutantes sont souvent beaucoup plus stables que la protéine p53 de type sauvage, la protéine p53 mutante s'accumule à un niveau élevé. A titre d'exemple, l'accumulation de la protéine p53 a été observée dans 76% des 212 lésions malignes humaines, y compris dans le carcinome à cellules transitionnelles de la vessie (57).

La protéine p53 de type sauvage fonctionne comme un facteur de transcription, c'est-à-dire comme un modulateur qui peut activer ou désactiver des gènes cruciaux. Il inhibe également la réplication de l'ADN et est une molécule de contrôle de la progression du cycle cellulaire. En outre, la protéine p53 est impliquée dans la régulation de l'apoptose. Dans les tests de transfection, le gène TP53 de type sauvage se comporte comme un suppresseur de tumeur, tandis que celui muté se comporte comme un oncogène transformant dominant (58).

Ce gène a été rapporté comme inactivé dans 76% des TVIM (56).

II.9.2 FGFR3

Le gène FGFR3 est localisé sur le bras court du chromosome 4, et comprend 19 exons. Il appartient à une famille de récepteurs à tyrosine kinase (comprenant également FGFR1 et 2). L'épissage alternatif de l'Acide Ribonucléique messager (ARNm) correspondant génère différentes isoformes (FGFR3b et FGFR3c), dont l'expression varie selon les tissus. Ils sont impliqués dans la voie de signalisation régulant la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration cellulaire et l'angiogenèse. Ces récepteurs sont des glycoprotéines composées de trois domaines extracellulaires « immunoglobulin-like », d'un domaine hydrophobe permettant son ancrage dans la membrane cellulaire et d'un domaine tyrosine kinase intra cytoplasmique (59). Les domaines extracellulaires interagissent avec les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF). La fixation de ces derniers sur les domaines extracellulaires induit la dimérisation de FGFR3 puis l'autophosphorylation de son domaine tyrosine kinase qui sera ainsi activé (59).

Selon l'étude de Neuzillet et al. (54), il existe deux voies différentes de la progression tumorale dans le cancer de la vessie : la voie du CIS, dans laquelle les mutations de FGFR3 sont rares, et la voie Ta, dans lequel les mutations de FGFR3 sont fréquentes (Figure 5).

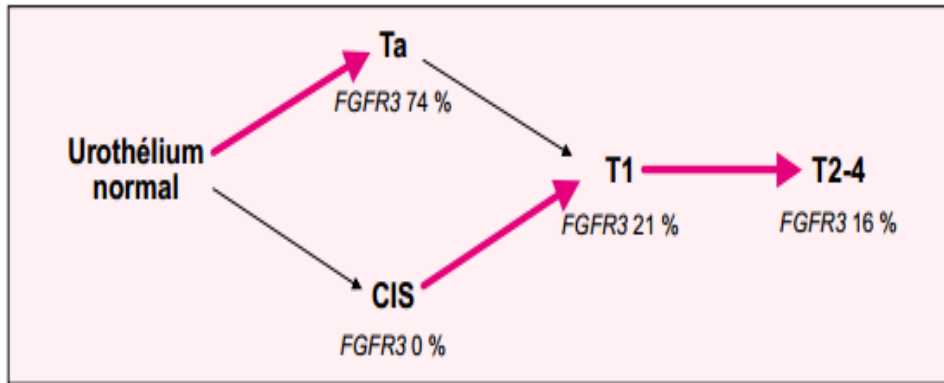


Figure 5 : Mutations de FGFR3 et progression tumorale dans les tumeurs urothéliales, d'après Bakkar et Radvanyi (53).

Les mutations de FGFR3 représentent la première anomalie moléculaire spécifique de la voie des tumeurs Ta de faible grade. Les tumeurs porteuses d'une mutation FGFR3 récidivent fréquemment, mais progressent très rarement vers des tumeurs invasives (53-56, 59, 60). Une mutation du gène FGFR3 était retrouvée selon les études dans 60 à 70% des tumeurs de vessie superficielles (Ta, T1) et/ou peu agressives (G1, G2) (61, 62). Dix mutations de FGFR3 différentes ont été décrites, mais 4 d'entre elles (R248C, S249C, G372C, et Y375C) peuvent expliquer 95% des cas (63).

La recherche des mutations du gène FGFR3 était initialement réalisée par un séquençage du gène. Depuis, Van Oers et al. (2005) ont décrit la technique du SNaPshot, méthode simple, permettant de rechercher les mutations ponctuelles les plus fréquentes de ce gène, situées sur les exons 7, 10 et 15 (Hotspot de mutations) (64).

II.9.3 STAG2

STAG2 est un gène, localisé en Xq25, impliqué dans le processus de la cohésion et de la ségrégation des chromatides sœurs (65).

La protéine codée par ce gène est une sous-unité du complexe cohésine, qui régule la séparation des chromatides sœurs pendant la division cellulaire. L'inactivation ciblée de ce gène conduit à des défauts de cohésion des chromatides et à l'aneuploïdie, ce qui suggère que la perturbation génétique du complexe cohésine est une cause de l'aneuploïdie dans le cancer humain.

Le complexe cohésine est une structure multi-protéine qui est requise pour la cohésion des chromatides sœurs après la réplication de l'ADN et peut être impliquée dans l'assemblage du fuseau mitotique. Il existe plusieurs variantes de ce complexe, toutes composées d'un hétérodimère constitué d'une des isoformes a ou b de SMC1 (Structural Maintenance of Chromosomes), et de SMC3, d'une protéine de liaison appelée RAD21 et d'une protéine de liaison supplémentaire. Selon le complexe, la protéine supplémentaire peut être SA-1, SA-2 ou SA-3 (Figure 6). La protéine SA-2, également connue sous le nom de STAG2, comporte 1231 acides aminés et interagit directement avec RAD21. Localisée dans le noyau, STAG2 s'associe à la chromatine et, après phosphorylation, se dissocie de la chromatine pour permettre la formation correcte des chromosomes pendant l'anaphase. STAG2 est capable d'améliorer l'activité du facteur de nécrose tumorale TNF alpha et peut également jouer le rôle de régulateur transcriptionnel (66, 67).

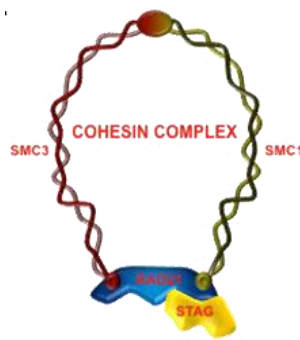


Figure 6 : Schéma représentant le complexe cohésine (d'après <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/CohesinsID20100.html>).

De fréquentes altérations du gène STAG2 (mutations, délétions et hyperméthylation du promoteur de ce gène) ont été observées dans des tumeurs de vessie, notamment de mauvais pronostic (68, 69).

II.9.4 Profil mutationnel global des tumeurs de vessie selon le TCGA

L'analyse de séquençage tout exome de 412 tumeurs réalisée par le TCGA a permis de différencier 4 clusters de tumeurs selon leur profil de mutations qui se distinguent principalement par la présence ou la fréquence de signatures mutationnelles de type APOBEC-a, APOBEC-c, ERCC2 ou transition C>T (Figure 4) (52). Pour tous les clusters, la

mutation du gène codant pour la protéine p53 reste la plus fréquente et est retrouvée dans 49% de l'ensemble des tumeurs (56).

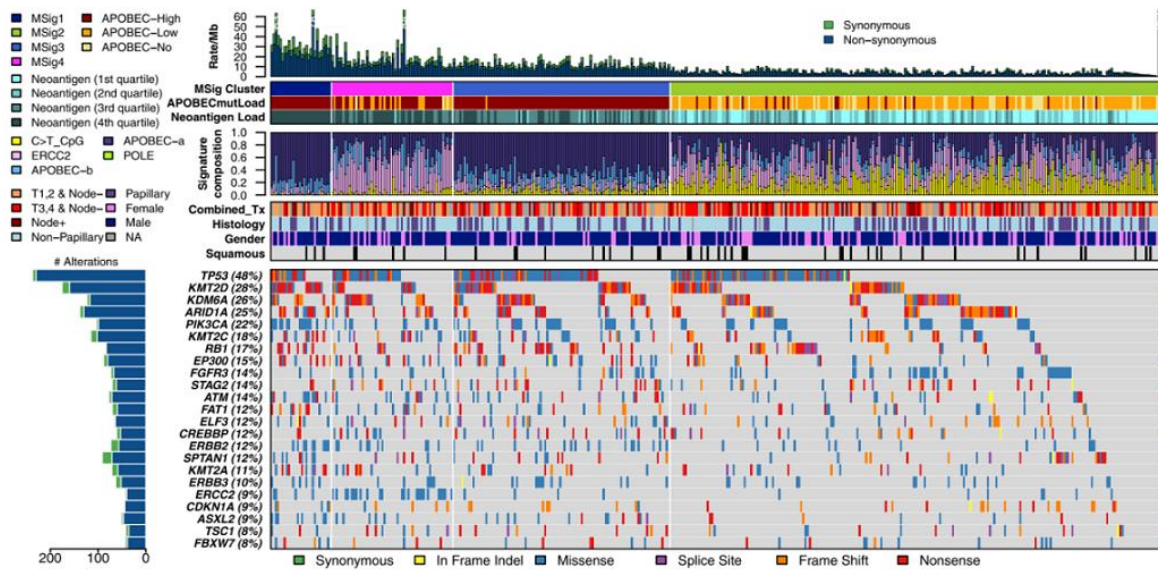


Figure 4 : Fréquence et type des mutations observées dans 412 tumeurs de vessie (52).

II.10 Altérations chromosomiques du carcinome urothélial selon les données du TCGA

De la même façon, l'analyse en CGH (Comparative Genomic Hybridization) sur puce ADN de ces 412 tumeurs a permis d'identifier les altérations chromosomiques retrouvées le plus fréquemment dans l'ensemble des tumeurs urothéliales (Figure 5) et dans chacun des 4 clusters au profil mutationnel différent (Figure 6).

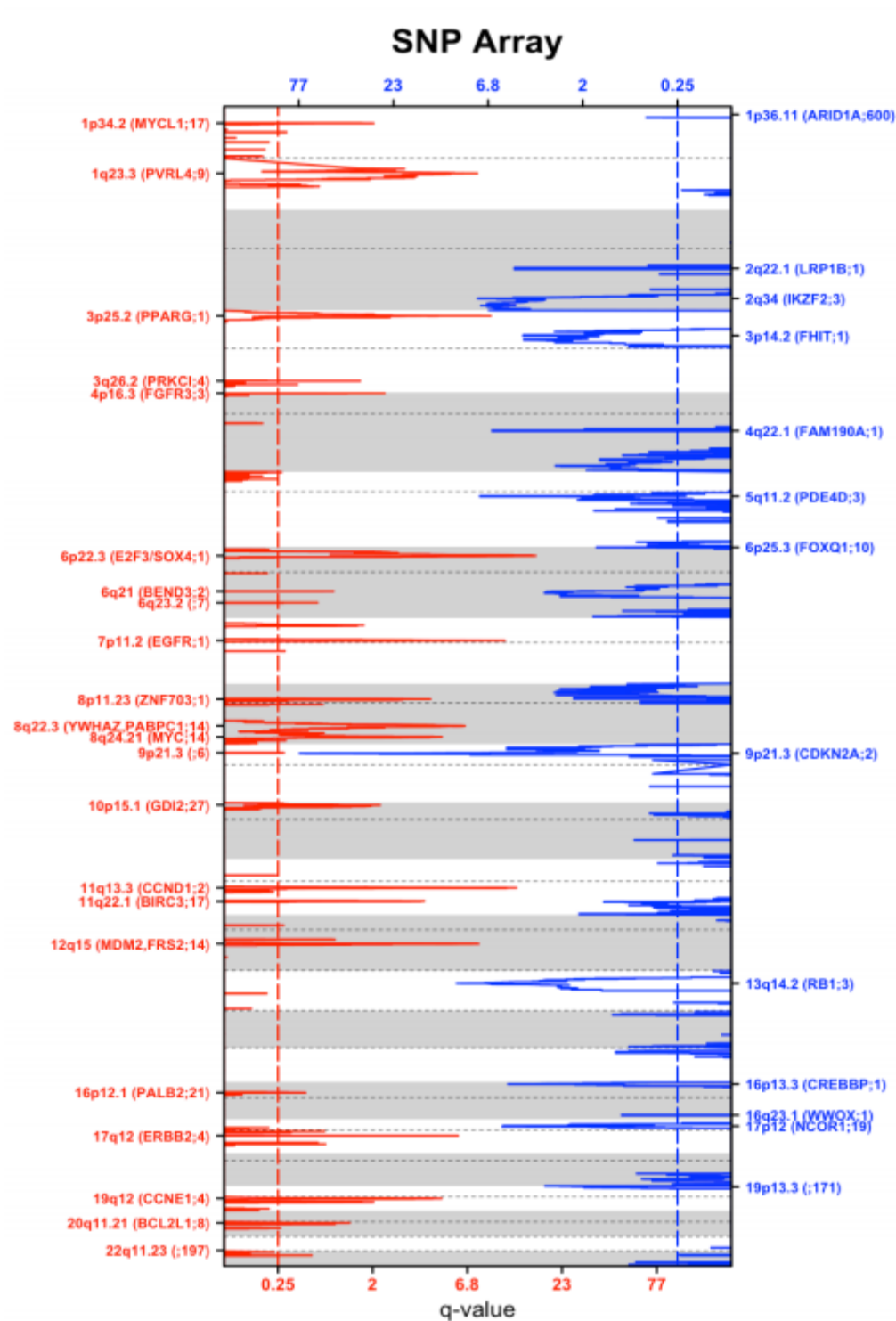


Figure 5 : Distribution des altérations chromosomiques (gains en rouge et pertes en bleu), les plus fréquemment observées dans les tumeurs urothéliales par analyse en CGH sur puce ADN dans le cadre du projet TCGA (51).

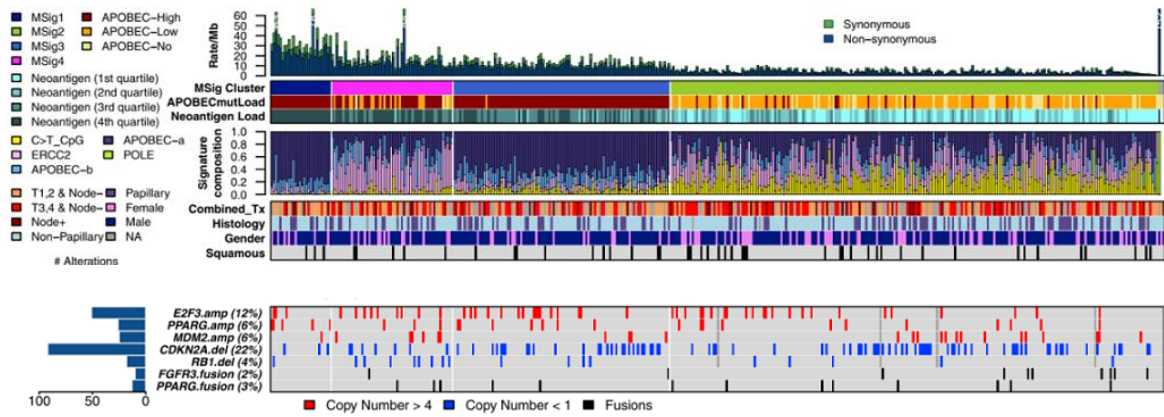


Figure 6 : Distribution des altérations chromosomiques les plus fréquentes dans les 4 différents clusters de profil mutationnel identifiés par le TCGA par l'analyse de 412 tumeurs de vessie (51).

Concernant ces altérations chromosomiques observées dans les tumeurs de vessie, certaines ont pu être corrélées à des variables cliniques. Une sélection de ces corrélations entre perte ou gain chromosomique et variable clinique significatives est montrée dans le Tableau 7.

2p	gain	associé à	Nombre de métastase ganglionnaire
3p	gain	associé à	Nombre de métastase ganglionnaire
3p	gain	associé à	Présence de métastase ganglionnaire & Nombre de métastase ganglionnaire
10q	gain	associé à	Présence de métastase ganglionnaire
4p	loss	associé à	Présence de métastase ganglionnaire & Ethnie
6q	loss	associé à	Nombre de métastase ganglionnaire
8q	loss	associé à	Stade T tumoral
21q	loss	associé à	Présence de métastase ganglionnaire

Tableau 7 : Associations significatives entre 8 altérations chromosomiques (perte et gain) et des caractéristiques cliniques (70).

Ces données, librement disponibles (70) sont extraites de la dernière version de l'étude TCGA (52), et concernent les altérations chromosomiques les plus fréquentes et plus significatives observées pour le cancer de la vessie.

Ainsi, la différenciation génétique et moléculaire du cancer de la vessie montre donc que la classification histologique binaire « haut grade » - « bas grade » ne correspond pas à des sous types cliniquement significatifs, associés à des pronostics différents et à des réponses aux traitements différentes.

III. Analyse moléculaire des altérations chromosomiques et mutations du carcinome urothélial

III.1 Introduction

Les tumeurs superficielles de la vessie avec des grades élevés ou des stades pT1 nécessitent une surveillance active, étroite, en raison de leur risque significatif de récurrence et de progression vers un stade invasif. A partir des résultats obtenus à l'aide de marqueurs d'ADN, il a été reconnu que les mutations du gène FGFR3 étaient plus associées au TVNIM de bas grade et pTa, alors que la présence de nombreuses altérations chromosomiques (CNV) étaient associées à des tumeurs génétiquement instables, de stade élevé ou pT1 / pTis.

Dans l'absolu, un test urinaire très spécifique, très sensible et peu onéreux (10 euros environ) pourrait idéalement se substituer au couple cystoscopie et cytologie des urines (60 euros environ). Ce test pourrait être basé sur des altérations génétiques identifiées dans les tumeurs de vessie. Des tests urinaires ont été développés, basés sur les anomalies découvertes au niveau des tumeurs, mais ces tests commercialisés (*BTA Trak*, *NMP 22*, *Accu-Dx*, *uCyt+*, *Urovysion*), à l'heure actuelle, ne sont pas utilisés en pratique clinique de routine.

Une caractéristique commune à de nombreuses tumeurs est de présenter des anomalies chromosomiques (déséquilibres alléliques) qui peuvent être révélées par l'étude de marqueurs polymorphes de l'ADN. Cette particularité du génome tumoral a été mise à profit dans les tumeurs de vessie pour détecter des cellules tumorales en étudiant l'ADN extrait des urines de patients à l'aide de marqueurs microsatellites (71). Depuis, plusieurs équipes ont rapporté des résultats utilisant cette technique pour le diagnostic (72, 73) ou le suivi de ces tumeurs (65). Il apparaît donc dès maintenant que l'examen de l'ADN urinaire présente un intérêt majeur pour le suivi des patients au décours d'une résection trans-urétrale d'un carcinome superficiel de la vessie. La sensibilité et la spécificité de ce test apparaissent meilleures que celles de la cystoscopie urinaire et du BTA TRAK test (74, 75).

L'objectif est de dépister une lésion urothéliale asymptomatique dans une population cible d'une part, et de simplifier les modalités de surveillance des patients porteurs de tumeurs de vessie déjà connues et traitées en réduisant les indications de l'endoscopie d'autre part (28, 65, 71, 76, 77). Il serait donc souhaitable de pouvoir détecter un cancer urothélial à partir des

urines d'un patient avec une grande sensibilité, puis éventuellement d'apporter des informations complémentaires sur la nature du cancer et son agressivité. L'identification de lésions cytogénétiques au sein d'un urothélium optiquement normal, après exérèse de la tumeur primitive pourrait être un critère intéressant de sélection des patients qui pourraient bénéficier d'instillations vésicales.

Une puce intitulée BCA-1 a été développée, dans cette optique, par notre équipe en collaboration avec la société ArrayGenomics (Voisins Le Bretonneux, France). Les anomalies les plus pertinentes ont été sélectionnées et une puce à ADN d'hybridation génomique comparative (CGH) a été développée comprenant 341 clones (BACs ou chromosomes artificiels bactériens) répartis sur des régions chromosomiques d'intérêt (78, 79). La validité de ce test a été confirmée sur 10 lignées cellulaires tumorales et bénignes. Un travail a ensuite consisté à étudier la valeur ajoutée de cette puce en pratique clinique. Pour ce faire, une cohorte de 163 patients porteurs de tumeurs urothéliales et de témoins a été constituée. Les urines ont été prélevées et analysées en utilisant la puce BCA-1. Une base de données a été développée sous Filemaker pro® afin de permettre une saisie uniforme et détaillée des données cliniques et de prendre en considération le caractère complexe de la prise en charge de ces tumeurs. Le test urinaire utilisant la puce CGH a montré une excellente performance diagnostique avec une sensibilité de 95% et une spécificité de 86% dans les tumeurs vésicales. Enfin, le test a aussi permis d'identifier un panel d'aberrations génomiques permettant d'identifier le grade de la tumeur avec une sensibilité et une spécificité de 86 et 88%, respectivement (79).

Suite à cette étude, une nouvelle puce a été créée. En effet la première puce BCA-1 était constituée de BACs. Cette nouvelle puce couvre les mêmes régions chromosomiques mais elle n'est plus constituée de BACs, mais d'oligonucléotides (60000 sondes de 50-60 paires de bases). Il suffit donc d'extraire entre 150 et 500 ng d'ADN par urine pour pouvoir utiliser cette puce, alors que l'ancienne puce nécessitait de 2-4 µg d'ADN. Grâce à une technique de co-hybridation d'un ADN à tester et d'un ADN témoin marqués par deux fluorochromes différents, il est mis en évidence la perte ou le gain d'ADN (78).

De même, cette puce pourrait éventuellement être utilisée après la résection initiale pour l'identification des patients nécessitant une résection de « second look », pour moduler la surveillance, et pour identifier les patients les plus à risque de progression.

Dans notre étude, nous avons recherché, d'une part, si des altérations chromosomiques étaient spécifiquement associés à des stades tumoraux à partir d'ADN extrait de tissus congelés, d'autre part, évalué la valeur prédictive des mutations du gène FGFR3 et du test BCA-oligo à partir d'ADN extrait d'urines.

III.2 Analyse moléculaire des altérations chromosomiques par puce CGH BCA-Oligo sur tissu tumoral congelé

III.2.1 Patients et Méthodes

A partir de la base de la tumorothèque, nous avons sélectionné rétrospectivement 54 tumeurs solides de patients présentant un carcinome urothélial de la vessie ou du haut appareil, opéré par résection transurétrale, cystectomie ou néphrectomie. Chaque patient a eu une fiche d'information et de consentement à compléter, dater et signer, qui a été archivée au sein du CeRePP.

Nous avons recueilli 16 carcinomes urothéliaux pTa, 20 pT1 et 18 pT2, dont 6 pTa, 6 pT1 et 5 pT2 étaient des tumeurs de la voie excrétrice supérieure (tumeur du haut appareil).

III.2.2 Extraction d'ADN à partir de tissus congelés

Environ 10 mg de tissus congelés étaient placés dans un tube eppendorf. L'extraction de l'ADN a été réalisée au moyen du kit QIAamp DNA Mini kit (Qiagen). Le protocole d'extraction comporte plusieurs étapes :

- Lyse cellulaire : 200µl PBS, 20µl de protéase (pour la digestion des protéines) et 200µl de tampon de lyse sont ajoutés au fragment de tissu. Le mélange est laissé au moins une nuit et jusqu'à la lyse complète à 56 °C au bain marie sous agitation.
- Précipitation et fixation de l'ADN : 200µl d'éthanol (100%) sont ajoutés pour faire précipiter l'ADN puis l'ensemble est mélangé au vortex 15s. Après une courte centrifugation, le mélange contenant l'ADN est transféré sur la colonne d'extraction. La colonne est centrifugée à 8000 rpm pendant 1 min pour fixation de l'ADN.
- Lavage : Après élimination de l'éluat, 500µl d'AW1 sont ajoutés, et la colonne est centrifugée de nouveau à 8000 rpm pendant 1 min. De nouveau, on élimine l'éluat et 500µl

d'AW2 sont ajoutés. La colonne est ensuite centrifugée à 14 000 rpm pendant 3 min et l'éluât est éliminé.

- Elution de l'ADN : 100µl de tampon AE sont ajoutés à la colonne, puis après 5 min à température ambiante, elle est centrifugée à 8000 rpm pendant 1min. Ce dernier éluât contient l'ADN tissulaire décroché.

III.2.3 Test BCA-oligo

Avant de réaliser le test BCA-oligo, la quantité et la qualité de l'ADN étaient vérifiées. D'une part, l'ADN était quantifié par fluorimètre, en utilisant le système Qbit (Life Technologies Invitrogen) pour vérifier que les 200 ng nécessaires pour réaliser le test étaient disponibles. D'autre part, 1 µL d'ADN était déposé sur un NanoDrop pour vérifier que le profil obtenu était correct. Seuls les échantillons de quantité et qualité suffisantes pouvaient être utilisés pour l'analyse avec la puce ADN. L'étape suivante consistait en un marquage des ADNs testé et de référence qui allaient être hybridés ensemble sur la puce CGH. Le marquage était réalisé à l'aide du kit BioPrime (Life Technologies Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur, l'ADN testé était marqué en Cy5 et l'ADN de référence était marqué en Cy3. Suivaient alors deux purifications, la première sur colonne avec le kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel), la deuxième sur une colonne Purelink® (Life Technologies).

L'ADN testé et l'ADN de référence étaient mélangés, puis on ajoutait de l'ADN répété COT-1 (1 mg/ml), pour bloquer les hybridations non spécifiques, du Agilent 10X Blocking Agent et du tampon d'hybridation (Agilent 2X Hybridation Buffer). Ce mélange était ensuite incubé 3 minutes à 95°C, puis 30 minutes à 37°C. Le mélange était déposé entre lame et lamelle sur la puce BAC-oligo pour une hybridation de 16 heures à 65°C. La puce était ensuite lavée avec une solution de lavage (Wash Buffer, Agilent), puis séchée.

Les puces étaient scannées au laser à 532 et 635 nm en utilisant un Hi-scanner Agilent. Les images numérisées étaient analysées en utilisant le logiciel WorkBench (Agilent) et l'affichage graphique des données était générée à l'aide de ce même logiciel. La médiane log2 valeur normalisée de fluorescence était calculée pour chaque sonde. Une sonde était considérée comme délétée ou amplifiée si son ratio moyen Log2 normalisé était inférieur ou supérieur à -0,2 ou 0,2, respectivement. Un fragment chromosomique était considéré comme

amplifié ou délété pour l'analyse si au moins 6 sondes successives étaient interprétées comme gagnées ou perdues sur ce fragment.

III.2.4 Résultats

Une relation directe entre nombre et type de CNV (gain/perte) et le stade tumoral a été établie ($p < 0.001$), notamment, un nombre plus élevé de gains correspondait à un stade tumoral plus avancé (Figure 7).

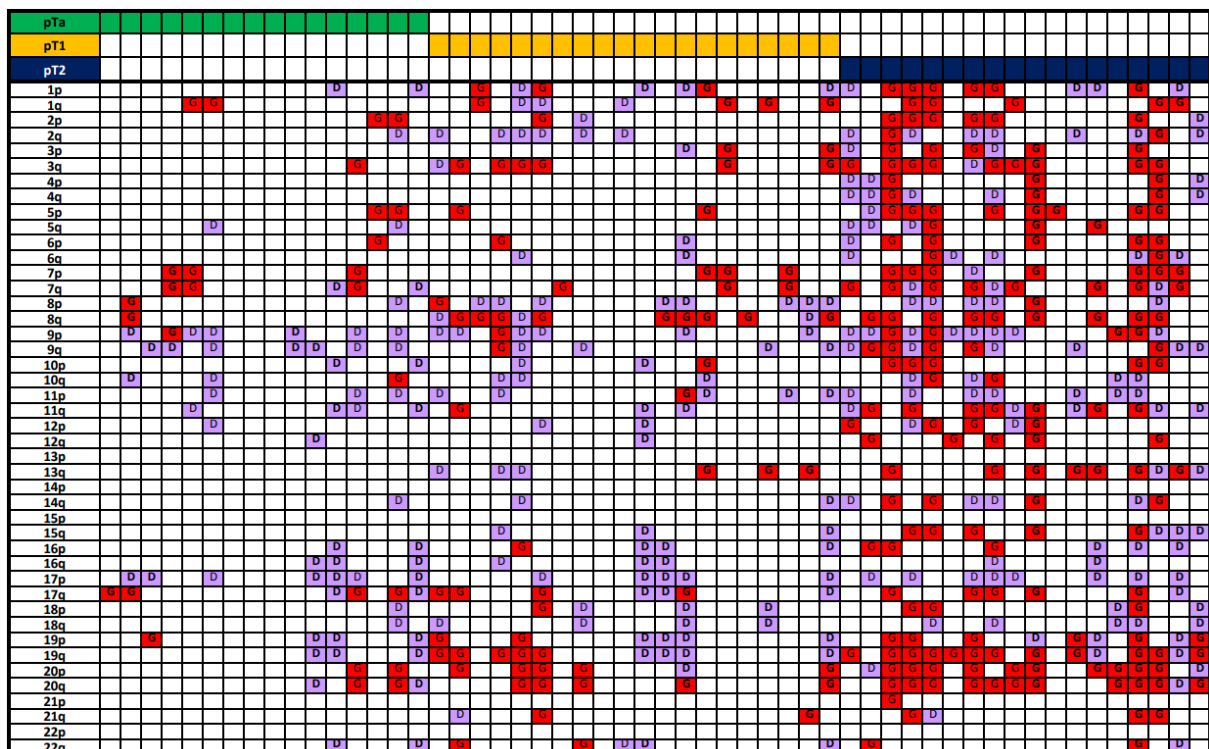


Figure 7 : Répartition des CNVs (G : gain et D : délétion) dans les différentes tumeurs en fonction du stade tumoral.

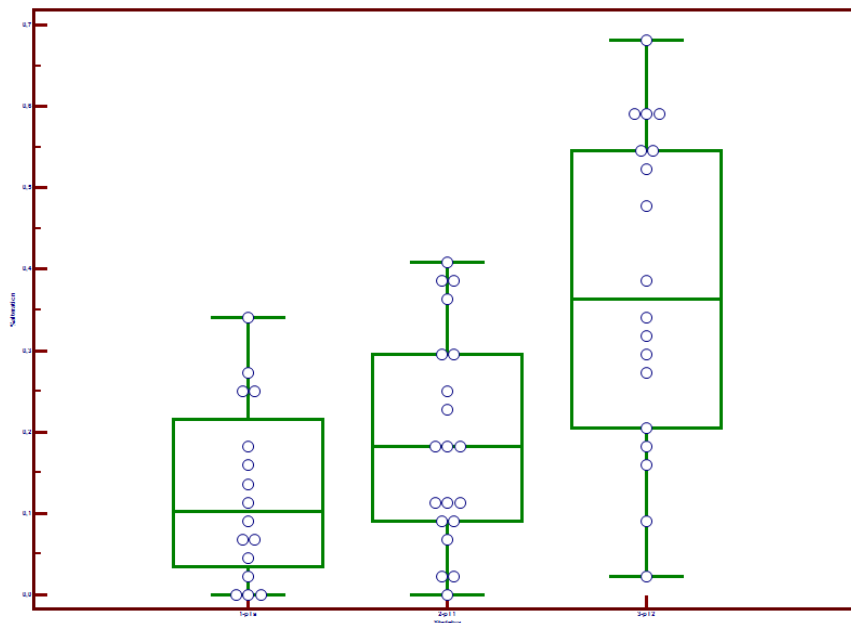


Figure 8 : Analyse de la variance (ANOVA) entre les fréquences des mutations des stades pTa (gauche), pT1 (milieu) et pT2 (droite)

Les fréquences cumulatives par stade tumoral montrent que les altérations chromosomiques de type gain sont majoritairement situées en 3q, 8q, 19q, 20p, et 20q (Figure 9), et que les pertes chromosomiques sont plus souvent localisées en 9p, 9q, 11p et 17p (Figure 10).

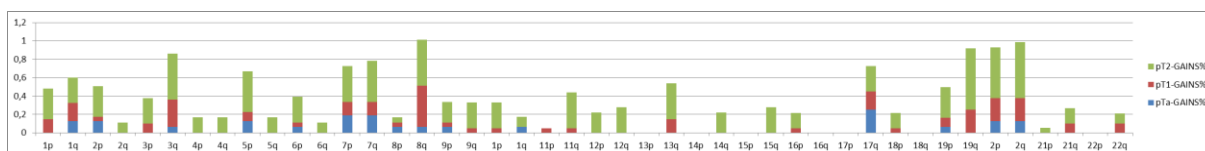


Figure 9 : Pour chaque bras chromosomique, la fréquence des gains est représentée respectivement en bleu pour les tumeurs de stade tumoral pTa, en rouge pour les pT1, et en vert pour les pT2.

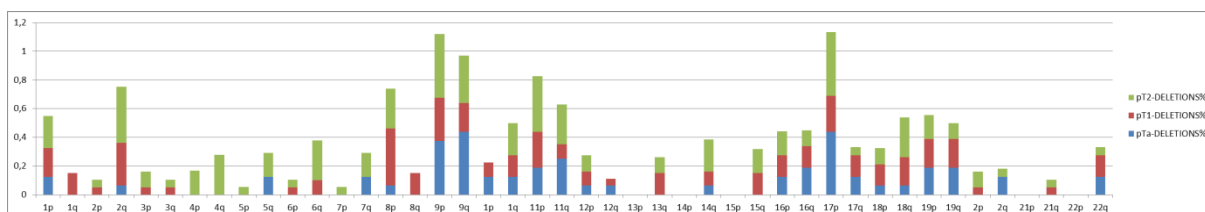


Figure 10 : Pour chaque bras chromosomique, la fréquence des délétions est représentée respectivement en bleu pour les tumeurs de stade tumoral pTa, en rouge pour les pT1, et en vert pour les pT2.

Nous avons pu observer que le nombre total d'altérations chromosomiques (gain et perte) augmentaient également avec le stade tumoral (Figure 11 et Figure 12). Certaines altérations ne sont observées qu'au stade le plus avancé pT2, comme les altérations totales en 4p, 4q, les gains en 2q, 5q, 6q, 12p, 12q, 14q, 15q 21p et les pertes en 5p et 7p (Figures 8, 9, 11 et 12).

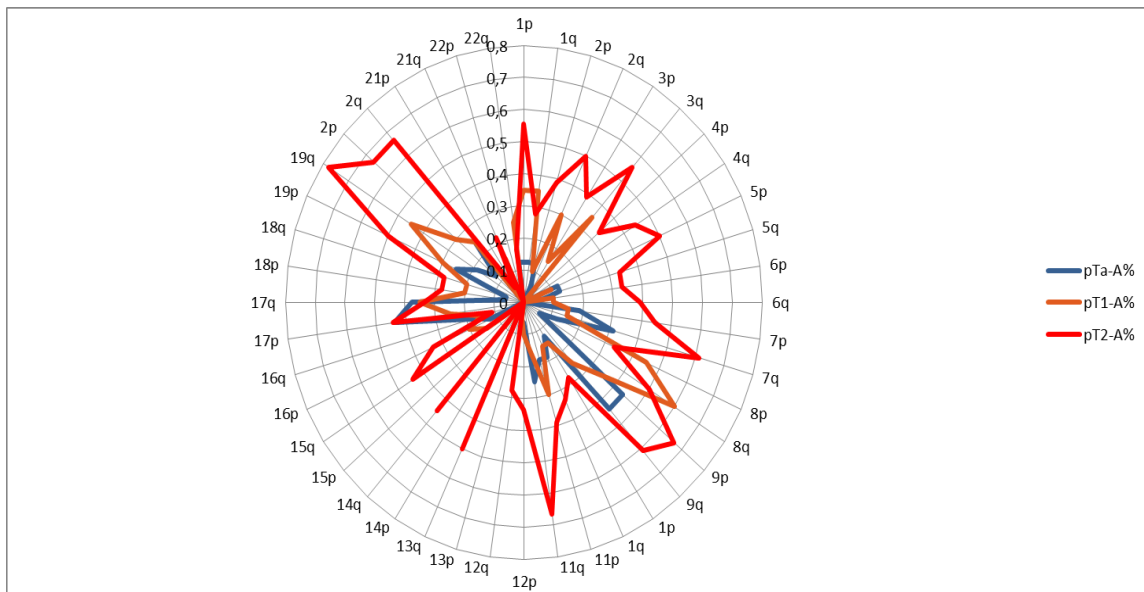


Figure 11 : Superposition des profils d'altérations chromosomiques pour les différents stades tumoraux, pTa (bleu), pT1 (orange) et pT2 (rouge) par bras chromosomique.

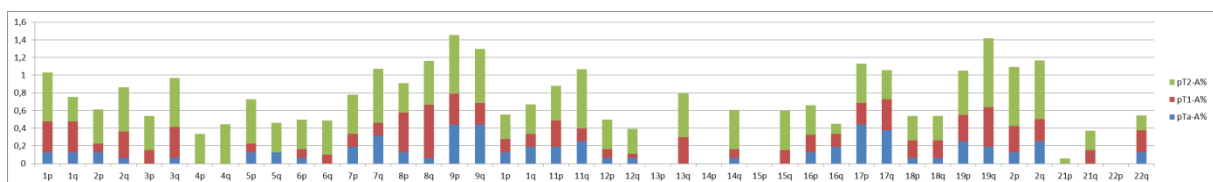


Figure 12 : Pour chaque bras chromosomique, la fréquence des altérations chromosomiques (gain + perte) est représentée respectivement en bleu pour les tumeurs de stade tumoral pTa, en rouge pour les pT1, et en vert pour les pT2.

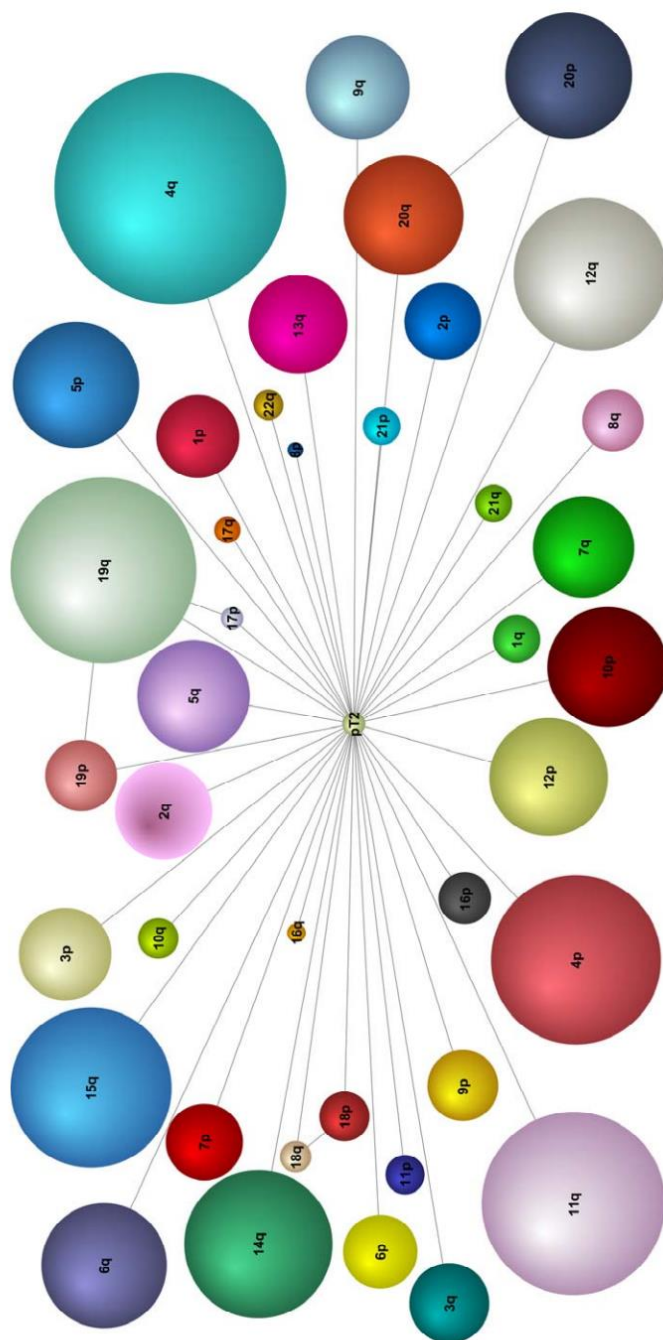


Figure 13 : Réseau Bayésien mettant en évidence la relation entre altérations chromosomiques et le risque de cancer de la vessie de stade tumoral pT2. La taille des cercles est proportionnelle à leur association avec ce stade.

III.3 Analyse moléculaire des altérations chromosomiques par puce CGH BCA-oligo et des mutations du gène FGFR3 à partir d'ADN urinaire de patients présentant un carcinome urothélial

III.3.1 Matériels et méthodes

Une cohorte de 50 patients ayant une tumeur de la vessie a été incluse dans cette étude. Les critères d'inclusion étaient d'abord une indication de résection endoscopique de la vessie dans le contexte de la surveillance ou d'une récurrence de tumeur de la vessie non envahissant TVNIM (<3 cm); deuxièmement, une cytologie négative ou non informative; troisièmement, aucun signe de tumeurs du tractus urinaire supérieur (UUT-TCC) en tomodensitométrie. Tous les patients ont donné leur consentement éclairé. Les données cliniques recueillies comprenaient l'âge, le sexe, l'âge au diagnostic, l'historique des tumeurs du haut appareil urinaire, le statut de fumeur (actif, ancien ou non-fumeur). Les données anatomo-pathologiques suivantes sur la tumeur de la vessie ont également été recueillies: le stade et le grade, et le statut mutationnel du gène FGFR3 pour les mutations S249C; Y375C; G372C.

III.3.2 Protocole de collection et analyse des urines

Les patients inclus dans l'étude, ont signé un consentement de participation au protocole 2011/24 NICB (Comité de Protection des Personnes Ile de France IV, Institutional Review Board 00003835). Des échantillons d'urine (50 ml) ont été prélevés avant chaque intervention. Après centrifugation de l'urine, le kit QIAmp DNA Blood Mini (Qiagen) a été utilisé pour extraire l'ADN urinaire du culot obtenu, en respectant les recommandations du fournisseur. Après validation de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait, il a été marqué puis hybridé sur la puce BCA-oligo. Brièvement, le kit BioPrime (Life Technologies Invitrogen) a été utilisé conformément aux recommandations du fournisseur pour marquer l'ADN testé (avec Cyanine 5) et l'ADN de référence (avec Cyanine 3). Après une double purification, la première avec le kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) et la seconde avec le kit Purelink® (Life Technologies), les deux ADN ont été mélangés en quantité égale. Le mélange a ensuite été incubé pendant 3 minutes à 97 °C, puis 30 minutes à 37 °C en présence d'ADN répété Cot-1 (1 mg/ml), du tampon d'hybridation Agilent 2X (Agilent Technologies) et de l'agent de blocage Agilent 10X (Agilent Technologies). Le mélange a

ensuite été placé sur la puce BCA-Oligo pour hybridation pendant 16 heures à 65 °C. Après lavage avec la solution de lavage Wash Buffer (Agilent Technologies), la puce a été scannée en utilisant le scanner haute résolution Agilent (Agilent Technologies). Le logiciel WorkBench (Agilent Technologies) a été utilisé pour analyser les résultats.

Pour interpréter le résultat du test BCA-oligo, la valeur médiane de fluorescence Log2 normalisée a été calculée pour chaque oligonucléotide. Un oligonucléotide a été considéré comme délété ou amplifié si son rapport Log2 moyen normalisé était inférieur ou supérieur à -0,2 ou 0,2 respectivement. Une région chromosomique était considérée comme amplifiée ou délétée si au moins 6 oligonucléotides successifs de la région étaient interprétés comme étant gagnés ou perdus.

III.3.3 Résultats

Les caractéristiques de la population étudiée et les résultats individuels sont présentés dans l'article placé en Annexe 1. La distribution et la typologie (Gain, perte, Gain+Perte) des altérations chromosomiques mises en évidence par l'analyse avec la puce BCA-oligo des 50 ADNs urinaires de patients présentant un carcinome urothélial sont présentées dans la Figure 14. La cartographie des relations entre facteurs cliniques, pathologiques et moléculaires est représentée en Figure 15. Les corrélations significatives sont celles entre l'âge et les habitudes tabagiques (Pearson R: -0,7, $p = <0,001$), entre un haut grade et un stade tumoral pT1 (Pearson R: 0,7; $p <0,001$); un stade pT1 et la présence de CNV (Pearson R: 0,5; $p = 0,002$). A l'inverse, aucune association n'a été observée entre la présence de mutation FGFR3 et un stade tumoral pT1 ou un haut grade Figure 14. L'association entre chaque altération chromosomique cible et l'existence d'un haut grade tumoral est représentée sur la Figure 16. Les marqueurs les plus associés à la présence d'un haut grade tumoral (importance relative > 0,3) étaient les gains en 8q et 11q, ainsi que les délétions en 9q. A partir de cette cartographie, la valeur prédictive du modèle Bayésien donne respectivement une AUC de 0,92 et 0,93 pour le haut grade et le stade tumoral pT1.

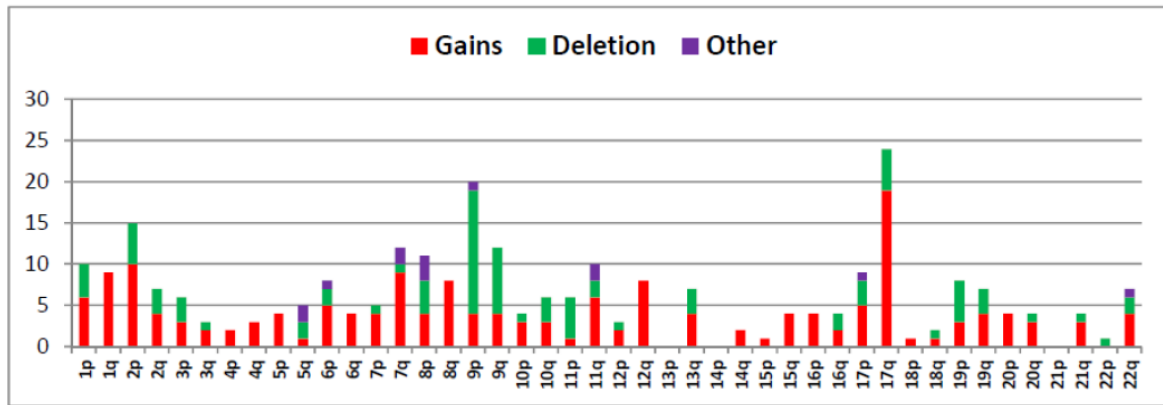


Figure 14 : Fréquence et distribution des altérations chromosomiques (gain, perte ou gain+perte) selon l'analyse réalisée avec la puce BCA1-oligo à partir de l'ADN urinaire de 50 patients avec un carcinome urothélial (80).

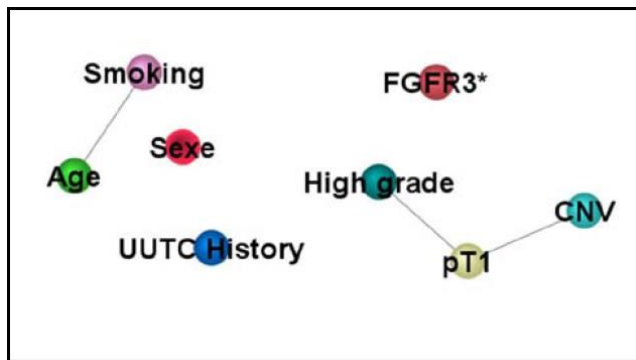


Figure 15 : Corrélations significatives entre les paramètres cliniques et moléculaires. (CNV : altérations chromosomiques, UUTC History : histoire personnelle de tumeur des voies urinaires supérieures, Smoking : statut tabagique; High grade : haut grade).

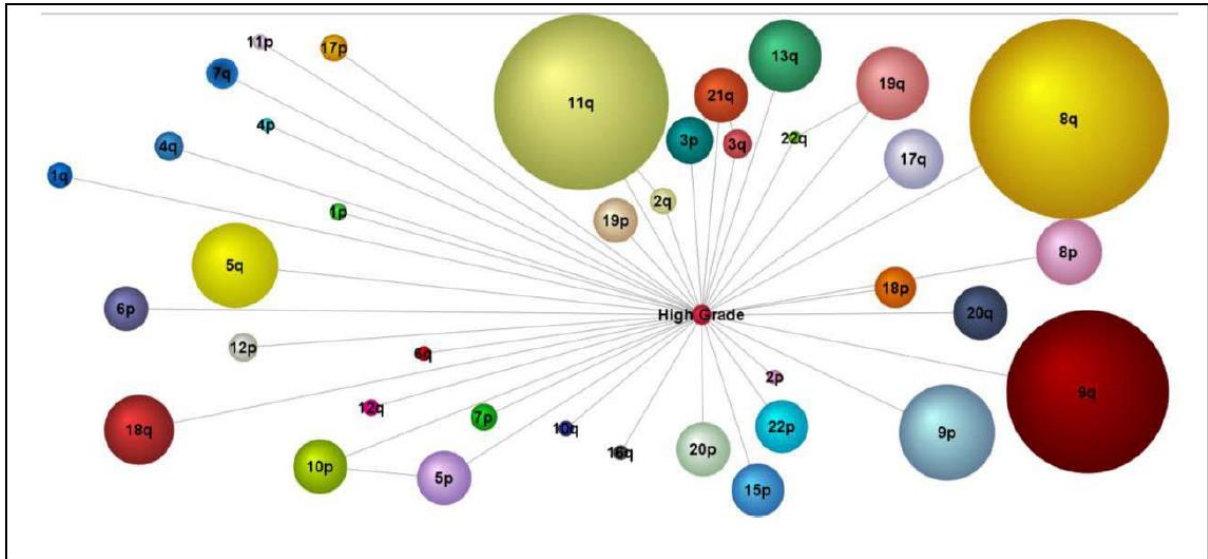


Figure 16 : Réseau Bayésien mettant en évidence la relation entre altérations chromosomiques et le risque de cancer de la vessie de haut grade (80). La taille des cercles est proportionnelle à leur association avec un haut grade.

Référence : Annexe 1 – Article Publié

III.3.4 Conclusion

La prise en charge du carcinome la vessie de haut grade ou de stades pT1 / pTis nécessite un suivi spécifique en raison du risque élevé (> 50%) de récurrence ou de progression de la maladie vers des stades avancés infiltrants le muscle (81). Notre étude, en utilisant le test BCA-oligo sur l'urine, montre que des loci chromosomiques, situés en 8q, 11q ou 9q sont associés à un haut grade ou à un stade pT1. De la façon même, des études portant sur le tissu tumoral ont retrouvé des résultats similaires. Zaharieva et al. (82) ont montré précédemment que la fréquence des gains du gène cMYC situé en 8q24 augmente significativement avec le grade et le stade (fréquence de 6% pour le grade G1, 12% pour le G2 et 20% pour le G3 ; 11% pour le stade pTa contre 16% pour pT1). Dans une étude portant sur 28 tumeurs pTa et 28 tumeurs pT1, Richter et al. (83) ont montré que la fréquence des pertes en 8p et des gains en 3p, 8q et 10p étaient significativement plus élevés dans les tumeurs pT1. Dans une autre étude portant sur 64 patients chinois atteints de tumeurs vésicales, les gains en 8q et 11q et les pertes en 8p étaient plus fréquents dans les tumeurs pT1 que dans les tumeurs pTa (84). Une étude de 46 tumeurs superficielles a montré que les pertes en 8p et les amplifications en 8q, 5q et 10p étaient plus fréquentes au stade pT1 (85).

A l'inverse, la mutation FGFR3 était fréquemment (40%) associée à une maladie de bas grade, mais pas exclusivement. Le fait que la présence de la mutation FGFR3 ne soit pas systématique en bas grade, renforce le fait que l'absence de mutation FGFR3 n'est pas un marqueur fiable si elle est utilisée seule (86). Nos résultats suggèrent que l'utilisation de CNV pour prédire le risque d'agressivité ou d'évolution de la vessie TVNIM à partir d'ADN extrait d'échantillons d'urine pourrait être facilement réalisée. Cependant, nos modèles prédictifs (pour un haut grade ou un stade avancé) doivent être confirmés sur une plus grande cohorte indépendante de patients.

En complément de la cytologie, l'identification de marqueurs d'agressivité chez un patient peut aider le clinicien à prendre plus facilement une décision sur la thérapie adjuvante après la résection de la tumeur ou à concevoir une stratégie thérapeutique personnalisée. Établir des profils génétiques distincts des patients atteints de carcinome de la vessie non infiltrant pourrait aider à améliorer les soins en termes de diagnostic et d'évaluation du pronostic.

IV. Analyse immunohistochimique des tumeurs urothéliales

IV.1 Introduction : Marqueurs pronostiques candidats pour des études en immunohistochimie

IV.1.1 Marqueur de prolifération : Ki67/MIB1

L'antigène Ki67 fut décrit par Gerdes en 1983 après immunisation de souris par injection de noyaux de cellules de lymphome provenant d'un lymphome de Hodgkin (clone 67, étude réalisée dans la ville de Kiel) (87). Ki67 est un marqueur de la prolifération, qui semble être fortement associé à la récurrence et au grade histologique des cancers de vessie.

Cet antigène code pour une protéine nucléaire de 360 kDa. Il est présent au niveau du noyau des cellules prolifératives, en phase G1, S, G2 et M, mais absent dans les cellules au repos (phase G0). Sa fonction précise n'est pas connue. Une participation au maintien du pouvoir prolifératif ou au contrôle du cycle cellulaire est suggérée.

L'antigène Ki67 est détecté par l'anticorps Ki67 en immunohistochimie et immunofluorescence. En pratique, l'index de marquage par le Ki67 représente le pourcentage de noyaux colorés par l'anticorps Ki67.

Wang et al ont montré que l'expression de Ki67 était corrélée au grade et au stade des tumeurs de vessie (88). L'expression de Ki67 est corrélée dans les TVNIM avec le nombre de tumeurs, le grade, le stade, et la taille de la tumeur. Cette équipe a également suggéré que l'expression de TP53 et Ki67 pourrait être utilisée pour prédire le risque de récurrence post-opératoire dans les TVNIM (89). De même, Enache et al ont montré qu'il y avait une forte corrélation entre l'indice de prolifération Ki67, le stade de la tumeur et son grade (90). Ki67 a été fortement associé à la récurrence et au grade histologique (91).

IV.1.2 Marqueur lié à la stabilité de l'ADN: P53, STAG2, AURORA

IV.1.2.1 P53

Le gène TP53, situé sur le bras court du chromosome 17, code pour une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés (53 kilodaltons). Cette protéine est un facteur

de transcription qui se fixe de manière spécifique sur les régions régulatrices de gènes dont elle contrôle l'expression. Elle est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose, et permet le maintien de l'intégrité du génome (92). L'homme dispose d'un seul gène p53 fonctionnel. Pour être active, la protéine p53 doit agir sous forme de tétramère de sous-unités identiques. Chaque sous-unité est constituée d'un domaine N-terminal d'activation transcriptionnelle, d'un domaine central de liaison à l'ADN, d'un domaine d'oligomérisation et d'un domaine basique C-terminal de localisation nucléaire. Dans les cellules au repos, la protéine p53 est sous forme « latente ». Elle est relativement instable, en faible concentration et adopte une conformation qui l'empêche de se lier avec une haute affinité aux séquences d'ADN consensus localisées dans les régions régulatrices des gènes cibles. La protéine p53 est stabilisée et activée en réponse à de nombreux stress moléculaires parmi lesquels on peut noter des lésions de l'ADN, l'hypoxie, des infections virales ou l'activation d'oncogènes. Elle subit de nombreuses modifications post-traductionnelles qui vont permettre d'activer sa fonction de facteur de transcription. L'ensemble de ce programme peut avoir deux effets exclusifs sur les cellules :

1/ l'arrêt transitoire du cycle cellulaire au niveau des phases G1 ou G2 (93), et la réparation de l'ADN (94);

2/ l'apoptose si les dommages que la cellule a subi ne peuvent pas être réparés. L'apoptose empêche la prolifération de cellules génétiquement altérées prédisposées au cancer et ceci par deux voies distinctes : intrinsèque ou mitochondriale, et extrinsèque par l'intermédiaire des récepteurs de mort (95).

Le gène suppresseur de tumeur p53 muté semble être un facteur prédictif indépendant de progression du cancer de la vessie et, est associé à une diminution de la survie après cystectomie.

L'importance de la mutation du gène p53 dans les cellules tumorales est indéniable (92). La protéine p53 de type sauvage médie les fonctions impératives telles que la régulation du cycle cellulaire et la mort cellulaire programmée. Une carence de la fonction de p53 par mutation ou l'inactivation abroge les points de contrôle et l'apoptose du cycle cellulaire normal, générant un milieu favorable pour l'instabilité génomique et la carcinogénèse. Une multitude d'études rétrospectives ont associé des mutations de p53 à des résultats défavorables dans les tumeurs de vessie. Dans le cancer de la vessie, une mutation de p53 est retrouvée

dans 50 à 60% des tumeurs infiltrantes et à haut risque de malignité, c'est-à-dire les tumeurs classées pT2, certaines pT1 et les tumeurs de haut grade présentant un CIS associé. Pour certains auteurs, les mutations de p53 seraient responsables d'une augmentation du taux de récurrence tumorale et d'une augmentation du risque d'infiltration du muscle vésical (96).

Les tumeurs qui sont mutées pour p53 ont une protéine plus stable, et on considère qu'il y a donc surexpression de p53 (ou expression positive) (54). Le taux d'expression de p53 est corrélé avec la progression et le grade histologique (91).

IV.1.2.2 STAG2

Plusieurs études (68, 97, 98) ont montré que la perte de fonction STAG2 joue un rôle plus important dans les TVNIM que dans les TVIM. Une mutation inactivatrice de ce gène semble associée aux faibles stades ($p=0.001$) et aux bas grades ($p=0.002$). L'expression de la protéine STAG2 est absente, en immunohistochimie, dans la plupart des cas de mutations inactivatrices.

IV.1.2.3 AURORA Kinase A

Le gène codant pour la protéine Aurora Kinase A, AURKA, est localisé en 20q13.2. AURORA, également connue sous le nom de sérine / thréonine-protéine kinase 6, est une enzyme membre d'une famille de sérine / thréonine kinases mitotiques. Elle est impliquée dans des processus importants au cours de la mitose et de la méiose, dont le bon fonctionnement est fondamentale pour la prolifération d'une cellule normale. Aurora A est activée par une ou plusieurs phosphorylations, et son pic d'activité se réalise au cours de la transition de la phase G2 à la phase M du cycle cellulaire.

La sur-expression de AURKA est associée à une aneuploïdie et à un profil basal avec un pronostic moins favorable (99).

IV.1.3 Typologie luminale-basale : CK5/6, CK14, P63, FOXA1, GATA3

IV.1.3.1 P63

Le gène TP63, situé en 3q27-28, code pour la protéine tumorale p63 qui est un membre de la famille p53. Il joue un rôle clé dans la régulation de la différenciation et de la prolifération de cellules épithéliales, plutôt que dans la suppression des tumeurs. Les stades

avancés du carcinome de la vessie sont associés à des altérations et à la perte de l'expression de p63 (100, 101).

La protéine P63 agit en tant qu'activateur ou répresseur transcriptionnel en se liant de façon spécifique à l'ADN d'une séquence d'intérêt. Le gène TP63 encode différentes isoformes. Ces isoformes contiennent un ensemble variable de domaines inhibant l'activation transcriptionnelle et la régulation de cette activation transcriptionnelle, conférant ainsi une activité spécifique à chaque isoforme. Elle peut être requise conjointement avec TP73/p73 pour l'initiation de l'apoptose p53/TP53-dépendante en réponse à des agressions génotoxiques et la présence d'oncogènes activés.

L'étude de l'expression de p63 a permis de montrer une immunoréactivité nucléaire dans l'urothélium non néoplasique, à l'exception des cellules parapluies (100). P63 est régulée dans la carcinogenèse de la vessie et l'expression de p63 est perdue dans la plupart des cancers invasifs alors que les tumeurs papillaires superficielles en maintiennent l'expression (102).

IV.1.3.2 Cytokératine 5/6 et cytokératine 14 : typologie basale

Radvanyi et al (103) ont montré qu'il existait un nouveau sous type de tumeur vésicale, les tumeurs « basal like ». « Basal » désigne les cellules présentes dans certains épithéliomas stratifiés et qui expriment les cytokératines 14,17 et 5. Les tumeurs « basal like » dans la vessie ont un profil d'expression génique qui s'est révélé très proche de celui d'un type particulier de tumeurs agressives du sein également dites « basal like » (qui ont une activation permanente de la voie EGFR). Ces tumeurs sont moins différenciées et plus agressives. L'expression de la cytokératine 5/6 (ou KRT5/6) a été utilisée pour distinguer, dans le cancer du sein, deux sous-types distincts, à savoir, un type uniforme positif («de base») et un type partiellement positif ("basoluminal") à bon pronostic. L'utilisation de cet anticorps dans le cancer de la vessie pourrait permettre de distinguer les tumeurs « basal like » qui sont très agressives (48, 104). La Cytokératine 14 (ou KRT14) peut être considérée comme un marqueur de type basal (105).

IV.1.3.3 FOXA1: typologie luminale

Le gène FOXA1 est situé sur le bras long du chromosome 14 (en 14q21.1) et code pour la protéine Forkhead Box Protein A1, qui est un activateur transcriptionnel de l'ADN

(106). Ce facteur est impliqué dans la coactivation du récepteur des androgènes, et a montré un rôle dans l'expression de ce récepteur dans le cancer du sein et de la prostate (106-108).

FOXA1 est considéré comme un marqueur de tumeur de vessie de type luminal, comme GATA3 (105, 109). Les cellules urothéliales normales présentent une forte expression de FOXA1 (109).

IV.1.3.4 GATA3 : typologie luminale

La protéine Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3 appartient à la famille des facteurs de transcription de type GATA et est codée par le gène GATA3 situé sur le chromosome 10. Ces facteurs de transcription reconnaissent une séquence consensus WGATAR sur l'ADN et régulent la différenciation des cellules épithéliales (110).

Les tumeurs basales / squameuses (BASQ) sont caractérisées par une forte expression de KRT5/6 et KRT14 et par une faible ou indétectable expression de FOXA1 et GATA3. A l'opposé, les cellules urothéliales normales présentent une forte expression de FOXA1 et GATA3.

IV.2 Présentation de l'étude

L'objectif principal de cette étude était d'identifier des marqueurs moléculaires de valeur pronostique pour le cancer de la vessie, pouvant être utilisés seuls ou en combinaison dans la pratique clinique de routine.

Les récentes investigations génomiques sur le cancer de vessie ont révélé des interactions complexes entre altérations génétiques, nombre et type de mutations (16, 51). D'autres études ont montré des profils génétiques associés avec la progression tumorale, la métastase et la réponse aux manipulations thérapeutiques (111).

Ces études ont évalué le profil du génome entier pour classer le cancer de vessie en différents sous-groupes (48, 51, 112-114), qui montrent tous une polarisation vers un profil soit basal soit luminal (104). Ces deux profils présentent des différences en termes d'agressivité et de réponse à la chimiothérapie.

Pouvoir identifier ces profils présenterait un avantage clinique important, permettant d'orienter chaque patient vers une option personnalisée pertinente.

Nous avons décidé de travailler sur des échantillons de tissus formolés et fixés en paraffine, ce matériel étant le plus fréquemment disponible dans le contexte clinique standard.

Nous avons comparé les données cliniques, anatomo-pathologiques et immunohistochimiques de patients métastatiques et non métastatique, et nous avons analysé les tissus métastatiques en comparaison avec la tumeur principale.

IV.3 Matériels et méthodes

IV.3.1 Population étudiée

Une base de 570 cystectomies radicales réalisées entre 1991 et 2014 a été extraite de l'archive opératoire du Service d'Urologie de l'Hôpital Tenon. A partir de cette base, les critères d'inclusion étaient: cystectomie radicale, confirmation histologique du diagnostic de cancer urothélial à cellules transitionnelles, stade pT1 ou supérieur.

Après lecture des résultats histologiques, nous avons exclu 18 cas T0 (absence de reliquat tumoral après RTUV ou chimiothérapie néoadjuvante), 83 cas opérés pour cancers non urothéliaux, 125 cas de cystectomies réalisées pour vessie neurologique sans signes de cancer à l'examen histologique, et 44 cystectomies réalisées pour raisons non oncologiques (cystectomies d'hémostase, cystectomies pour endométriose), et 76 dossiers non informatifs (impossibilité de récupérer les éléments cliniques). Ainsi, 224 cas de cancer de vessie de stade pT1 ou supérieur ont été retenus.

Le recueil des données cliniques comprenait : l'âge, le sexe, l'âge au moment de la cystectomie, le statut fumeur actif/sevré ou non-fumeur, le poids, la taille, le score ASA (American Society of Anesthesiology) en tant que indicateur des comorbidités, l'histoire clinique d'autres cancers, la présence synchrone de tumeur de la prostate. Concernant la tumeur de vessie, nous avons recueilli les données suivantes: le stade tumoral, le grade et le type histologique au diagnostic. Les données cliniques, ainsi que des informations concernant les prélèvements étaient saisies dans une base de données qui permettait de relier les informations cliniques au prélèvement.

Nous avons retenu ainsi 224 patients pour lesquels le dossier, ainsi que les blocs de tissu formolé et inclus en paraffine étaient disponibles.

Les informations cliniques et anatomo-pathologiques sont résumées dans le Tableau 8 et Tableau 9:

	Total
Hommes	173 (77.2%)
Femmes	51 (22,7%)
Total	224
Age au diagnostic médian (ans)	67,6 [41-87]
BMI médian	24,6 [18,3-37,8]
Non-fumeur	48 (21,4%)
Fumeur	53 (23,7%)
Non connu	123 (54,9%)

Tableau 8 : Caractéristiques de la population étudiée. (BMI= index de masse corporelle-*body mass index*)

Stade	Nombre total (Pourcentage)	Nombre de patients Métastatiques (Pourcentage)
pT1	3 (1,3%)	2 (66,7%)
pT2	56 (25%)	10 (17,86%)
pT3	116 (51,8%)	52 (44,8%)
pT4	49 (21,9%)	35 (71,4%)
Total	224	72 (32,14%)

Tableau 9 : distribution des stades tumoraux pour la population étudiée

L'étude immunohistochimique a été réalisé pour une sous-population de 140 patients, pour lesquels les lames correspondantes aux prélèvements tissulaires ont été considérées suffisamment informatives en vue de la réalisations du Tissue Micro-Array (TMA).

Les caractéristiques de la population étudiée par immunohistochimie sont résumées dans le Tableau 10.

	Total
Hommes	110 (78,6%)
Femmes	30 (21,4%)
Total	140
Age au diagnostic médian (ans)	69,3 [41-87]
Non-fumeur	38 (27,1%)
Fumeur	27 (19,3%)
Non connu	75 (53,6%)

Tableau 10 :Caractéristiques de la population étudiée par immunohistochimie.

Des 140 patients étudiés par immunohistochimie, 3 (2,1%) présentaient des tumeurs de vessie non infiltrant le muscle et 137 des tumeurs infiltrant le muscle (97,9%) (Tableau 11).

Stade	Nombre total (Pourcentage)	Nombre de patients Métastatiques par stade (Pourcentage)
pT1	3 (2,1%)	2 (66,7%)
pT2	18 (12,9)	3 (16,7%)
pT3	79 (56,4%)	37 (46,8%)
pT4	40 (28,6%)	28 (70%)
Total	140	70 (50%)

Tableau 11 : Caractéristiques de la population étudiée par immunohistochimie.

Nous avons ensuite réalisé une deuxième série d'analyses immunohistochimiques, sur 63 échantillons de tissu métastatique, prélevés après relecture anatomo-pathologique des lames relatives aux ganglions. Pour 7 patients, l'immunohistochimie sur tissu métastatique

n'a pas marché (carottes –punch- insuffisantes, tissu insuffisant, enroulement des échantillons lors de la coupe du bloc de TMA).

Le Tableau 12 résume les nombre des TMA réalisés à partir de la base clinique.

Base clinique			
n=224	TMA M-&M+	dont	
	n=140	TMA M+ sur tumeur primitive	dont
		n=70	TMA M+ sur tissu métastatique
			n=63

Tableau 12 : nombre d'analyses TMA réalisées après évaluation de la base clinique et des lames anatomo pathologiques. (TMA= Tissue Micro Array, M- : non métastatique ; M+ : métastatique).

IV.3.2 Choix des marqueurs et Immunohistochimie

Le principe de cette étude consiste à évaluer le rôle pronostic de marqueurs moléculaires en immunohistochimie. Nous avons pour cela sélectionné 8 marqueurs d'intérêt: Ki67, p53, p63, cytokératine 5/6, cytokératine 14, GATA3, FOXA1 et STAG2.

L'anticorps **STAG2** (Référence : SA-2 Antibody (clone J-12)), produit par Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), est un anticorps monoclonal de souris. La dilution utilisée était de 1:100. L'intensité de la coloration a été estimée comme nulle (valeur = 0) si aucune cellule n'était positivement marquée, faible (valeur = 1) si 10% à 50% des cellules étaient marquées, ou forte (valeur = 2) si plus de 50% des cellules étaient marquées. Seule la coloration nucléaire a été considérée comme positive.

L'anticorps **cytokératine 5/6**, pré-dilué de chez Dako (Référence : M7237), est un anticorps monoclonal de souris. La dilution utilisée était de 1:5. L'intensité de la coloration a été estimée comme nulle = 0% (valeur = 0), faible < 10%-50% (valeur = 1) ou forte >50% (valeur = 2).

L'anticorps **cytokératine 14**, de Cell Marque (Référence : T/CMC947) est un anticorps monoclonal de souris. La dilution utilisée est de 1:100. Les tissus ou tumeurs

démontrant au moins 10% de cellules avec une coloration positive ont été considérés comme positifs et ceux avec moins de 10% ont été déterminés comme coloration négative par convention.

L'anticorps **P53**, produit par Dako, était un anticorps monoclonal de souris. La dilution utilisée était de 1:25. Seule la coloration nucléaire a été considérée comme positive. L'intensité de la coloration a été estimée négative si < 10% des cellules étaient marquées (valeur = 0), ou positive si >10% des cellules étaient marquées (valeur = 1).

L'anticorps **P63**, produit par Dako, était un anticorps monoclonal de souris. La dilution utilisée était de 1:100. Seule la coloration nucléaire a été considérée comme positive. L'intensité de la coloration a été estimée négative si < 10% des cellules étaient marquées (valeur = 0), ou positive si >10% des cellules étaient marquées (valeur = 1).

L'anticorps **Ki67/MIB1**, produit par Dako, était un anticorps monoclonal de souris. La dilution utilisée était de 1:50. Seule la coloration nucléaire a été considérée comme positive. L'intensité de la coloration a été estimée 0% (valeur = 0), faible < 10%-50% (valeur = 1) ou forte >50% (valeur = 2).

Les anticorps monoclonaux Ki-67 et MIB-1 sont dirigés contre différents épitopes du même antigène lié à la prolifération. Ki-67 et MIB1 peuvent être utilisés sur des sections de tissu fixé (115). MIB-1 est utilisé dans des applications cliniques pour déterminer l'indice de marquage Ki-67. L'un de ses principaux avantages par rapport à l'anticorps original Ki-67 (et la raison pour laquelle il a essentiellement supplanté l'anticorps original pour une utilisation clinique) est qu'il peut être utilisé sur des coupes incluses en paraffine fixées au formol, après démasquage d'antigène par la chaleur.

L'anticorps **GATA3**, de Biocare (Référence : CM405B) est un anticorps monoclonal de souris. La dilution utilisée est de 1:100. Les tissus ou tumeurs démontrant au moins 10% de cellules avec une coloration positive ont été considérés comme positifs, et ceux avec moins de 10% ont été déterminés comme coloration négative par convention.

L'anticorps **HNF3-alpha**, ciblant le produit du gène **FOXA1** (Référence : SC-101058) est un anticorps monoclonal de souris. La dilution utilisée est de 1:100. Les tissus ou tumeurs démontrant au moins 10% de cellules avec une coloration positive ont été considérés comme

positifs, et ceux avec moins de 10% ont été déterminés comme coloration négative par convention.

Pour analyser sur une seule lame un grand nombre d'échantillons, il a été construit des puces tissulaires ou Tissue Micro Arrays (TMA). Pour chaque cas, 3 prélèvements de 0,6 mm de la zone d'intérêt du bloc donneur étaient transférés vers le bloc receveur. Des coupes sériées de 3 μm étaient ensuite effectuées sur le bloc de TMA, et une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) permettait de contrôler la représentation adéquate du tissu analysé (Figure 17). Les autres lames étaient utilisées pour les marquages immunohistochimiques.

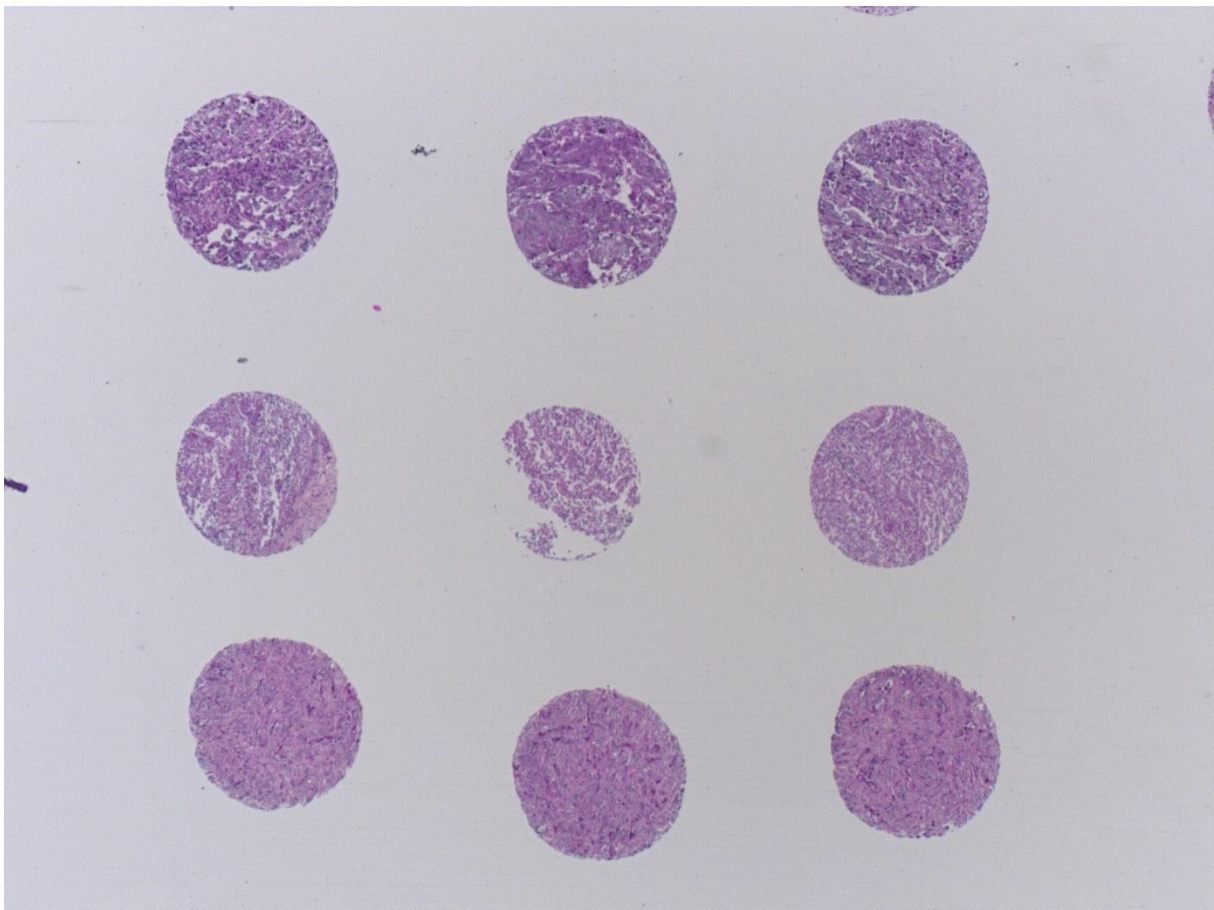


Figure 17 : Exemple d'un secteur d'une lame de TMA avec trois séries de trois coupes, coloration hématoxyline et éosine. (*Grossissement X25*)

L'immunohistochimie (IHC) est le nom d'une méthode de localisation de protéines dans les cellules d'une coupe de tissu, par la détection d'antigènes, au moyen d'anticorps. L'immunohistochimie exploite le fait qu'un anticorps (Ac) se lie spécifiquement à des antigènes dans les tissus biologiques. Les anticorps peuvent être d'origine polyclonale ou

monoclonale, les anticorps monoclonaux étant plus spécifiques. Différentes stratégies de détection existent. Les anticorps sont classés en anticorps primaires et anticorps secondaires. Les anticorps primaires ciblent l'antigène d'intérêt alors que les anticorps secondaires ciblent les anticorps primaires. La méthode de détection peut donc être directe ou indirecte. Les coupes de 3µm des TMAs étalées sur lames étaient déparaffinées par passage dans une préparation (EZ Prep® 1x ref 950102), réhydratées puis séchées. Après un démasquage antigénique par la chaleur à 98°C, l'anticorps primaire dilué était déposé directement sur la lame puis incubés à 37°C. La dilution (Tableau 8) et la durée d'incubation de l'anticorps primaire variaient d'un anticorps à l'autre. L'anticorps secondaire, complexé à un système avidine-biotine-peroxydase permettant la révélation, était appliqué. Le kit de révélation était le système Envision + double link lapin/souris HRP, produit par Dako, qui comprend un polymère marqué à la peroxydase sur lequel a été fixé un anticorps anti-murin et anti-lapin. Un chromogène, la diaminobenzidine (DAB), inclus dans le kit, révélait un marquage positif en donnant une coloration brune. Une contre-coloration douce par l'hématoxyline recolorait le tissu en bleu et rendait possible une détermination topographique du marquage. Les marquages ont été réalisés sur l'automate Ventana Benchmark XT® à l'aide du Kit UltraView™, Universal DAB-Ventana ® (référence 760.500) pour tous les anticorps. Ces manipulations et leur interprétation ont été réalisées avec l'aide d'un anatomopathologiste (Tableau 9).

Anticorps	Clone	Fournisseur	Référence	Dilution	Démasquage Antigénique
Ki67	Mib 1	DAKO	M7240	1/150	CC1 court
P53	DO7	DAKO	M7001	1/75	CC1 long
P63	DAK-P63	DAKO	M7317	1/100	CC1 court
CK 5/6	D5/16 B4	DAKO	M7237	1/50	CC1 court
CK14	LL002	Cell Marque	T/CMC947	1/100	CC1 court
GATA-3	L50-823	Biocare	CM405B	1/100	CC1 standard
HNF-3alpha	Q-6	Santa Cruz biotechnology INC.	SC-101058	1/100	CC1 court
SA-2	J-12	Santa Cruz biotechnology INC.	SC-81852	1/100	CC1 standard

Tableau 13 : Description et dilution des anticorps

Anticorps	Marquage	Valeur
Ki67	Pas de coloration nucléaire	0
	Coloration nucléaire	1
P53	Pas de coloration nucléaire	0
	coloration nucléaire	1
	Coloration nucléaire forte	2
P63	Pas de coloration nucléaire	0
	coloration nucléaire	1
CK 5/6	Pas d'expression membranaire	0
	expression membranaire faible	1
	Expression membranaire forte	2
CK14	Pas d'expression membranaire	0
	Expression membranaire au niveau de la membrane basale	1
GATA-3	Pas de coloration nucléaire	0
	coloration nucléaire	1
HNF-3alpha (FOXA1)	Pas de coloration nucléaire	0
	coloration nucléaire	1
	Coloration nucléaire forte	2
SA-2 (STAG2)	Pas de coloration nucléaire	0
	coloration nucléaire	1
	Coloration nucléaire forte	2

Tableau 14 : Interprétation des résultats des immunomarquages pour chaque anticorps

IV.3.3 Statistiques

Les statistiques descriptives ont été réalisées en utilisant le logiciel MEDCALC® v15.2 (MedCalc Software, USA). Les corrélations, l'importance relative et les modèles prédictifs ont été réalisés à l'aide de l'analyse de réseaux Bayésiens naïfs et supervisés en utilisant le logiciel BayesiaLab® v6.0.8 (Bayesia, Laval, France). Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

IV.3.4 Résultats

L'âge médian au moment de la cystectomie était de 67,8 ans pour les patients non métastatiques et 66,8 pour les métastatiques, sans différence significative. L'indice de masse corporelle médian était de 22,4 kg/m² pour les deux groupes (Figure 18).

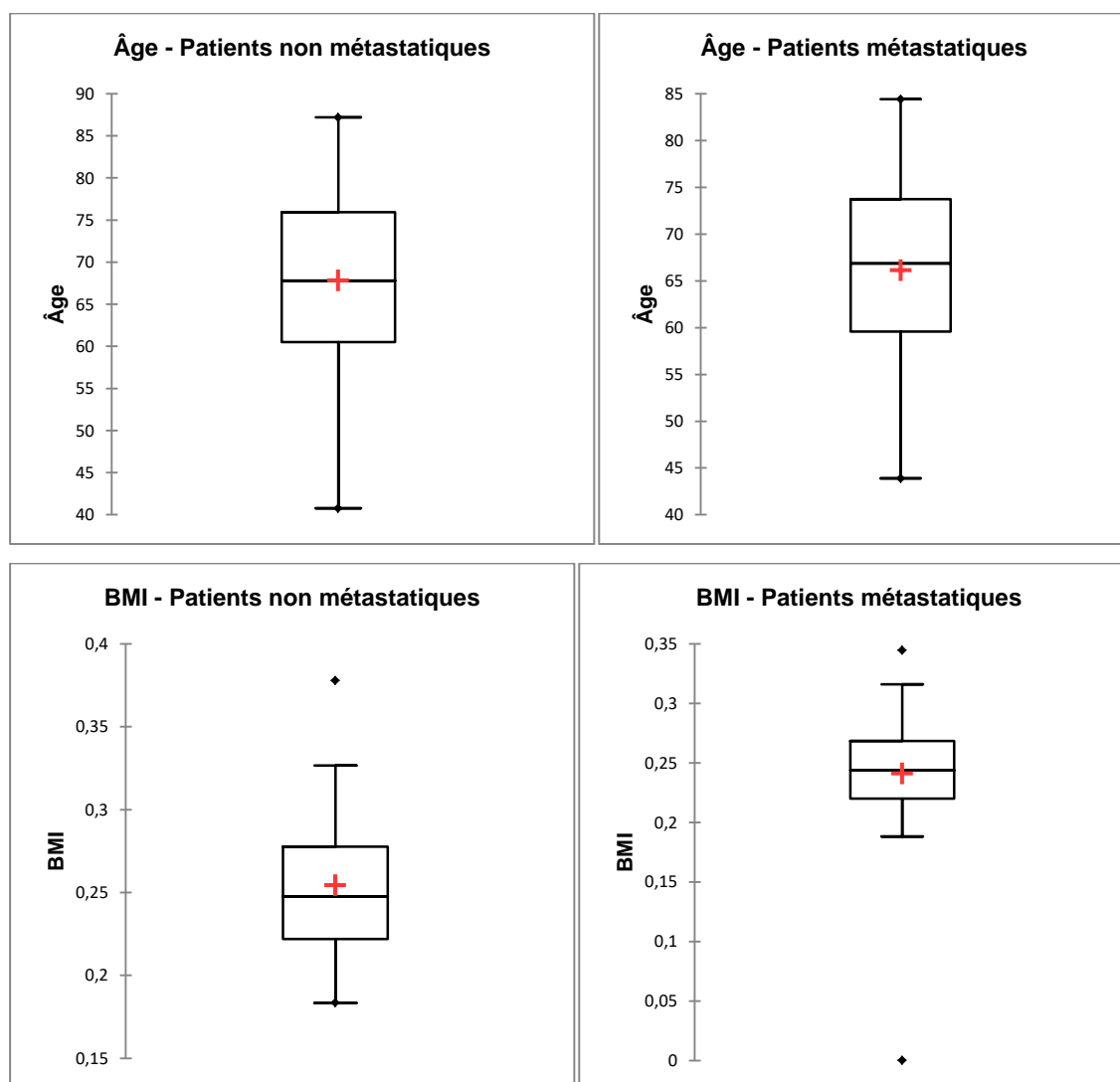


Figure 18 : Comparaison des âge à la cystectomie (en haut) et de l'indice de masse corporelle (BMI, en bas) chez les patients non métastatiques (0) et métastatiques (1).

Aucune différence significative n'a été observée entre les patients métastatiques et non métastatiques concernant la proportion hommes/femmes ou le tabagisme (Tableau 15).

	Non métastatique		Métastatique		Valeur de p
	f: 30	m: 95	f: 21	m: 78	
Sexe (f,m)	f: 30	m: 95	f: 21	m: 78	0,89
Tabagisme (n, y)	n: 27	y: 33	n: 21	y: 20	0,8

Tableau 15 : Comparaison de la répartition selon le sexe et selon le statut tabagique chez les patients non métastatiques et métastatiques. (f : femme; m : homme; n : non-fumeur, y : fumeur actuel ou ancien).

En comparant les groupes métastatiques et non métastatiques, nous n'avons pas observé de différence significative en termes de présence concomitante de tumeur de la voie excrétrice supérieure, de présence de CIS ou de cancer de la prostate incidentaire. Par contre, la présence d'embolies lymphatiques était significativement plus fréquente chez les patients métastatiques en comparaison aux patients non métastatiques (Figure 19). Ces résultats sont reportés dans le Tableau 16.

	Non métastatique		Métastatique		Valeur de p
	absence	présence	absence	présence	
TVES	105	4	78	4	0,84
Foyers de CIS	57	43	48	27	0,65
Carcinome prostatique	54	33	45	14	0,42
Emboles lymphatiques	57	37	17	54	0,029

Tableau 16 : résumé des associations entre TVES (tumeur de la voie excrétrice supérieure), CIS (carcinome *in situ*), carcinome prostatique et embolies lymphatiques et tumeur de la vessie dans la cohorte non métastatique et métastatique de la population générale. En jaune la valeur significative.

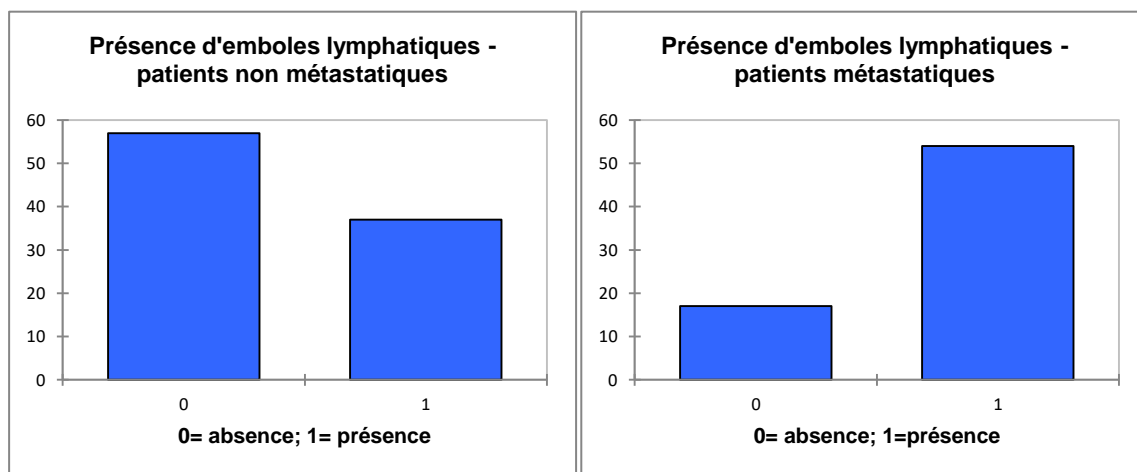


Figure 19 : Présence d'embolies lymphatiques chez les patients métastatiques (0) et non métastatiques (1). Différence significative entre les deux groupes (p= 0,029)

Des exemples de marquages positifs pour chaque anticorps sont présentés dans les Figure 20 : à Figure 27.

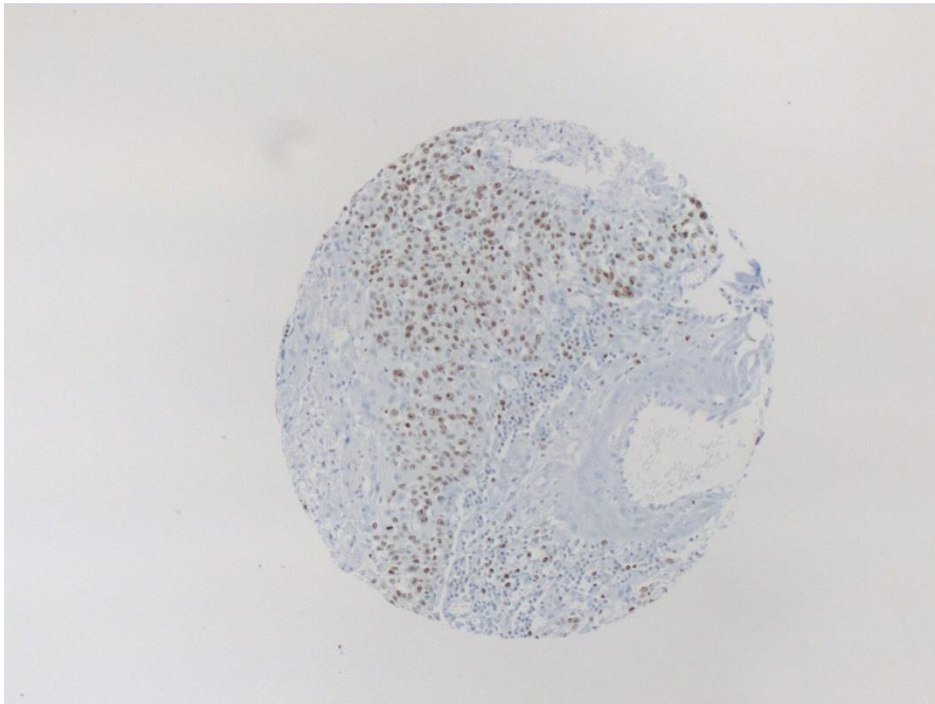


Figure 20 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-Ki67/MIB1. (*Grossissement X100*)

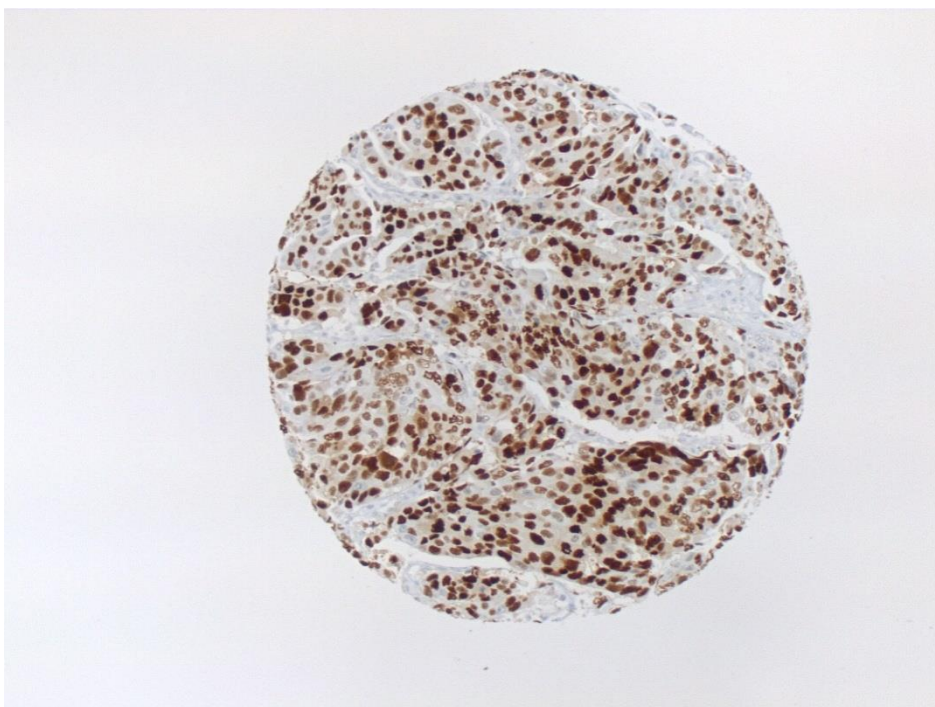


Figure 21 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-p53. (*Grossissement X100*)

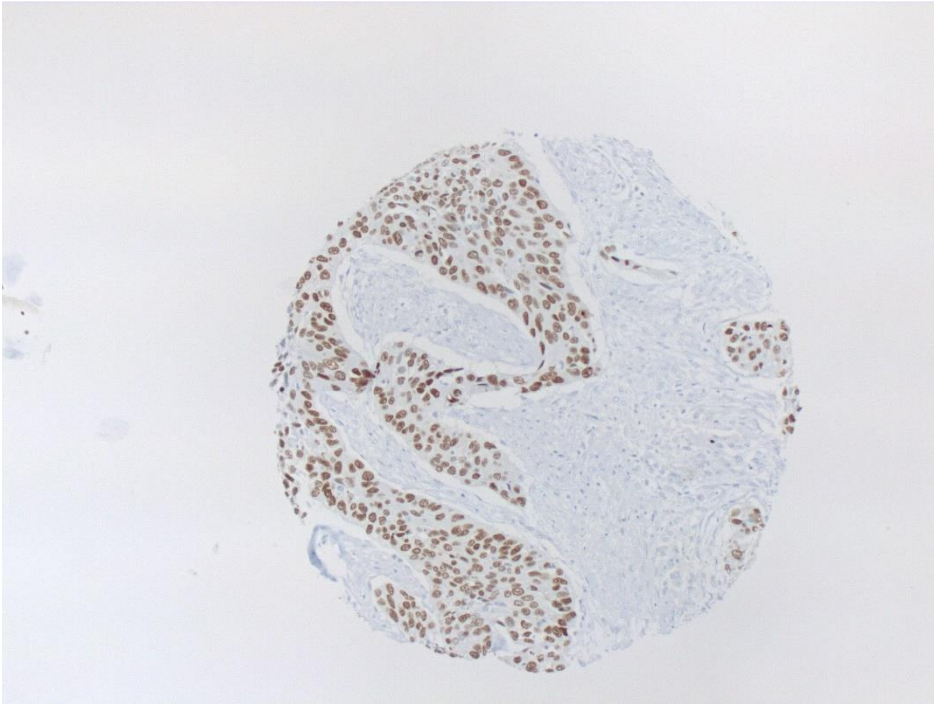


Figure 22 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-p63. (*Grossissement X100*)

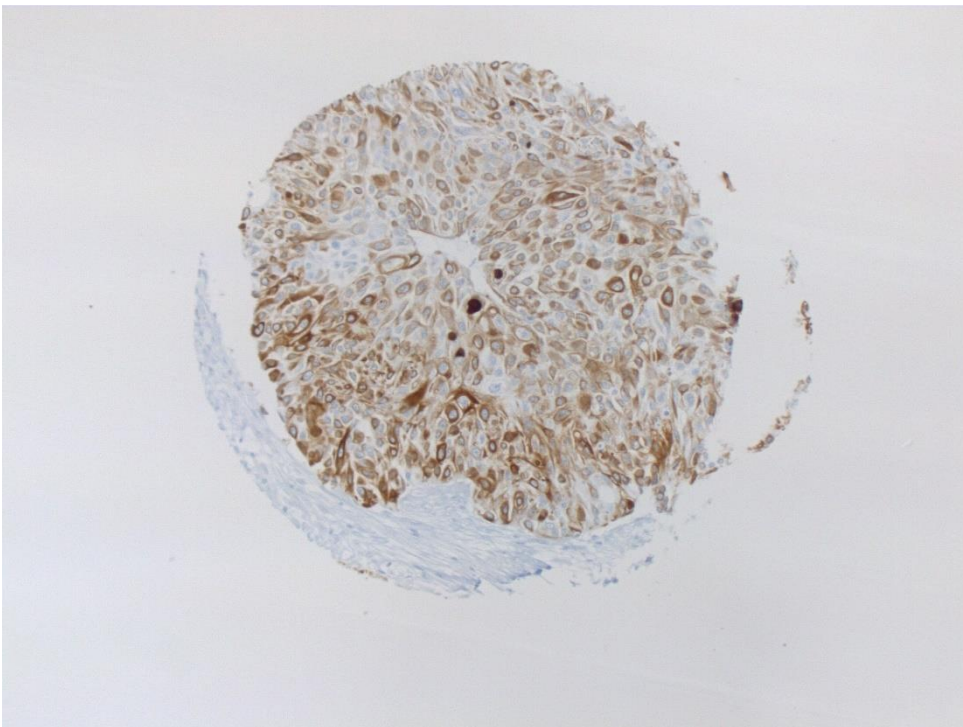


Figure 23 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-cytokératine 5/6. (*Grossissement X100*)

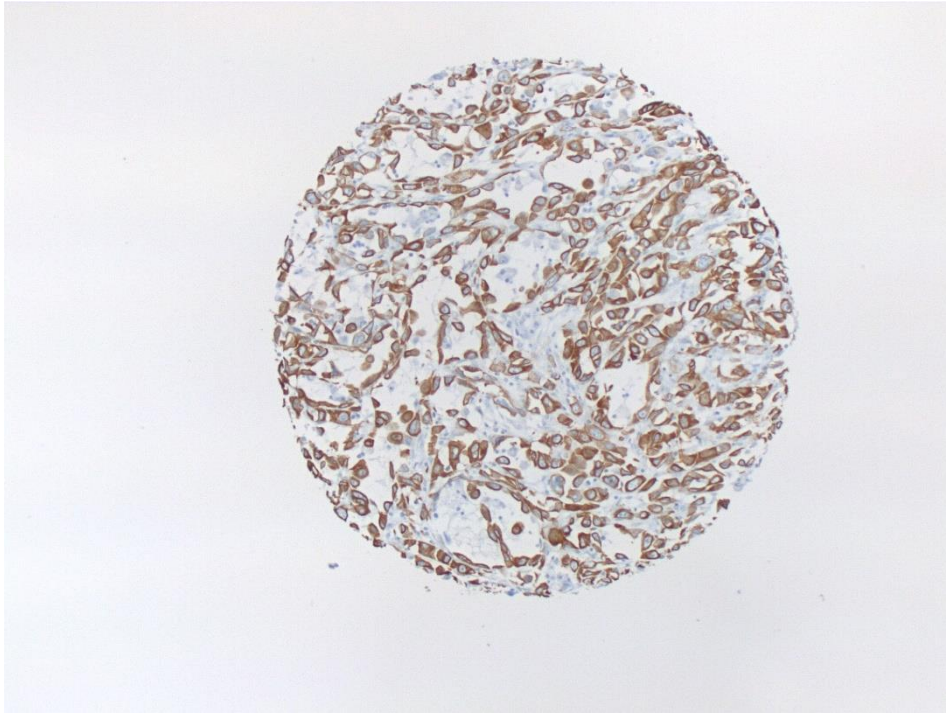


Figure 24 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-cytokératine 14.
(Grossissement X100)

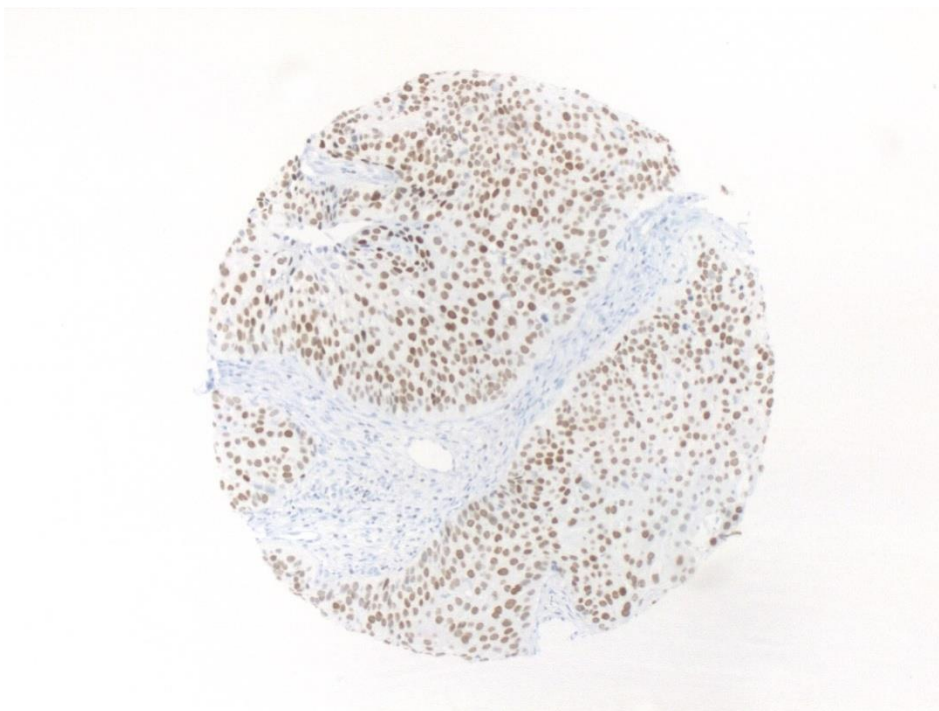


Figure 25 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-GATA3.
(Grossissement X100)

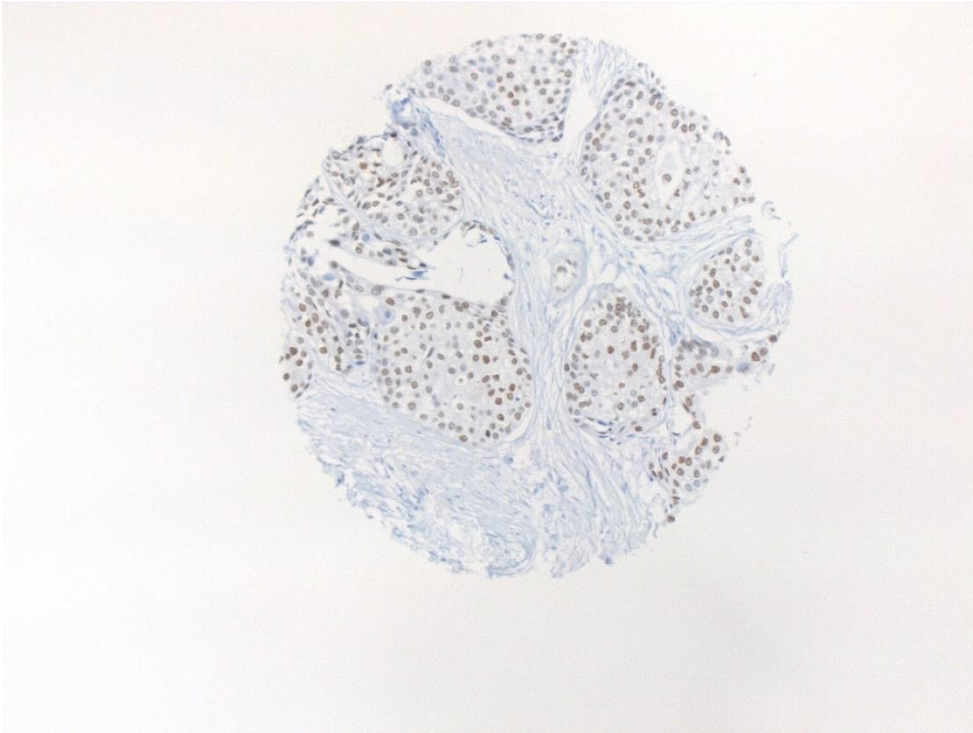


Figure 26 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-FOXA1. (*Grossissement X100*)

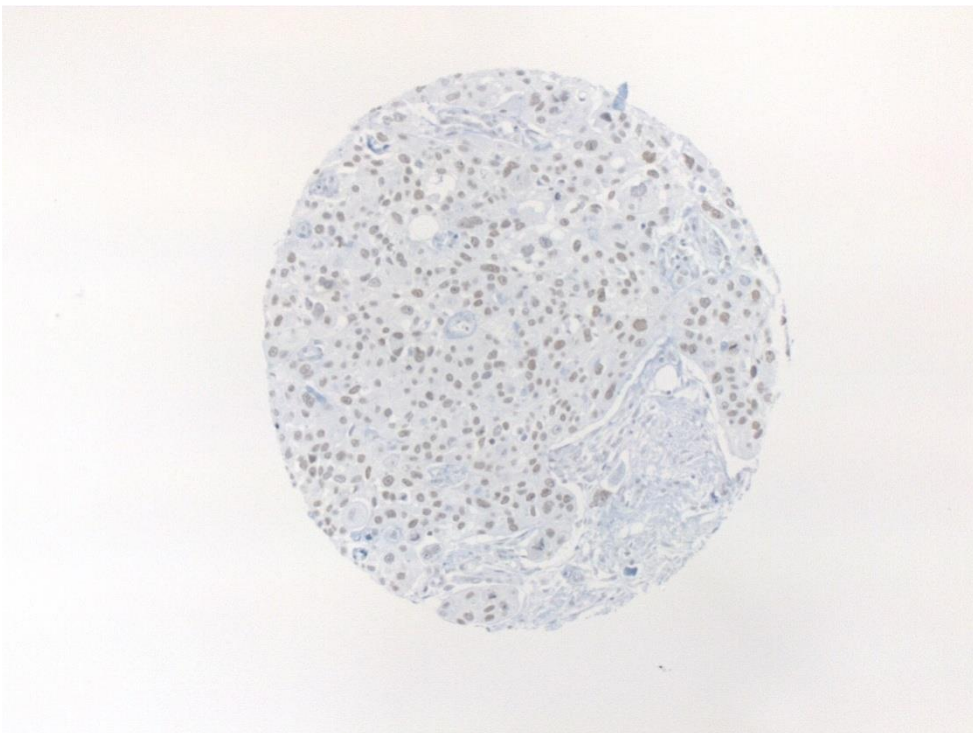


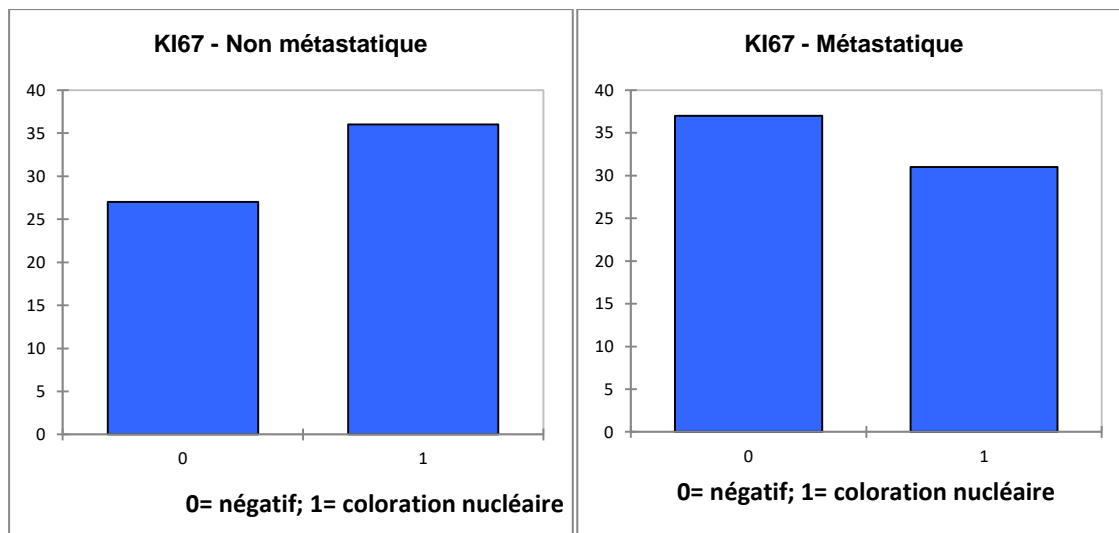
Figure 27 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-STAG2. (*Grossissement X100*)

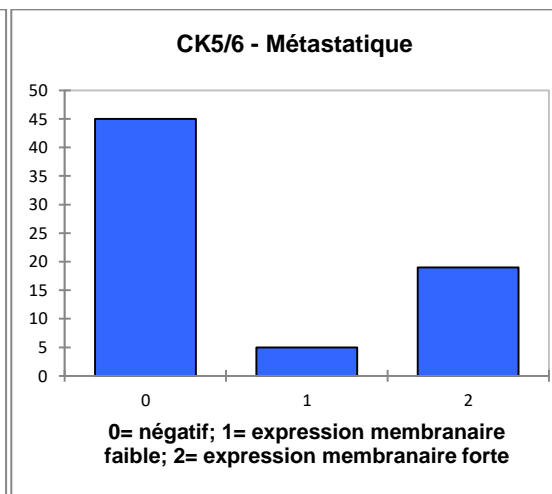
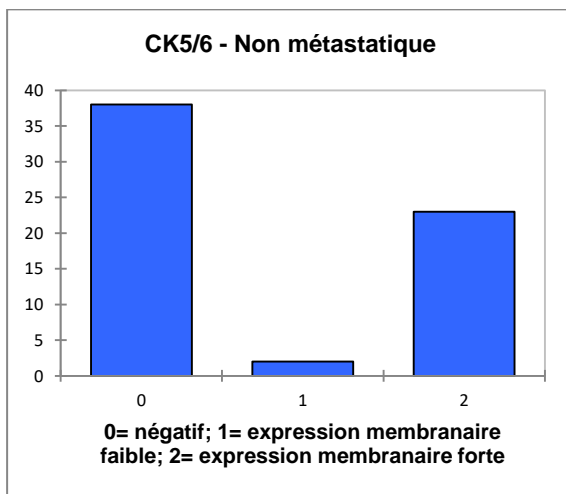
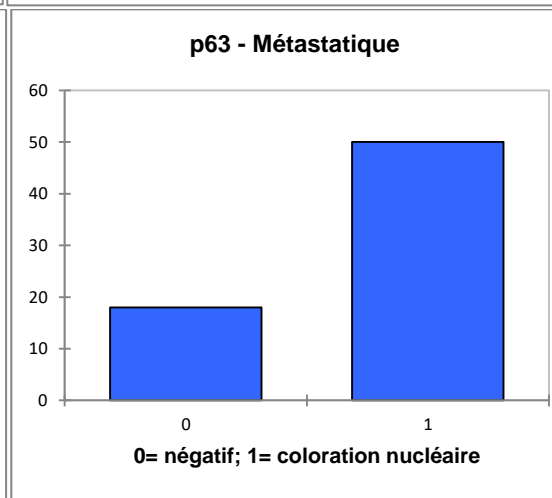
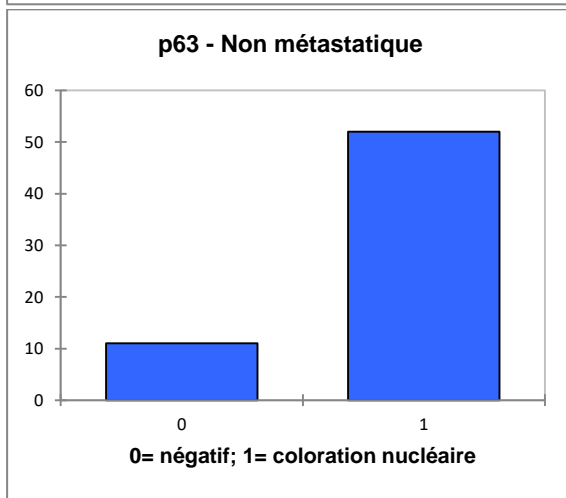
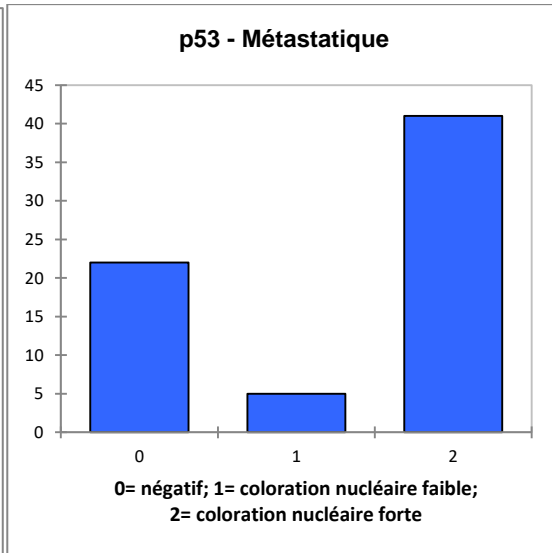
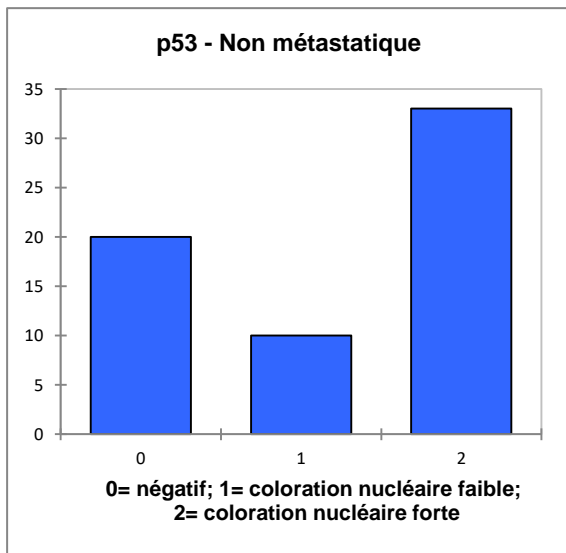
Nous avons comparé les cohortes de patients métastatiques et non métastatiques.

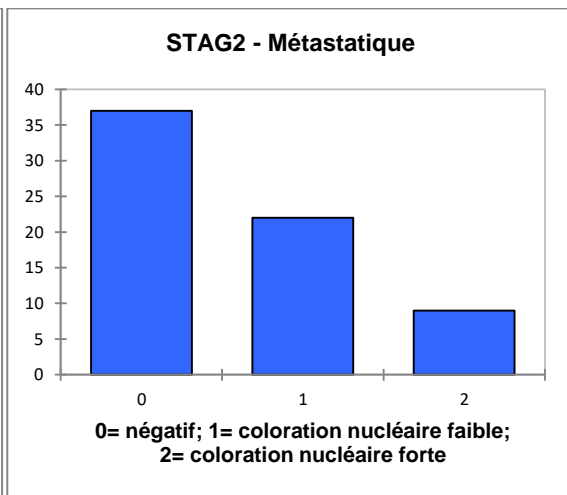
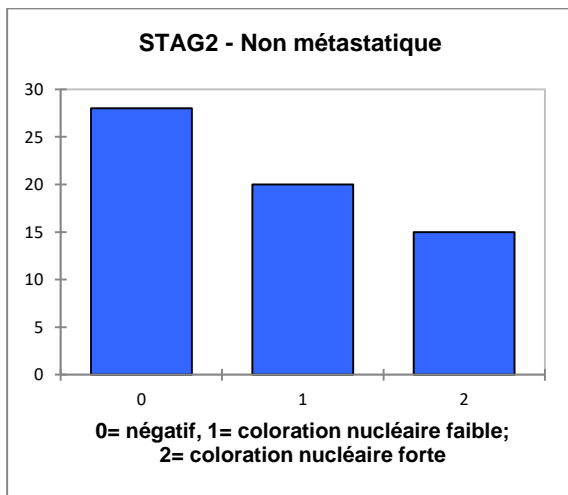
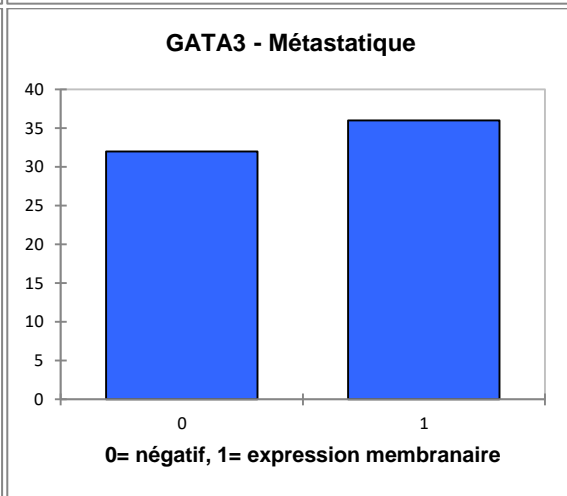
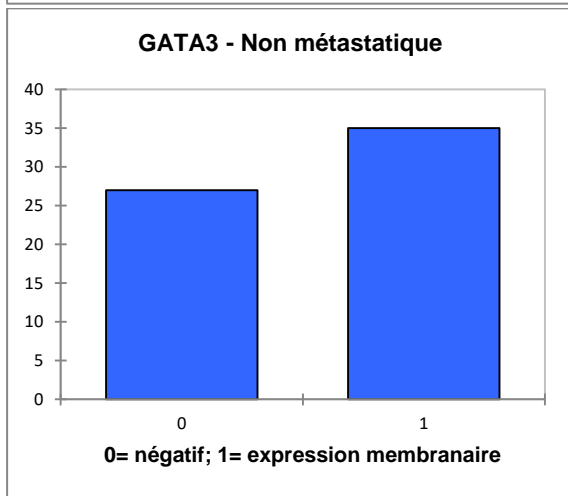
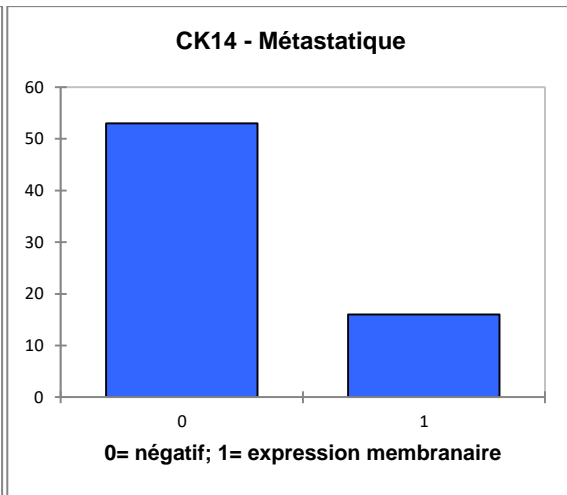
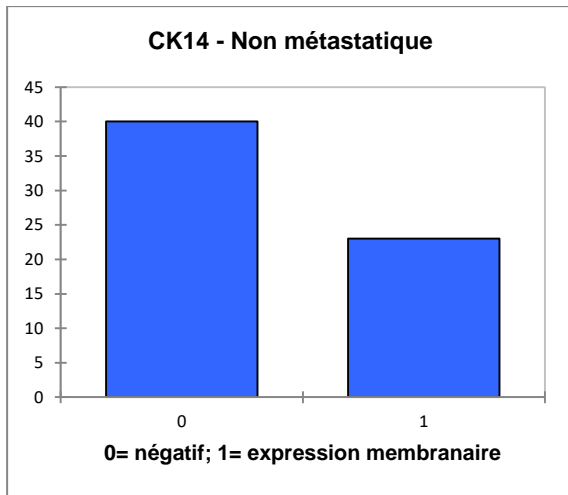
Pour tous les anticorps utilisés, aucune différence substantielle de marquage n'a été observée en comparant les résultats obtenus chez les patients métastatiques et non métastatiques (Tableau 17, Figure 28).

Anticorps\Marquage	Non métastatique			Métastatique			valeur de p
	négatif	positif	positif, fort	négatif	positif	positif, fort	
KI67	27	36		37	31		0,56
p53	20	10	33	22	5	41	0,79
p63	11	52		18	50		0,59
CK5/6	38	2	23	45	5	19	0,83
CK14	40	23		53	16		0,47
GATA3	27	35		32	36		0,86
STAG2	28	20	15	37	22	9	0,78
FOXA1	33	12	15	32	18	13	0,89

Tableau 17 : résumé des marquages immunohistochimiques réalisés sur la tumeur primitive pour la cohorte des patients non métastatiques comparée à la cohorte des patients métastatiques.







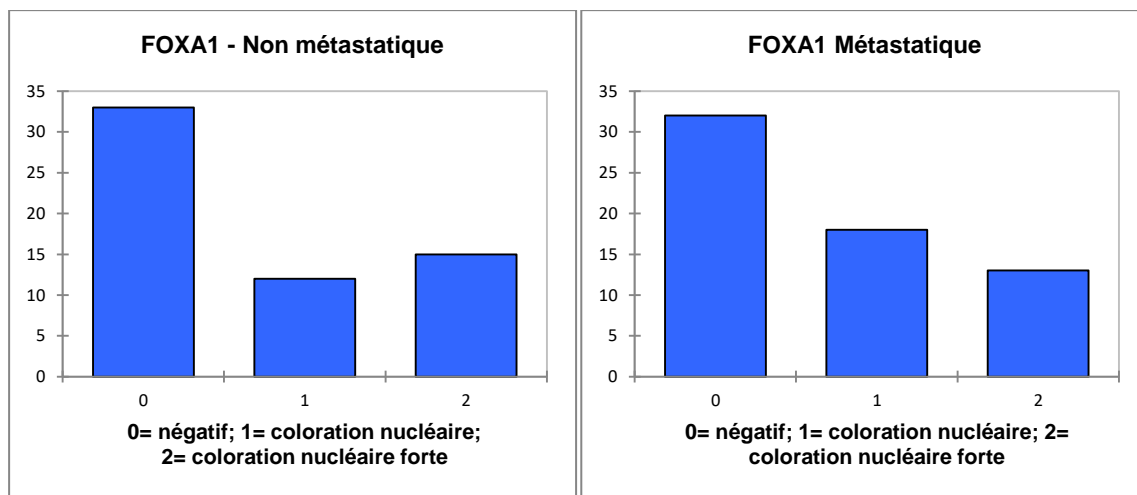


Figure 28 : Comparaison des résultats de marquage immunohistochimique obtenu en analysant les tumeurs des patients non métastatiques et métastatiques : pour les marquages voir le Tableau 14.

Une analyse groupée des caractéristiques basales et lumineales (établies à partir des résultats des immunomarquages CK5/6 et GATA3) ne montre pas de différence significative de répartition de ces deux types de tumeurs entre les cohortes métastatique et non métastatique. De même, la comparaison des résultats obtenus sur la tumeur primitive et le tissu métastatique montre que ce dernier garde un profil cohérent avec la tumeur primitive en termes de caractéristiques basales ou lumineales . (Tableau 18) .

	Tumeur primitive, non métastatique		Tumeur primitive, métastatique		Valeur de p
	absence	présence	absence	présence	
CK5 pos et GATA3 pos	54	8	60	9	-
CK5 neg et GATA3 neg	51	11	52	17	-
Profil basal	46	16	54	15	0,81
Profil luminal	35	27	42	27	0,82

Tableau 18 : comparaison entre profil immunohistochimique basal et luminal entre tumeur primitive non métastatique et métastatique.

IV.3.5 Discussion

L'un des enjeux du cancer de la vessie, est d'être capable d'identifier un ou des marqueurs capables de prédire l'évolution des lésions (récidive, progression), afin de ne pas laisser évoluer une lésion potentiellement agressive, en proposant une chirurgie lourde de façon précoce quand elle est nécessaire.

L'immunohistochimie, qui est une technique peu onéreuse et faisable en routine dans les laboratoires d'anatomopathologie, pourrait être réalisé pour avoir une idée de l'agressivité potentielle d'une tumeur notamment sur le possible risque de progression ou de récurrence.

Le choix des marqueurs utilisés pour cette étude a été basé sur l'idée d'explorer différents aspects impliqués dans la cancérogénèse, en terme de progression et d'envahissement, liés à la stabilité de l'ADN, la prolifération cellulaire et le profil basal. Notre analyse était focalisée sur les cancers de stade élevé, infiltrant le muscle. L'absence de différence de profil entre cancers infiltrants non métastatiques et métastatiques pourrait motiver à réaliser d'autres explorations en comparant les profils immunohistochimiques des cancers non infiltrants et infiltrants.

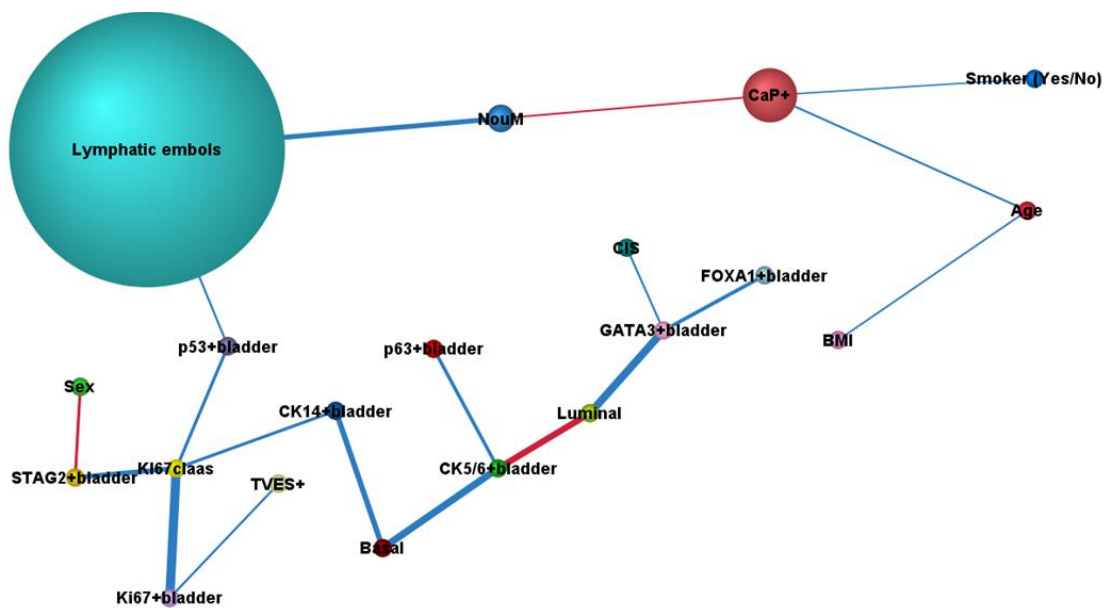


Figure 29 : Corrélations entre les facteurs cliniques, anatomo pathologiques et immunohistochimiques et la présence de métastase de cancer de la vessie (NouM).

Importance des nœuds en termes d'apport d'information sur la connaissance de NouM										
Nœud	Information mutuelle	Information mutuelle normalisée(%)	Importance relative	Valeur moyenne	G-test	Degrés de liberté	p-valeur	G-test (Données)	Degrés de liberté (Données)	p-valeur (Données)
Lymphatic em	0,0039	0,40%	1	0,5523	4,7614	1	2,91%	17,6084	1	0,00%
Ki67+bladder	0,0006	0,06%	0,1565	0,6208	0,7451	2	68,90%	4,3343	2	11,45%
CaP+	0,0005	0,05%	0,1352	0,3212	0,6438	1	42,23%	0,5133	1	47,37%
CK14+bladder	0,0004	0,04%	0,1114	0,2971	0,5302	1	46,65%	3,5558	1	5,93%
STAG2+bladder	0,0004	0,04%	0,1048	0,6894	0,4991	2	77,92%	0,3419	2	84,29%
p53+bladder	0,0004	0,04%	0,0962	1,2434	0,4581	2	79,53%	2,3801	2	30,42%
CK5/6+bladder	0,0003	0,03%	0,0791	0,6911	0,3765	2	82,84%	0,3989	2	81,92%
Ki67claa	0,0003	0,03%	0,0691	0,5127	0,3291	1	56,62%	2,5304	1	11,17%
p63+bladder	0,0002	0,02%	0,061	0,7795	0,2904	1	58,99%	2,7011	1	10,03%
FOXA1+bladder	0,0002	0,02%	0,0488	0,6993	0,2325	2	89,03%	2,656	2	26,50%
CIS	0,0002	0,02%	0,041	0,3999	0,1953	1	65,85%	4,6606	1	3,09%
Age	0,0002	0,02%	0,0402	67,0574	0,1915	2	90,87%	2,0236	2	36,36%
BMI	0	0,00%	0,0124	0,2491	0,0592	2	97,08%	3,278	2	19,42%
Smoker (Yes/No)	0	0,00%	0,0122	0,5245	0,058	1	80,98%	1,3328	1	24,83%
Basal	0	0,00%	0,0118	0,2372	0,0562	1	81,26%	0,314	1	57,53%
Luminal	0	0,00%	0,0104	0,4128	0,0495	1	82,40%	0,7691	1	38,05%
TVES+	0	0,00%	0,0084	0,0421	0,0401	1	84,13%	0,428	1	51,30%
GATA3+bladder	0	0,00%	0,0063	0,5465	0,0302	1	86,20%	0,2282	1	63,28%
Sex	0	0,00%	0,0036	0,7751	0,0173	1	89,54%	2,0332	1	15,39%

Tableau 19 : Coefficients de corrélation entre les nœuds du réseau bayésien présenté dans la Figure 29.

Nous ne pouvons pas non plus rejeter l'hypothèse que les marqueurs sélectionnés pour l'étude ne soient pas les plus pertinents. De nouveaux gènes d'intérêt vont certainement être identifiés par les analyses génomiques qui sont réalisés actuellement pour caractériser les sous-groupes de tumeurs. Les TMAs constitués au cours de cette étude pourront être utilisés pour évaluer la valeur pronostique des taux d'expression des protéines correspondantes.

La lecture du réseau bayésien (Figure 29) confirme la validité des observations cliniques et des prémisses introductives.

On observe une association entre âge et présence de foyers d'adénocarcinome prostatique, de diagnostic accidentel sur les pièces de cystoprostatectomie.

La présence de CIS est associée à un profil luminal.

Une nouvelle observation peut être extraite de nos données, et concerne la répartition des mutations STAG2 entre hommes et femmes.

Le gène codant pour la protéine STAG2 est localisé sur le chromosome X et son taux de mutation est associé au sexe. Ses mutations entraînent normalement des pertes d'expression de ce gène (66, 116). Sur notre cohorte, on observe aussi un taux de perte d'expression, qui se révèle être significativement plus élevé chez les hommes que chez les femmes.

Une explication de cette disparité significative, peut être reconduite au caryotype masculin XY, qui présente une seule copie du chromosome X et aurait une majeure probabilité de perte d'expression pour un gène inscrit sur ce chromosome, par rapport au sexe féminin (XX).

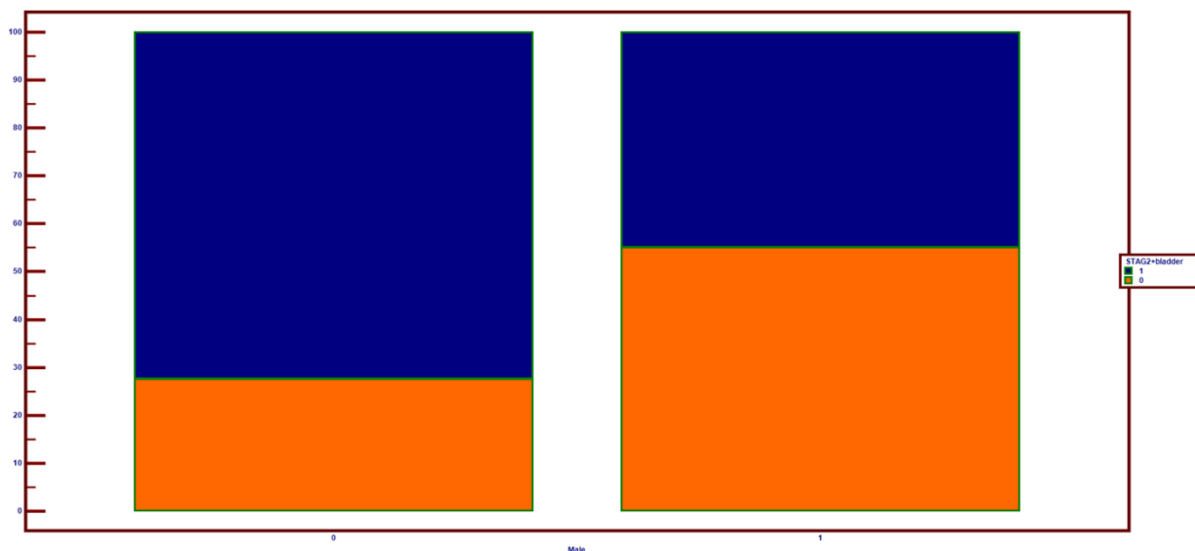


Figure 30 : Perte d'expression (orange) significativement supérieure chez les hommes (droite), par rapport aux femmes (gauche) $p = 0,0169$

Le seul élément significativement lié à la présence de métastase est la présence d'embolies lymphatiques ($p=0.02$) décrits histologiquement sur la pièce de cystectomie (Figure 29 et Tableau 19).

La comparaison des courbes de « survie » montre que la présence d'embolies lymphatiques est associée à un âge de cystectomie plus précoce (Figure 31).

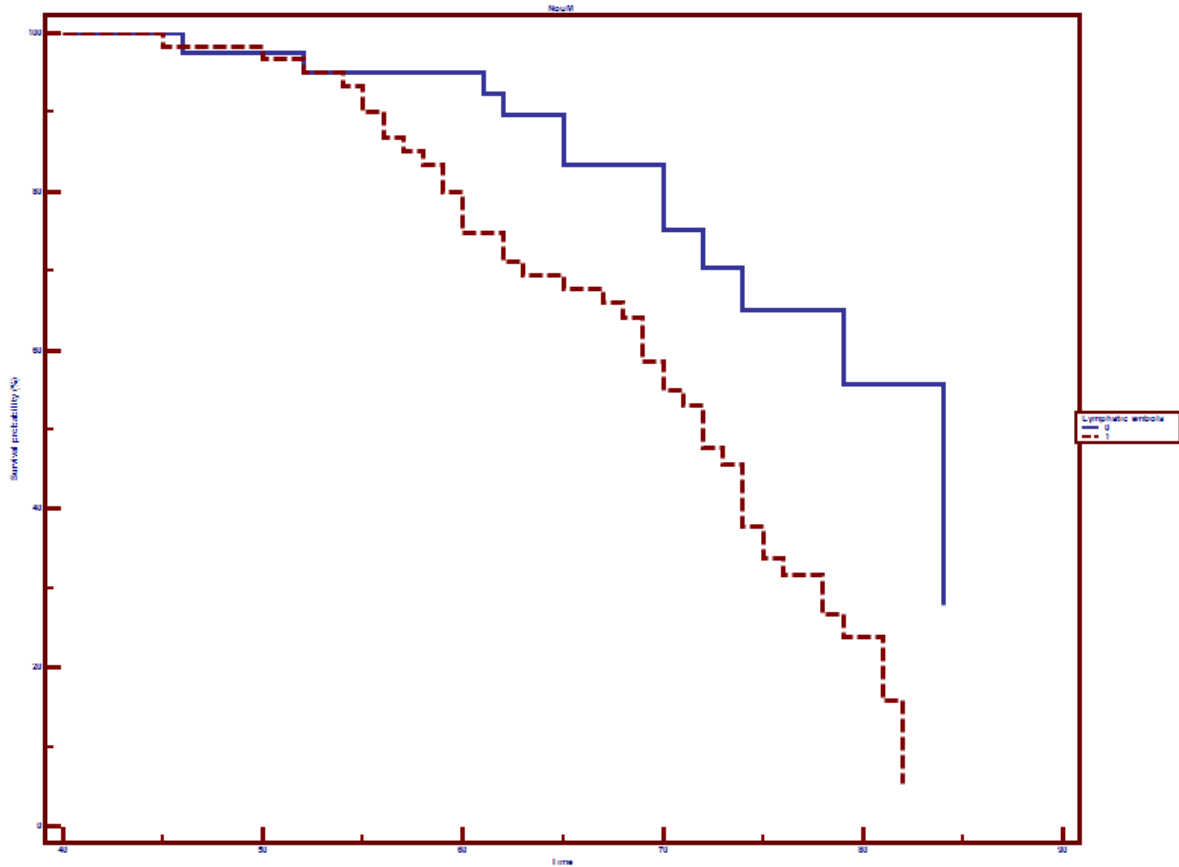


Figure 31 : Courbes de survie montrant une différence significative d'âge au moment du diagnostic du statut métastatique entre les patients présentant des embolies lymphatiques (rouge) et ceux qui n'en ont pas (bleu).

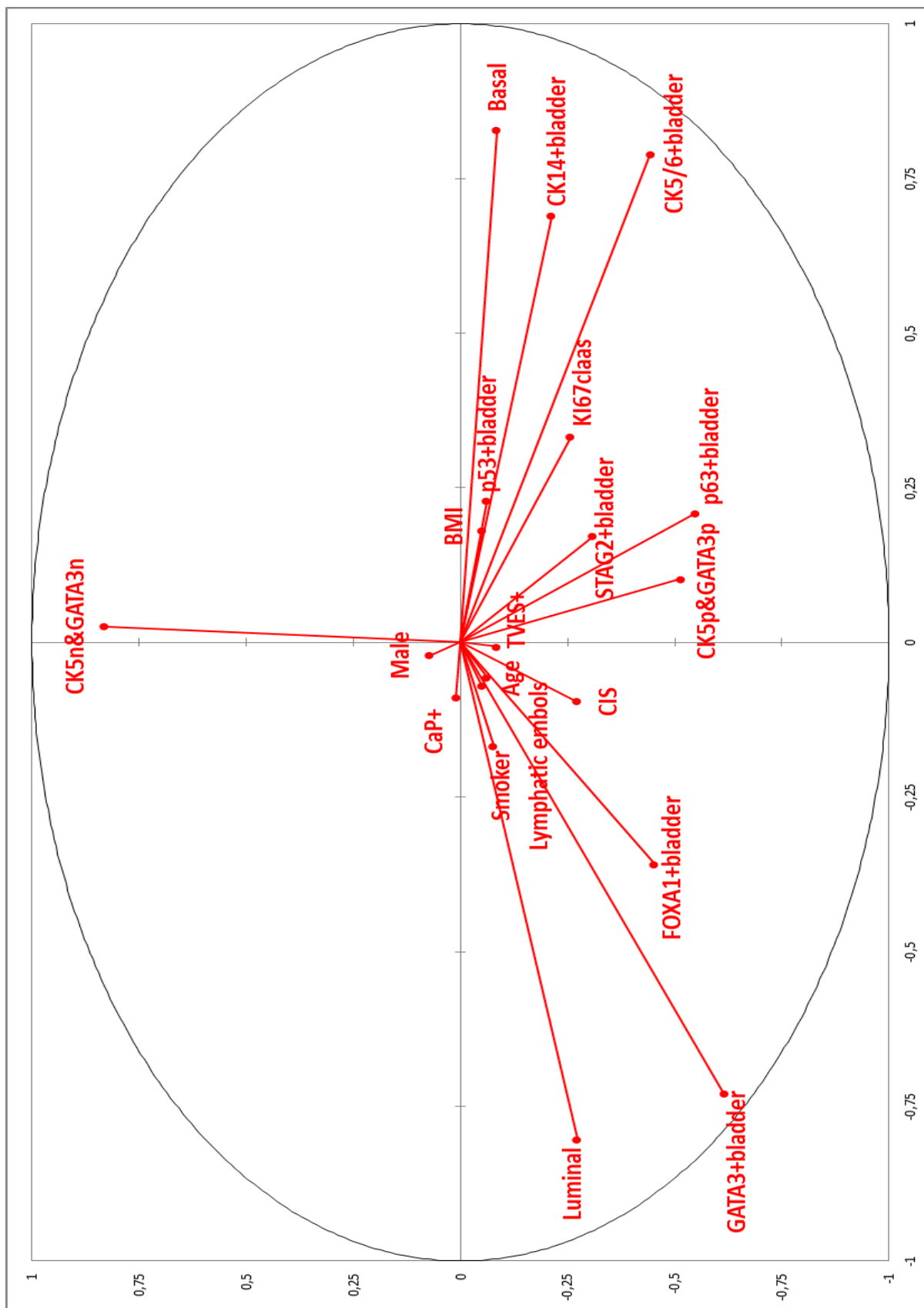


Figure 32 : association entre les facteurs cliniques et cancer de la vessie selon une Analyse en Composantes Principales.

La Figure 32 illustre une association entre profil luminal et marquage GATA3 et FOXA1 positif sur la tumeur primitive, ainsi que une proximité de ces marqueurs luminaux avec le CIS. Dans le IV cadran se situent les associations avec le profil basal, notamment les marquages CK5, CK6 et CK 14 positives.

Un contrôle de la validité de cette analyse est montré par la presque parfaite centralité de l'analyse apparemment contradictoire CK5neg&GATA3neg, qui sont respectivement marqueur basal et luminal. Si on les observe ensemble ils ne se situent ni dans le cadran basal, ni dans le luminal, et leur réciproque est parfaitement à l'opposée.

IV.3.5.1 Analyse en Composantes Principales des rapports entre tumeur primitive et métastase

Nous avons analysé par immunohistochimie une troisième série d'échantillons, après les prélèvements de tissu tumoral primitif non métastatique et métastatique.

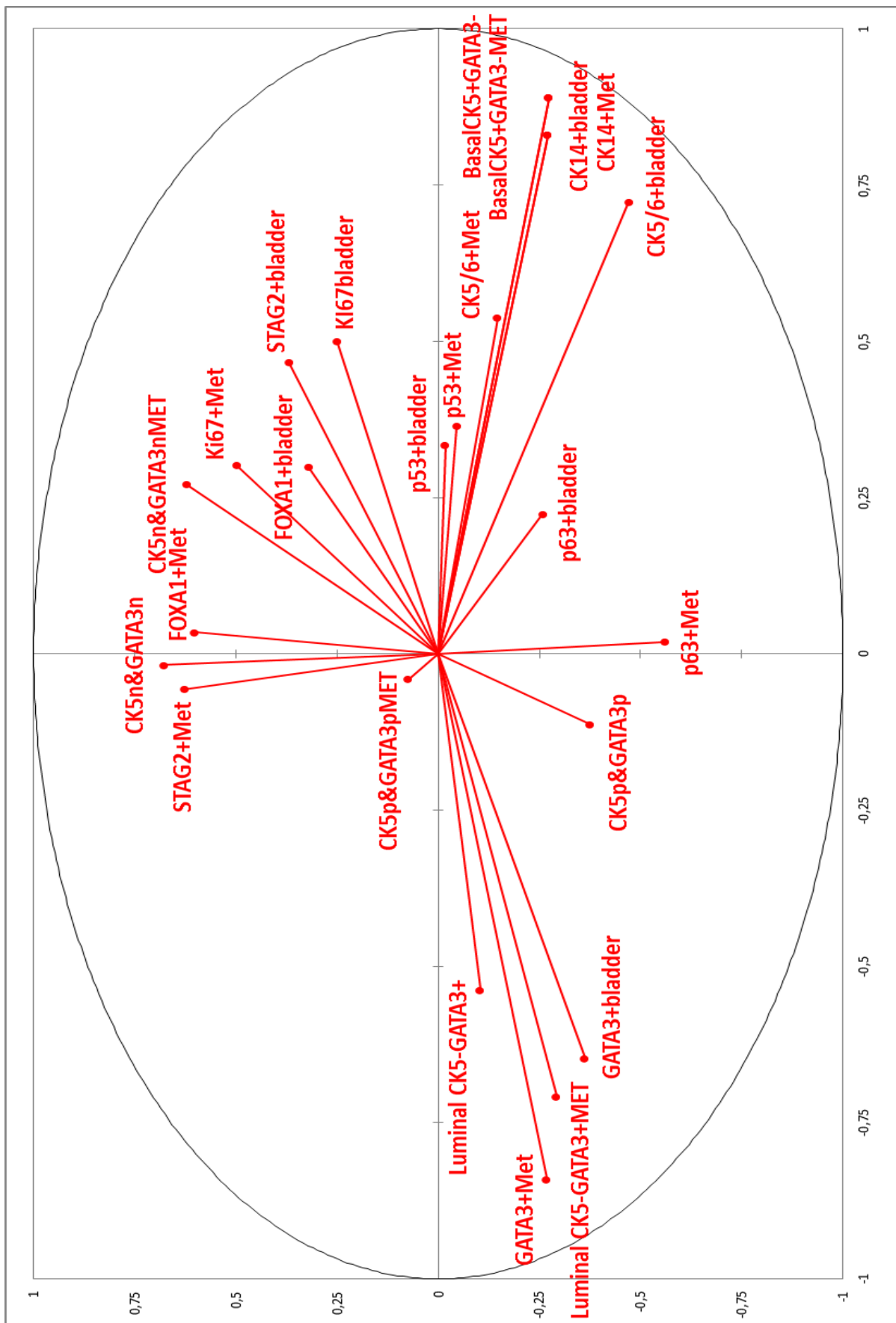


Figure 33 : association entre résultats immunohistochimiques de tumeur de vessie et de tissu métastatique selon une Analyse en Composantes Principales.

Le graphique de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) montrée en Figure 33 montre une association du profil luminal avec le marquage CK5 négatif et GATA3 positif en immunohistochimie, tant au niveau de la tumeur primitive que du tissu métastatique.

Indépendamment du marquage de CK5, la présence d'un marquage GATA3 positif semble associée à un profil luminal.

Les marqueurs liés au profil basal se situent de préférence dans le IV cadran. Le profil basal s'approche à une association immunohistochimique de CK5 positive et GATA3 négative.

La citokeratine 5/6 et encore plus la citokeratine 14 montrent la majeure concordance avec le profil basal. De plus, citokeratine 14 montre une forte concordance de positivité, dans le secteur basal, tant au niveau de la tumeur primitive que du tissu métastatique.

Nous observons une concordance étroite entre positivité de P53 tant au niveau vésical que métastatique.

Globalement, le marqueur GATA3 vésical est associé à un profil luminal.

Les marqueurs CK5/6, CK14 et p53 sont associés à un profil basal.

Les marqueurs p63, FOXA1, KI67 et STAG2, avec une concordance intermédiaire, sont orientés vers le profil basal.

Globalement, nous observons des altérations plutôt en faveur d'un profil basal, en raison de la population étudiée, qui se compose surtout de tumeurs de stade élevé (97,9% de stade pT2 et supérieur).

L'ensemble de ces observations, une fois intégrées fonctionnellement dans le parcours diagnostique dans la pratique clinique, pourrait avoir des implications importantes pour le choix du traitement, le pronostic, le développement clinique futur des agents ciblés, et la gestion de la maladie avec la chimiothérapie conventionnelle.

V. Conclusion

Ce travail a trouvé sa source dans un besoin clinique celui de pouvoir apporter des informations complémentaires sur la nature du cancer, sur son agressivité et par ce biais sur le pronostic associé. Cette analyse de tumeur de la vessie est certes préliminaire, mais elle est unique dans son concept. Outre l'anatomopathologie, l'existence de marqueurs d'agressivité ou de progression chez un patient peut aider le clinicien à décider plus facilement d'un traitement adjuvant après la résection de la tumeur ou à élaborer une stratégie thérapeutique personnalisée. Par la suite, une analyse par réseau Bayésien permettra peut-être une fois la totalité des analyses effectuées (CGH sur tumeur primitif et métastase) d'identifier la meilleure combinaison des marqueurs génétiques et cytogénétiques associées au stade et au grade tumoral, et au profil métastatique. L'établissement de profils génétiques distincts chez ces malades atteints de cancers urothéliaux à cellules transitionnelles pourrait permettre d'obtenir des outils supplémentaires pour améliorer la prise en charge tant en terme de diagnostic de la maladie elle-même ou pour la prévision du pronostic de celle-ci. On peut également imaginer, à l'avenir, que la recherche de ces marqueurs génétiques sur des fragments tumoraux urothéliaux prélevés sous endoscopie puissent conduire vers une attitude chirurgicale conservatrice et moins agressive que celle préconisée actuellement, et au développement de nouveaux outils de détection sur de simple prélèvements d'urines. En catégorisant les tumeurs en fonction de leur profil génétique et en le corrélant aux phénotypes des patients, on pourrait accéder à une nouvelle ère dans la prise en charge de ces tumeurs.

VI. Annexes

VI.1 Annexe 1 – Article Publié

Targeted Copy Number Variations Profiling of Non Muscle Invasive Bladder Urothelial Carcinoma Using BCA-1 Test on Urines Predicts High Grade Tumors

Lunelli L^{1,4}, Léon P^{1,2}, Cancel Tassin G^{1,2,3}, Sighar K⁶, Compérat E¹, Hugonin S⁵, Audouin M^{1,4}, Lacave R⁵ and Cussenot O^{1,3,4*}

¹Department of Urology, Sorbonne University - UPMC, France

²Academic Department of Urology, CHU Reims, France

³CeRePP - Pathologies Prostatiques - Centre de Recherche, France

⁴Academic Department of Urology, UPMC Sorbonne University, France

⁵Department of Tumor Biology, Hospital Tenon, France

⁶Arraygenomics, Voisins le Bretonneux, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received: 08 August 2017

Accepted: 02 October 2017

Published: 19 October 2017

Keywords:

NMI- TCC:

CNV:

UUT-TCC:

BCA1:

Cystoscopy

Copyright: © 2017 Cussenot O

Urol Res Ther J

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation this article: Cussenot O, Lunelli L, Léon P, Cancel Tassin G, Sighar K et al. Targeted Copy Number Variations Profiling of Non Muscle Invasive Bladder Urothelial Carcinoma Using BCA-1 Test on Urines Predicts High Grade Tumors. *Urol Res Ther J.* 2017; 1(1):113.

Correspondence:

Dr. Cussenot O,
Department of Urology, Hospital
Tenon, AP-HP, 4 rue de la Chine,
Paris, F-75020, France,
Email: olivier.cussenot@aphp.fr

ABSTRACT

Introduction: Urothelial carcinomas are the fourth leading cause of cancer in humans. Their incidence has increased by more than 50% in 25 years. Non Muscle Invasive Bladder Urothelial Carcinoma (NMI-TCC) represent 70% of newly diagnosed cases. Bladder NMI-TCC with high grades or pT1 stages require a close active surveillance regarding their significant risk of recurrence and progression to an invasive stage. From results obtained using DNA markers, It has been recognised that FGFR3 mutations were most associated to low grade and pTa NMI-TCC, while numerous CNV were associated to genetically instable tumors with high grade or pT1/pTis stage. The BCA-1 test provides a targeted copy number variations (CNV) profiling. So, we evaluated the predictive value of the FGFR3 mutations and BCA-1 test on urines in order to assess the tumoral grade and the stage of NMI-TCC.

Method: Urinary DNA was extracted from 50 patients with bladder NMI-TCC, with negative or non- informative urine cytology. The BCA1 test and identification of FGFR3 mutations (S249C; Y375C; G372C) was performed on urine samples. The molecular results were correlated with the tumoral pathological grade and stage.

Results: Each CNV locus was correlated to grade and stage. Gains at 8q, 11q and deletions at 9p 9q loci were the most informative CNV for high grade and pT1 prediction. A Bayesian model from molecular markers using urines CNV profiling predicts high grade and pT1 stage, with AUC respectively at 92% and 93%).

Conclusion: Our results showed that targeted CNV profiling using BCA-1 test on urines could be used as biomarkers during clinical management of bladder NMI-TCC, as a reliable predictor of tumors with high risk of recurrence and progression.

Introduction

Nearly 180,000 new cases of bladder cancer are diagnosed each year in the European Union, with a ratio male/female of 2/3. The main risk factor is due to cigarettes smoking habits. At the time of diagnosis, around 70% of bladder tumors are Non-Muscle Invasive Transitional Cell Carcinoma (NMI- TCC) [1].

The stages and grades distribution of the bladder **NMI-TCC** newly diagnosed are respectively about 60% as pTa, 40% as pT1 and <5% pTis. Half of the distribution of bladder NMI-TCC is tumor with high grade. Urinary cytology usually performed in clinical practice has a low sensitivity for low- grade tumors and require experimented pathologist to perform this examination [2]. It is currently recognized that cytology has a sensitivity of 69-92% for high-grade tumors but this does not make it a good monitoring test [2]. One common feature to many tumors is the presence of chromosomal anomalies which can be detected by studying DNA markers [3]. This particular characteristic of the tumoral genome was first used in bladder cancers to detect tumoral cells by studying DNA extracted from patient urine with the help of microsatellite markers [4,5]. Several teams, including us, have since reported results where this technique has been used to diagnose or monitor such tumors [6,7]. We and other have, also, previously shown that molecular urine test using a panel of genomic markers identified with a high sensitivity and specificity (over 85%), recurrence of bladder NMI-TCC [4,8]. Since then, BCA1-test based on a targeted CNV panel (60,000 probes with 50-60 base pairs) performed on urine shown no false positives in a population of patients with normal cystoscopy, normal cytology and no history of bladder cancer, and showed a sensitivity of 95% for detecting positive cystoscopies in patients monitored for bladder cancer [9].

We have now extended our study to the prospective analysis of patients with superficial bladder cancer in order to identify the best CNV markers able to predict tumors grade and/or stage.

Methods

A nested cohort of 50 patients with a bladder tumor was included in this study. The criteria for inclusion were firstly an indication of endoscopic bladder resection in the context of bladder NMI- TCC (<3cm) monitoring or recurrence; secondly, a negative or non-informative cytology; thirdly, no sign of **Upper Urinary Tract Tumors** (UUT-TCC) on CT-scan. All the patients gave their informed consent. The clinical data collected included

age, sex, age on diagnosis, upper urinary tract tumor history, smoker status (active, former or non-smoker). The following anatomic-pathological data about the bladder tumor were also collected: the stage and grade, and the mutational status of the FGFR3 gene for S249C; Y375C; G372C mutations [10].

Table 1: Characteristics of the 50 patients included.

	Number (%)
Men	44 (88%)
Women	6 (12%)
Median age on diagnosis (range)	67 (35-90)
Non-smoker	12 (24%)
Former-smoker	29 (58%)
Active Smoker	9 (18%)
UUT-TCC history	5 (10%)
pTa	36 (72%)
pT1	14 (28%)
High-grade	22 (44%)
FGFR3 Mutation (S249C, Y375C or G372C)	11 (22%)

Bladder NMI-TCC (<3cm), negative or non-informative cytology, no sign UUT-TCC on CT-scan

Collection of Urine Samples

Patients included in the cohort, have signed a consent according to their participation to the protocols Protocole 2011/24 NICB : (IRB 00003835 Institutional Review Board) Comité de Protection des Personnes Ile de France IV - Saint Louis, 1, Avenue Claude Vellefaux 75010 PARIS). Urine samples (50 ml) were collected before each intervention. After centrifuging the urine, the QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen) was used to extract the urinary DNA from the pellet obtained, complying with the supplier's recommendations. After validation of the quantity and quality of the extracted DNA, it was marked then hybridized on the BCA-Oligo array following the protocol described in Lorre et al. [8].

Briefly, the BioPrime kit (Life Technologies Invitrogen) was used in accordance with the supplier's recommendations to mark the tested DNA (with Cyanine 5) and the reference DNA (with Cyanine 3) [11,12]. After double purification, the first with the Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel) and the second with the Purelink® kit (Life Technologies), the two DNAs were mixed in equal quantity. The mixture was then incubated for 3 minutes at

97° C, then 30 minutes at 37° C in the presence of Cot-1 repeated DNA (1 mg/ml), the Agilent 2X Hybridization Buffer (Agilent Technologies) and the Agilent

10X Blocking Agent (Agilent Technologies). The mixture was then placed on the BCA-Oligo array for hybridization for 16 hours at 65° C.

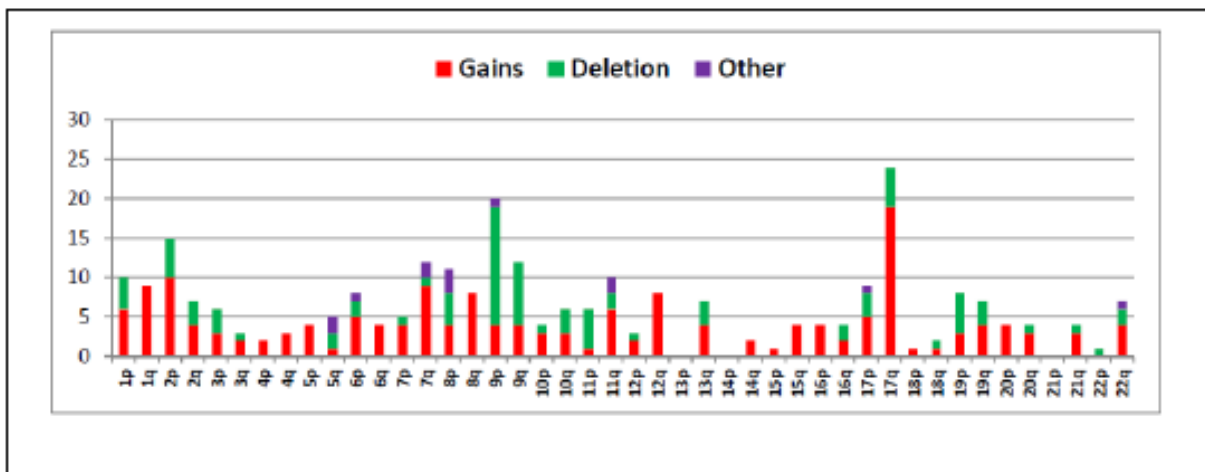
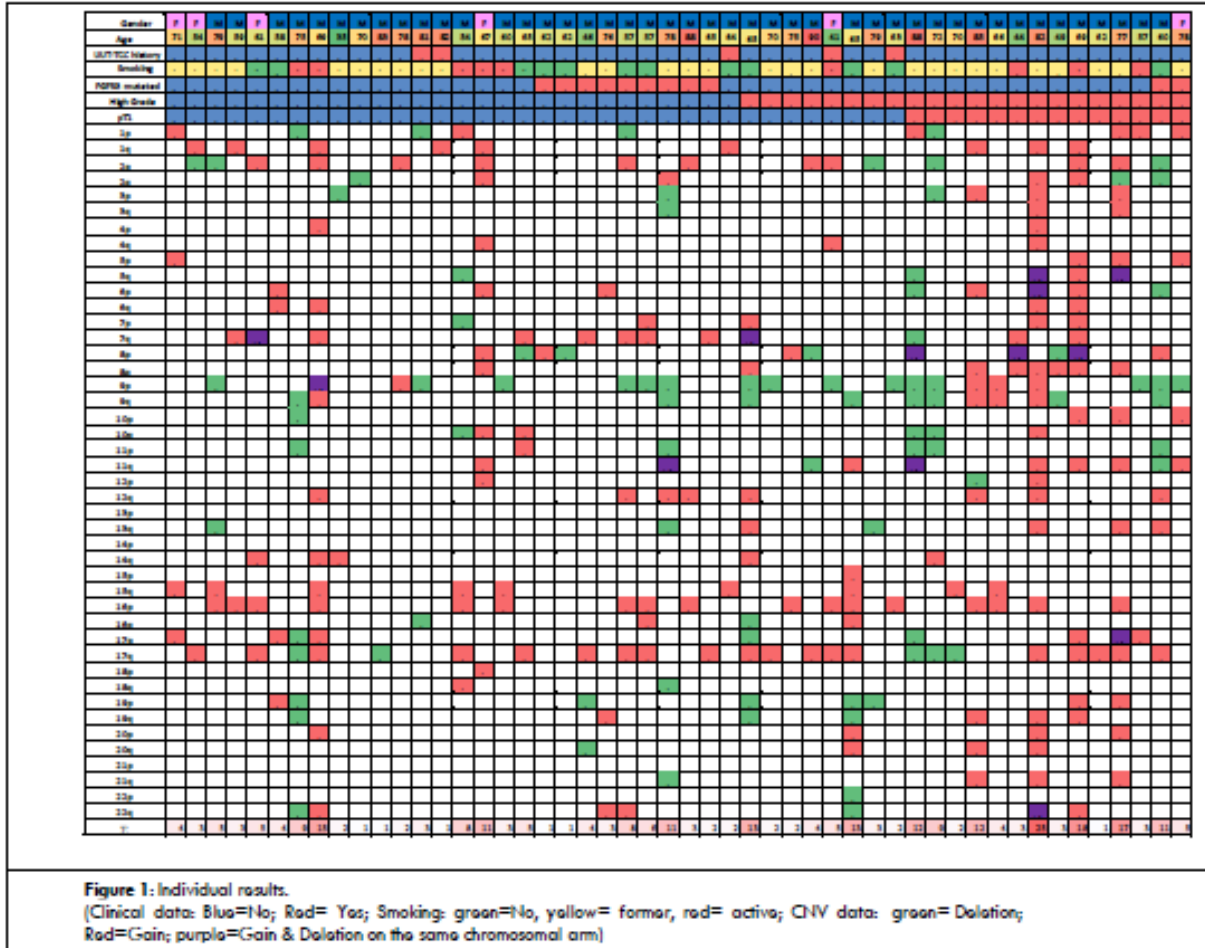
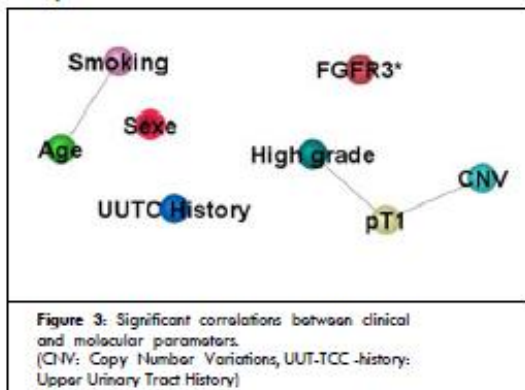
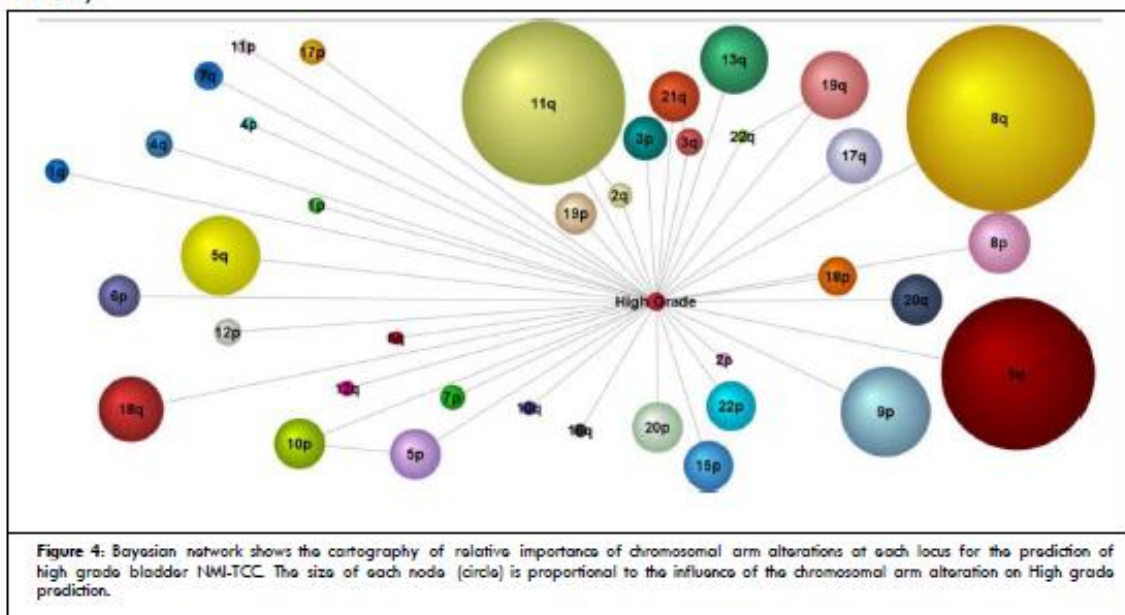


Figure 2: Distribution of Deletion (green), Gains (red) and association Gain+Deletion (Other: purple) by chromosomal arm.

After washing with the Wash Buffer washing solution (Agilent Technologies), the array was scanned using the Agilent High Resolution Scanner (Agilent Technologies). WorkBench software (Agilent Technologies) was used to analyze the results.



To interpret the outcome of the BCA-Oligo test, the median Log₂ normalized fluorescence value was calculated for each oligonucleotide. An oligonucleotide was considered deleted or amplified if its normalized average Log₂ ratio was lower or higher than -0.2 or 0.2 respectively. A chromosomal region was considered amplified or deleted if at least 6 successive oligonucleotides of the region were interpreted as gained or lost. If at least one chromosomal region was amplified or deleted, the test was considered positive for the study.



Targeted Copy Number Variations Profiling of Non Muscle Invasive Bladder Urothelial Carcinoma Using BCA-1 Test on Urinas Predicts High Grade Tumors. *Urol Res Ther J.* 2017; 1(1):113.

Statistics

Descriptive statistics were performed using (XLS-STAT® 2017.4). Correlations, relative importance and predictive models were performed using naïve and supervised Bayesian networks analysis (BayesiaLab BayesiaLab® 6.0.8, Laval, France). Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. [13]

Discussion

The management of bladder with a high grade or pT1/pTis stages require specific follow-up regarding the high risk (>50%) of recurrence or disease progression to muscle invasive stages [12,14]. Our study, using BCA-1 test on urine points out chromosomal locus, such as 8q or 11q or 9q with specific CNV related to high grade or pT1 bladder NMI-TCC. So, Zaharieva et al. [15] previously showed that the frequency of gains of the cMYC gene situated in 8q24 increases significantly with the grade and stage (frequency of 6% for grade G1, 12% for G2 and 20% for G3; 11% for pTa to 16% for pT1). In a study of 28 pTa and 28 pT1 tumors, Richter et al. [16] showed that the frequency of losses in 8p and gains in 3p, 8q and 10p was significantly higher in pT1 tumors. In another study of 64 Chinese patients with bladder tumors, the gains in 8q and 11q and the losses in 8p were more frequent in pT1 tumors than in pTa tumors [4].

A study of 46 superficial tumors showed that the losses in 8p and amplifications in 8q, 5q and 10p were more frequent at the pT1 stage [17]. FGFR3 mutation were frequently (40%) associated to low grade disease, but not exclusively. The fact that FGFR3 mutation are inconstant in low grade, enhance the fact negative FGFR3 mutation is not a reliable markers if used alone [10]. These results suggest that the use of CNV to predict the risk of aggressiveness or evolution of bladder NMI-TCC from DNA extracted from urine samples could be easily done. However, our predictive model needs to be confirmed on an independent larger cohort of patients.

Conclusion

As a complement to cytology, the identification of markers of aggressiveness in a patient can help the clinician to more easily take a decision on adjuvant therapy after resection of the tumor or to devise a personalized therapeutic strategy. Establishing distinct genetic profiles of patients with bladder NMI-TCC could help to improve care in terms of both diagnosis and prognosis assessment.

Personal interests

Karim Sighar is an employee of Array Genomics, which helped to develop and market the BCA-oligo test (BCA-1). The other authors state that they have no personal interests.

Results

The characteristics of the population studied were presented in the Table 1. Individual results were presented in (Figure 1). The distribution and the typology (Gains, Deletions, Others) of each targeted locus for CNV profile were shown on (Figure 2). The cartography of the relationship between clinical, pathological and molecular factors is represented on (Figure 3). Significant correlations are link between age and smoking habits (Pearson R: -0.7; p value<0.001), high grade and stage pT1 (Pearson R: 0.7 ; p value<0.001) ; stage pT1 and CNV (Pearson R: 0.5 ; p value: 0.002). The informativeness each target locus for high grade was shown on Figure 4. The more informative (relative importance >0.3) markers were gains at 8q ,11q and deletions at 9q. From this cartography the predictive

value of the Bayesian model give an AUC respectively at 92% and 93% for high grade and pT1.

References

1. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, et al. (2013). Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol.* 63: 234-241.
2. Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, et al. (2017). EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol.* 71: 447-461.
3. Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Askin F, Sidransky D, et al. (1994). Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 9871-9875.
4. Qin SL, Chen XJ, Xu X, Shou JZ, Bi XG, et al. (2006). Detection of chromosomal alterations in bladder transitional cell carcinomas from Northern China by comparative genomic hybridization. *Cancer Lett.* 238: 230-239.
5. Steiner G, Schoenberg MP, Linn JF, Mao L, Sidransky D, et al. (1997). Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine. *Nat Med.* 3: 621-624.
6. Mourah S, Cussenot O, Vimont V, Desgrandchamps F, Soliman H, et al. (1998). Assessment of microsatellite instability in urine in the detection of transitional-cell carcinoma of the bladder. *Int J Cancer.* 79: 629-633
7. Van Rhijn BW, Lurkin I, Kirkels WJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC, et al. (2001). Microsatellite analysis -DNA test in urine competes with cystoscopy in follow-up of superficial bladder carcinoma: a phase II trial. *Cancer.* 92: 768-775.
8. Larré S, Camparo P, Comperat E, Traxer O, Roupret M, et al. (2011). Diagnostic, staging and grading of urothelial carcinomas from urine: performance of BCA-1, a mini-array comparative genomic hybridization based test. *Eur Urol.* 59: 250-257.
9. Cussenot O, Sighar K, Mohammed M, Hugonin S, Ondet V, et al. (2014). Detection of specific chromosomal aberrations in urine using BCA-1 (oligo-

CGH-array) enhances diagnostic sensitivity and predicts the aggressiveness of non-muscle-invasive bladder transitional cell carcinoma. *World J Urol.* 32: 551-557.

10. Couffignal C, Desgrandchamps F, Mongiat-Artus P, Ravery V, Ouzaid I, et al. (2015). The Diagnostic and Prognostic Performance of Urinary FGFR3 Mutation Analysis in Bladder Cancer Surveillance: A Prospective Multicenter Study. *Urology.* 86: 1185-1190.

11. Hoglund M, Sall T, Heim S, Heim S, Mitelman F, et al. (2001). Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways in transitional cell carcinoma. *Cancer Res.* 61: 8241-8246.

12. Hoque MO, Lee CC, Cairns P, Schoenberg M, Sidransky D, et al. (2003). Genome-wide genetic characterization of bladder cancer: a comparison of high-density single-nucleotide polymorphism arrays and PCR-based microsatellite analysis. *Cancer Res.* 63: 2216-2222.

13. Roupret M, Hupertan V, Yates DR, Comperat E, Catto JW, et al. (2008). A comparison of the performance of microsatellite and methylation urine analysis for predicting the recurrence of urothelial cell carcinoma, and definition of a set of markers by Bayesian network analysis. *BJU Int.* 101: 1448-1453.

14. Comperat E, Varinot J. (2016). Immunochemical and molecular assessment of urothelial neoplasms and aspects of the 2016 World Health Organization classification. *Histopathology.* 717-726.

15. Zaharieva B, Simon R, Ruiz C, Oeggerli M, Mihatsch MJ, et al. (2005). High-throughput tissue microarray analysis of CMYC amplification in urinary bladder cancer. *Int J Cancer.* 117: 952- 956.

16. Richter J, Jiang F, Gorog JP, Sartorius G, Egenter C, et al. (1997). Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 57: 2860-2864.

17. Simon R, Burger H, Brinkschmidt C, Bocker W, Hertle L, et al. (1998). Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *Am J Surg.* 185 : 345-351.

VI.2 Annexe 2 – Mots clés

Ki 67,
p53,
STAG2,
immunohistochemistry,
bladder cancer,
stromal antigen,
prognosis,
cohesion.

VII. Glossaire

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
AS-PCR : Allèle spécifique-réaction de polymérisation en chaîne
BAC : Chromosome artificiel bactérien (Bacterial Artificial Chromosome)
BCAR 1 : Gène suppresseur de tumeur (=p130Cas)
BCG : Bacille de Calmette et Guérin
BTNL 2 : Butyrophilin-like 2
CeRePP : Centre de Recherche sur les Pathologies Prostatiques
CGH : Puce à ADN d'hybridation génomique comparative (Comparative Genomic Hybridization)
CIS : Carcinome In Situ
CNV/CNA: Copy Number Variation- Copy Number Alteration
DAB : Diaminobenzidine
EDTA : Ethylène diamine tétra acétique
EORTC: Organization européenne pour la recherche et le traitement du cancer (European Organisation for Research and Treatment of Cancer)
FGF: facteur de croissance des fibroblastes (Fibroblast Growth Factor)
FGFR3 : récepteur 3 au facteur de croissance des fibroblastes (Fibroblast Growth Factor Receptor 3)
Glo : β globuline
H&E : Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine
IHC : Immunohistochimie
Ki67 : Antigène Ki67
P53 : Protéine p53
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
Qsp : Quantité suffisante pour
Rpm : Rotation par minute
SDS : Dodecyl-sulfate de sodium
RT : Rétro-transcription
RTUV : Résection Trans-Urétrale de Vessie
STAG2 : Gène impliqué dans le processus de cohésion et ségrégation des chromatides sœurs.
SNP : Polymorphisme d'un seul nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism)
TCGA. The Cancer Genome Atlas
TMAs : Tissus micro arrays
TRAILR2 : Récepteur 2 à TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand)
TRIS : trishydroxyméthylaminométhane, ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
TV : Tumeur de vessie
TVNIM : Tumeur de vessie non infiltrant le muscle
TVIM : Tumeur de vessie infiltrant le muscle

VIII. Table des illustrations

Figure 1 : Tumeurs de vessie selon le stade tumoral.....	8
Figure 2 : Algorithme issu des recommandations 2010 en onco-urologie pour le suivi des TVNIM en fonction du risque de récurrence et/ou progression (24).....	13
Figure 3 : Classifications de sous-groupes moléculaires du cancer de la vessie obtenues par 4 équipes différentes (UNC : University of Northern California, MDA : University of Texas MD Anderson Cancer Center, TCGA: The Cancer Genome Atlas, Lund: Lund University, Sweden) (A), et les gènes différentiellement exprimés pour chacun (B). D'après Aine et al. (47).	17
Figure 4 : Fréquence et type des mutations observées dans 412 tumeurs de vessie (52).....	23
Figure 5 : Distribution des altérations chromosomiques (gains en rouge et pertes en bleu), les plus fréquemment observées dans les tumeurs urothéliales par analyse en CGH sur puce ADN dans le cadre du projet TCGA (51).	24
Figure 6 : Distribution des altérations chromosomiques les plus fréquentes dans les 4 différents clusters de profil mutationnel identifiés par le TCGA par l'analyse de 412 tumeurs de vessie (51).....	25
Figure 7 : Répartition des CNVs (G : gain et D : délétion) dans les différentes tumeurs en fonction du stade tumoral.	30
Figure 8 : Analyse de la variance (ANOVA) entre les fréquences des mutations des stades pTa (gauche), pT1 (milieu) et pT2 (droite)	31
Figure 9 : Pour chaque bras chromosomique, la fréquence des gains est représentée respectivement en bleu pour les tumeurs de stade tumoral pTa, en rouge pour les pT1, et en vert pour les pT2.	31
Figure 10 : Pour chaque bras chromosomique, la fréquence des délétions est représentée respectivement en bleu pour les tumeurs de stade tumoral pTa, en rouge pour les pT1, et en vert pour les pT2.	31
Figure 11 : Superposition des profils d'altérations chromosomiques pour les différents stades tumoraux, pTa (bleu), pT1 (orange) et pT2 (rouge) par bras chromosomique.	32
Figure 12 : Pour chaque bras chromosomique, la fréquence des altérations chromosomiques (gain + perte) est représentée respectivement en bleu pour les tumeurs de stade tumoral pTa, en rouge pour les pT1, et en vert pour les pT2.....	32
Figure 13 : Réseau Bayésien mettant en évidence la relation entre altérations chromosomiques et le risque de cancer de la vessie de stade tumoral pT2. La taille des cercles est proportionnelle à leur association avec ce stade.	33
Figure 14 : Fréquence et distribution des altérations chromosomiques (gain, perte ou gain+perte) selon l'analyse réalisée avec la puce BCA1-oligo à partir de l'ADN urinaire de 50 patients avec un carcinome urothélial (80).	36
Figure 15 : Corrélations significatives entre les paramètres cliniques et moléculaires. (CNV : altérations chromosomiques, UUTC History : histoire personnelle de tumeur des voies urinaires supérieures, Smoking : statut tabagique; High grade : haut grade).....	36
Figure 16 : Réseau Bayésien mettant en évidence la relation entre altérations chromosomiques et le risque de cancer de la vessie de haut grade (80). La taille des cercles est proportionnelle à leur association avec un haut grade.	37

Figure 17 : Exemple d'un secteur d'une lame de TMA avec trois séries de trois coupes, coloration hématoxyline et éosine. (<i>Grossissement X25</i>)	49
Figure 18 : Comparaison des âge à la cystectomie (en haut) et de l'indice de masse corporelle (BMI, en bas) chez les patients non métastatiques (0) et métastatiques (1).....	52
Figure 19 : Présence d'embolies lymphatiques chez les patients métastatiques (0) et non métastatiques (1). Différence significative entre les deux groupes (p= 0,029).....	53
Figure 20 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-Ki67/MIB1. (<i>Grossissement X100</i>)	54
Figure 21 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-p53. (<i>Grossissement X100</i>)	54
Figure 22 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-p63. (<i>Grossissement X100</i>)	55
Figure 23 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-cytokératine 5/6. (<i>Grossissement X100</i>)	55
Figure 24 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-cytokératine 14. (<i>Grossissement X100</i>)	56
Figure 25 : Exemple de marquage e positif obtenu avec l'anticorps anti-GATA3. (<i>Grossissement X100</i>)	56
Figure 26 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-FOXA1. (<i>Grossissement X100</i>)	57
Figure 27 : Exemple de marquage positif obtenu avec l'anticorps anti-STAG2. (<i>Grossissement X100</i>)	57
Figure 28 : Comparaison des résultats de marquage immunohistochimique obtenu en analysant les tumeurs des patients non métastatiques et métastatiques : pour les marquages voir le Tableau 14.....	61
Figure 29 : Corrélations entre les facteurs cliniques, anatomo pathologiques et immunohistochimiques et la présence de métastase de cancer de la vessie (NouM).	62
Figure 30 : Perte d'expression (orange) significativement supérieure chez les hommes (droite), par rapport aux femmes (gauche) p = 0,0169.....	64
Figure 31 : Courbes de survie montrant une différence significative d'âge au moment du diagnostic du statut métastatique entre les patients présentant des embolies lymphatiques (rouge) et ceux qui n'en ont pas (bleu).	65
Figure 32 : association entre les facteurs cliniques et cancer de la vessie selon une Analyse en Composantes Principales.....	66
Figure 33 : association entre résultats immunohistochimiques de tumeur de vessie et de tissu métastatique selon une Analyse en Composantes Principales.	68

IX. Table des tableaux

Tableau 1 : Classification TNM (Tumor, Nodes and Metastasis) 2017 pour le tumeur de vessie (17)	9
Tableau 2 : Classification OMS 2016 des lésions urothéliales non infiltrantes (19).	10
Tableau 3 : Table de l'EORTC pour la prédiction de la récurrence et de la progression des tumeurs de vessie n'envahissant pas le muscle (22).	11
Tableau 4 : Caractéristiques des 3 groupes de risque de tumeurs vésicales.	11
Tableau 5 : Recommandations 2010 en onco-urologie pour la prise en charge des tumeurs urothéliales non infiltrantes en fonction de leur risque de récurrence et/ou progression (24).	12
Tableau 6 : Calendrier de suivi des TVINM en fonction des groupes de risque	15
Tableau 7 : Associations significatives entre 8 altérations chromosomiques (perte et gain) et des caractéristiques cliniques (70).....	25
Tableau 8 : Caractéristiques de la population étudiée. (BMI= index de masse corporelle- <i>body mass index</i>).....	45
Tableau 9 : distribution des stades tumoraux pour la population étudiée	45
Tableau 10 :Caractéristiques de la population étudiée par immunohistochimie.....	46
Tableau 11 : Caractéristiques de la population étudiée par immunohistochimie.....	46
Tableau 12 : nombre d'analyses TMA réalisées après évaluation de la base clinique et des lames anatomo pathologiques. (TMA= Tissue Micro Array, M- : non métastatique ; M+ : métastatique).	47
Tableau 13 : Description et dilution des anticorps	50
Tableau 14 : Interprétation des résultats des immunomarquages pour chaque anticorps	51
Tableau 15 : Comparaison de la répartition selon le sexe et selon le statut tabagique chez les patients non métastatiques et métastatiques. (f : femme; m : homme; n : non-fumeur, y : fumeur actuel ou ancien).	53
Tableau 16 : résumé des associations entre TVES (tumeur de la voie excrétrice supérieure), CIS (carcinome <i>in situ</i>), carcinome prostatique et embolies lymphatiques et tumeur de la vessie dans la cohorte non métastatique et métastatique de la population générale. En jaune la valeur significative.	53
Tableau 17 : résumé des marquages immunohistochimiques réalisés sur la tumeur primitive pour la cohorte des patients non métastatiques comparée à la cohorte des patients métastatiques.	58
Tableau 18 : comparaison entre profil immunohistochimique basal et luminal entre tumeur primitive non métastatique et métastatique.	61
Tableau 19 : Coefficients de corrélation entre les nœuds du réseau bayésien présenté dans la Figure 29.	63

X. Bibliographie

1. Irani J. [Epidemiology of bladder cancer]. *Progres en urologie : journal de l'Association française d'urologie et de la Société française d'urologie*. 2003;13(5 Suppl 2):1207-8. Epub 2005/04/09. *Epidemiologie du cancer de vessie*.
2. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *International journal of cancer*. 2000;86(2):289-94. Epub 2000/03/30.
3. Burch JD, Rohan TE, Howe GR, et al. Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: a case-control study. *International journal of cancer*. 1989;44(4):622-8. Epub 1989/10/15.
4. Zeegers MP, Tan FE, Dorant E, van Den Brandt PA. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer*. 2000;89(3):630-9. Epub 2000/08/10.
5. GUY L. Les Tumeurs de Vessie d'Origine Professionnelle. *Progrès en urologie Formation médicale continue*. 2007;17(4):18-24.
6. Imbernon E, Goldberg M, MARCHAND J, GILG SOIT ILG A, CARTON M. Estimation du nombre de cas de cancers attribuables à des facteurs professionnels. *Archives des maladies professionnelles et de médecine du travail*. 2003;64(6).
7. Provenzano PP, Keely PJ. The role of focal adhesion kinase in tumor initiation and progression. *Cell adhesion & migration*. 2009;3(4):347-50. Epub 2009/08/20.
8. Chen LM, Nergard JC, Ni L, Rosser CJ, Chai KX. Long-term exposure to cigarette smoke extract induces hypomethylation at the RUNX3 and IGF2-H19 loci in immortalized human urothelial cells. *PloS one*. 2013;8(5):e65513. Epub 2013/06/01.
9. Brownson RC, Chang JC, Davis JR. Occupation, smoking, and alcohol in the epidemiology of bladder cancer. *American journal of public health*. 1987;77(10):1298-300. Epub 1987/10/01.
10. Bruemmer B, White E, Vaughan TL, Cheney CL. Nutrient intake in relation to bladder cancer among middle-aged men and women. *American journal of epidemiology*. 1996;144(5):485-95. Epub 1996/09/01.
11. Gago-Dominguez M, Castela JE, Yuan JM, Yu MC, Ross RK. Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk. *International journal of cancer*. 2001;91(4):575-9. Epub 2001/03/17.
12. Sun CL, Yuan JM, Arakawa K, Low SH, Lee HP, Yu MC. Dietary soy and increased risk of bladder cancer: the Singapore Chinese Health Study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2002;11(12):1674-7. Epub 2002/12/24.
13. Zeegers MP, Tan FE, Verhagen AP, Weijenberg MP, van den Brandt PA. Elevated risk of cancer of the urinary tract for alcohol drinkers: a meta-analysis. *Cancer causes & control : CCC*. 1999;10(5):445-51. Epub 1999/10/26.

14. Wu X, Lin X, Dinney CP, Gu J, Grossman HB. Genetic polymorphism in bladder cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2007;12:192-213. Epub 2006/11/28.
15. Andrew AS, Gui J, Hu T, et al. Genetic polymorphisms modify bladder cancer recurrence and survival in a USA population-based prognostic study. *BJU international*. 2015;115(2):238-47. Epub 2014/03/29.
16. Gu J, Wu X. Genetic susceptibility to bladder cancer risk and outcome. *Personalized medicine*. 2011;8(3):365-74. Epub 2011/09/20.
17. Brierley JD GM, Wittekind C (Eds). *TNM classification of malignant tumors*. UICC International Union Against Cancer. 8th edn.2017.
18. May M, Brookman-Amisshah S, Roigas J, et al. Prognostic accuracy of individual urologists in noninvasive urinary bladder carcinoma: a multicentre study comparing the 1973 and 2004 World Health Organisation classifications. *European urology*. 2010;57(5):850-8. Epub 2009/04/07.
19. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. *The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours*. *European urology*. 2016;70(1):106-19. Epub 2016/03/22.
20. Irani J. [Treatment of non-muscle infiltrating tumours of the bladder]. *Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie*. 2009;19(4):248-53. Epub 2009/03/31. Prise en charge des tumeurs de vessie n'infiltrant pas le muscle (TVNIM).
21. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *European urology*. 2006;49(3):466-5; discussion 75-7. Epub 2006/01/31.
22. Babjuk M, Bohle A, Burger M, et al. *EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016*. *European urology*. 2017;71(3):447-61. Epub 2016/06/22.
23. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, et al. *EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013*. *European urology*. 2013;64(4):639-53. Epub 2013/07/06.
24. Pfister C, Roupret M, Wallerand H, et al. [Recommendations Onco-Urology 2010: Urothelial tumors]. *Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie*. 2010;20 Suppl 4:S255-74. Epub 2010/12/07. *Recommandations en Onco-Urologie 2010: Tumeurs urotheliales*.
25. Alfred Witjes J, Le Bret T, Comperat EM, et al. *Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer*. *European urology*. 2017;71(3):462-75. Epub 2016/07/05.
26. Almallah YZ, Rennie CD, Stone J, Lancashire MJ. Urinary tract infection and patient satisfaction after flexible cystoscopy and urodynamic evaluation. *Urology*. 2000;56(1):37-9. Epub 2000/06/28.
27. Karmouni T, Bensalah K, Alva A, Patard JJ, Lobel B, Guille F. [Role of antibiotic prophylaxis in ambulatory cystoscopy]. *Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie*. 2001;11(6):1239-41. Epub 2002/02/28. *Place de l'antibioprophylaxie lors d'une cystoscopie en ambulatoire*.
28. Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse JA, et al. Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *The Journal of urology*. 1999;161(2):388-94. Epub 1999/01/23.

29. Miyoshi Y, Matsuzaki J, Miura T. [Evaluation of usefulness of urinary nuclear matrix protein 22 (NMP22) in the detection of urothelial transitional cell carcinoma]. *Hinyokika kyo Acta urologica Japonica*. 2001;47(6):379-83. Epub 2001/08/11.
30. Paoluzzi M, Cuttano MG, Mugnaini P, Salsano F, Giannotti P. Urinary dosage of nuclear matrix protein 22 (NMP22) like biologic marker of transitional cell carcinoma (TCC): a study on patients with hematuria. *Archivio italiano di urologia, andrologia : organo ufficiale [di] Societa italiana di ecografia urologica e nefrologica*. 1999;71(1):13-8. Epub 1999/04/08.
31. Quek P, Chin CM, Lim PH. The role of BTA stat in clinical practice. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*. 2002;31(2):212-6. Epub 2002/04/18.
32. Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G, et al. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *The Journal of urology*. 2002;168(5):1950-4. Epub 2002/10/24.
33. Grossman HB. New methods for detection of bladder cancer. *Seminars in urologic oncology*. 1998;16(1):17-22. Epub 1998/03/21.
34. Kannan V, Bose S. Low grade transitional cell carcinoma and instrument artifact. A challenge in urinary cytology. *Acta cytologica*. 1993;37(6):899-902. Epub 1993/11/01.
35. Leyh H, Marberger M, Conort P, et al. Comparison of the BTA stat test with voided urine cytology and bladder wash cytology in the diagnosis and monitoring of bladder cancer. *European urology*. 1999;35(1):52-6. Epub 1999/02/06.
36. Maier U, Simak R, Neuhold N. The clinical value of urinary cytology: 12 years of experience with 615 patients. *Journal of clinical pathology*. 1995;48(4):314-7. Epub 1995/04/01.
37. Witjes JA, Comperat E, Cowan NC, et al. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *European urology*. 2014;65(4):778-92. Epub 2014/01/01.
38. Munoz JJ, Ellison LM. Upper tract urothelial neoplasms: incidence and survival during the last 2 decades. *The Journal of urology*. 2000;164(5):1523-5. Epub 2000/10/12.
39. Cosentino M, Palou J, Gaya JM, Breda A, Rodriguez-Faba O, Villavicencio-Mavrich H. Upper urinary tract urothelial cell carcinoma: location as a predictive factor for concomitant bladder carcinoma. *World journal of urology*. 2013;31(1):141-5. Epub 2012/05/04.
40. Xylinas E, Rink M, Margulis V, Karakiewicz P, Novara G, Shariat SF. Multifocal carcinoma in situ of the upper tract is associated with high risk of bladder cancer recurrence. *European urology*. 2012;61(5):1069-70. Epub 2012/03/10.
41. Li WM, Shen JT, Li CC, et al. Oncologic outcomes following three different approaches to the distal ureter and bladder cuff in nephroureterectomy for primary upper urinary tract urothelial carcinoma. *European urology*. 2010;57(6):963-9. Epub 2010/01/19.
42. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. *European urology*. 2011;59(6):997-1008. Epub 2011/04/05.
43. Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R, Kirkali Z. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *European urology*. 2006;49(5):798-805. Epub 2006/01/31.

44. Abouassaly R, Alibhai SM, Shah N, Timilshina N, Fleshner N, Finelli A. Troubling outcomes from population-level analysis of surgery for upper tract urothelial carcinoma. *Urology*. 2010;76(4):895-901. Epub 2010/07/22.
45. Yakoubi R, Colin P, Seisen T, et al. Radical nephroureterectomy versus endoscopic procedures for the treatment of localised upper tract urothelial carcinoma: a meta-analysis and a systematic review of current evidence from comparative studies. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2014;40(12):1629-34. Epub 2014/08/12.
46. Roupret M, Babjuk M, Comperat E, et al. European Association of Urology Guidelines on Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma: 2017 Update. *European urology*. 2017. Epub 2017/09/05.
47. Aine M, Eriksson P, Liedberg F, Hoglund M, Sjodahl G. On Molecular Classification of Bladder Cancer: Out of One, Many. *European urology*. 2015;68(6):921-3. Epub 2015/07/29.
48. Choi W, Porten S, Kim S, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer cell*. 2014;25(2):152-65. Epub 2014/02/15.
49. Choi YJ, Lee SH, Lee JL, et al. Phase II study of pemetrexed in combination with cisplatin in patients with advanced urothelial cancer: the PECULIAR study (KCSG 10-17). *British journal of cancer*. 2015;112(2):260-5. Epub 2014/11/28.
50. McConkey DJ, Choi W, Ochoa A, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney CP. Therapeutic opportunities in the intrinsic subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2015;29(2):377-94, x-xi. Epub 2015/04/04.
51. The Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma.
52. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*. 2017;171(3):540-56 e25. Epub 2017/10/11.
53. Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, et al. FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*. 2003;63(23):8108-12. Epub 2003/12/18.
54. Neuzillet Y, Paoletti X, Ouerhani S, et al. A meta-analysis of the relationship between FGFR3 and TP53 mutations in bladder cancer. *PloS one*. 2012;7(12):e48993. Epub 2012/12/29.
55. Spruck CH, 3rd, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M, et al. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*. 1994;54(3):784-8. Epub 1994/02/01.
56. van Rhijn BW, Lurkin I, Chopin DK, et al. Combined microsatellite and FGFR3 mutation analysis enables a highly sensitive detection of urothelial cell carcinoma in voided urine. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(1):257-63. Epub 2003/01/23.
57. Vojtesek B, Bartek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *Journal of immunological methods*. 1992;151(1-2):237-44. Epub 1992/07/06.
58. Sullivan KD, Galbraith MD, Andrysik Z, Espinosa JM. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell death and differentiation*. 2017. Epub 2017/11/11.

59. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, et al. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol.* 2001;158(6):1955-9. Epub 2001/06/08.
60. Ho JR, Chapeaublanc E, Kirkwood L, et al. Deregulation of Rab and Rab effector genes in bladder cancer. *PloS one.* 2012;7(6):e39469. Epub 2012/06/23.
61. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, et al. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nature genetics.* 1999;23(1):18-20. Epub 1999/09/02.
62. van Rhijn BW, van Tilborg AA, Lurkin I, et al. Novel fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutations in bladder cancer previously identified in non-lethal skeletal disorders. *European journal of human genetics : EJHG.* 2002;10(12):819-24. Epub 2002/12/04.
63. Fadl-Elmula I. Chromosomal changes in uroepithelial carcinomas. *Cell & chromosome.* 2005;4:1. Epub 2005/08/09.
64. van Oers JM, Lurkin I, van Exsel AJ, et al. A simple and fast method for the simultaneous detection of nine fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder cancer and voided urine. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2005;11(21):7743-8. Epub 2005/11/10.
65. Steiner G, Schoenberg MP, Linn JF, Mao L, Sidransky D. Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine. *Nature medicine.* 1997;3(6):621-4. Epub 1997/06/01.
66. Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, et al. Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science (New York, NY).* 2011;333(6045):1039-43. Epub 2011/08/20.
67. Li X, Zhang TW, Tang JL, et al. Loss of STAG2 causes aneuploidy in normal human bladder cells. *Genetics and molecular research : GMR.* 2015;14(1):2638-46. Epub 2015/04/14.
68. Taylor CF, Platt FM, Hurst CD, Thygesen HH, Knowles MA. Frequent inactivating mutations of STAG2 in bladder cancer are associated with low tumour grade and stage and inversely related to chromosomal copy number changes. *Human molecular genetics.* 2014;23(8):1964-74. Epub 2013/11/26.
69. Guo G, Sun X, Chen C, et al. Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nature genetics.* 2013;45(12):1459-63. Epub 2013/10/15.
70. broadinstitute. 2016.
71. Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994;91(21):9871-5. Epub 1994/10/11.
72. Baron A, Mastroeni F, Moore PS, et al. Detection of bladder cancer by semi-automated microsatellite analysis of urine sediment. *Advances in clinical pathology : the official journal of Adriatic Society of Pathology.* 2000;4(1):19-24. Epub 2000/08/11.
73. Schneider A, Borgnat S, Lang H, et al. Evaluation of microsatellite analysis in urine sediment for diagnosis of bladder cancer. *Cancer Res.* 2000;60(16):4617-22. Epub 2000/09/02.
74. van Rhijn BW, Lurkin I, Kirkels WJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. Microsatellite analysis--DNA test in urine competes with cystoscopy in follow-up of superficial bladder carcinoma: a phase II trial. *Cancer.* 2001;92(4):768-75. Epub 2001/09/11.

75. Irani J. [New diagnostic tests for urothelial tumors of the bladder]. *Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie*. 1998;8(4):481-6. Epub 1998/12/03. Les nouveaux tests diagnostiques des tumeurs urotheliales de vessie.
76. Konety BR, Getzenberg RH. Urine based markers of urological malignancy. *The Journal of urology*. 2001;165(2):600-11. Epub 2001/02/15.
77. Lokeshwar VB, Soloway MS. Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfill clinical necessity? *The Journal of urology*. 2001;165(4):1067-77. Epub 2001/03/21.
78. Cussenot O, Sighar K, Mohammed M, et al. Detection of specific chromosomal aberrations in urine using BCA-1 (oligo-CGH-array) enhances diagnostic sensitivity and predicts the aggressiveness of non-muscle-invasive bladder transitional cell carcinoma. *World journal of urology*. 2014;32(2):551-7. Epub 2013/11/08.
79. Larre S, Camparo P, Comperat E, et al. Diagnostic, staging, and grading of urothelial carcinomas from urine: performance of BCA-1, a mini-array comparative genomic hybridisation-based test. *European urology*. 2011;59(2):250-7. Epub 2010/11/09.
80. Lunelli L CO, Léon P, Cancel Tassin G, Sighar K et al. Targeted Copy Number Variations Profiling of Non Muscle Invasive Bladder Urothelial Carcinoma Using BCA-1 Test on Urines Predicts High Grade Tumors. *Urol Res Ther J*. 2017(2017; 1(1):113.).
81. Hoque MO, Lee CC, Cairns P, Schoenberg M, Sidransky D. Genome-wide genetic characterization of bladder cancer: a comparison of high-density single-nucleotide polymorphism arrays and PCR-based microsatellite analysis. *Cancer Res*. 2003;63(9):2216-22. Epub 2003/05/03.
82. Zaharieva B, Simon R, Ruiz C, et al. High-throughput tissue microarray analysis of CMYC amplification in urinary bladder cancer. *International journal of cancer*. 2005;117(6):952-6. Epub 2005/06/30.
83. Richter J, Jiang F, Gorog JP, et al. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*. 1997;57(14):2860-4. Epub 1997/07/15.
84. Qin SL, Chen XJ, Xu X, et al. Detection of chromosomal alterations in bladder transitional cell carcinomas from Northern China by comparative genomic hybridization. *Cancer letters*. 2006;238(2):230-9. Epub 2005/08/30.
85. Simon R, Burger H, Brinkschmidt C, Bocker W, Hertle L, Terpe HJ. Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *The Journal of pathology*. 1998;185(4):345-51. Epub 1998/11/26.
86. Couffignal C, Desgrandchamps F, Mongiat-Artus P, et al. The Diagnostic and Prognostic Performance of Urinary FGFR3 Mutation Analysis in Bladder Cancer Surveillance: A Prospective Multicenter Study. *Urology*. 2015;86(6):1185-90. Epub 2015/09/15.
87. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International journal of cancer*. 1983;31(1):13-20. Epub 1983/01/15.
88. Wang L, Feng C, Ding G, et al. Ki67 and TP53 expressions predict recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(4):2989-95. Epub 2013/11/19.

89. Wang L, Feng C, Ding G, Zhou Z, Jiang H, Wu Z. Relationship of TP53 and Ki67 expression in bladder cancer under WHO 2004 classification. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2013;18(2):420-4. Epub 2013/07/03.
90. Enache M, Simionescu C, Lascu LC. Ki67 and Bcl-2 immunoexpression in primitive urothelial bladder carcinoma. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2012;53(3):521-5. Epub 2012/09/20.
91. Ogata DC, Marcondes CA, Tuon FF, Busato WF, Jr., Cavalli G, Czezko LE. Superficial papillary urothelial neoplasms of the bladder (PTA E PT1): correlation of expression of P53, KI-67 and CK20 with histologic grade, recurrence and tumor progression. *Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgias*. 2012;39(5):394-400. Epub 2012/11/24.
92. Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE, Kozlowski JM. The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *The Journal of urology*. 2003;169(4):1219-28. Epub 2003/03/12.
93. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, et al. 14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular cell*. 1997;1(1):3-11. Epub 1998/07/11.
94. Braithwaite AW, Royds JA, Jackson P. The p53 story: layers of complexity. *Carcinogenesis*. 2005;26(7):1161-9. Epub 2005/04/09.
95. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discovery medicine*. 2010;9(45):145-52. Epub 2010/03/03.
96. Schlichtholz B, Presler M, Matuszewski M. Clinical implications of p53 mutation analysis in bladder cancer tissue and urine sediment by functional assay in yeast. *Carcinogenesis*. 2004;25(12):2319-23. Epub 2004/08/17.
97. Black P. Frequent truncating mutations of STAG2 in bladder cancer. *Urology*. 2014;83(4):691-2. Epub 2014/02/04.
98. Razzak M. Bladder cancer: STAG2 in the spotlight--have genomic studies identified a plausible biomarker? *Nature reviews Urology*. 2013;10(12):675. Epub 2013/11/06.
99. Mobley A, Zhang S, Bondaruk J, et al. Aurora Kinase A is a Biomarker for Bladder Cancer Detection and Contributes to its Aggressive Behavior. *Scientific reports*. 2017;7:40714. Epub 2017/01/20.
100. Koyuncuer A. Immunohistochemical expression of p63, p53 in urinary bladder carcinoma. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2013;56(1):10-5. Epub 2013/08/09.
101. Hegazy R, Kamel M, Salem EA, et al. The prognostic significance of p53, p63 and her2 expression in non-muscle-invasive bladder cancer in relation to treatment with bacille Calmette-Guerin. *Arab journal of urology*. 2015;13(3):225-30. Epub 2015/09/29.
102. Urist MJ, Di Como CJ, Lu ML, et al. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am J Pathol*. 2002;161(4):1199-206. Epub 2002/10/09.
103. Rebouissou S, Bernard-Pierrot I, de Reynies A, et al. EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Science translational medicine*. 2014;6(244):244ra91. Epub 2014/07/11.
104. Choi W, Czerniak B, Ochoa A, et al. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nature reviews Urology*. 2014;11(7):400-10. Epub 2014/06/25.

105. Warrick JI, Kaag M, Raman JD, et al. FOXA1 and CK14 as markers of luminal and basal subtypes in histologic variants of bladder cancer and their associated conventional urothelial carcinoma. *Virchows Arch*. 2017. Epub 2017/07/20.
106. Jones D, Wade M, Nakjang S, et al. FOXA1 regulates androgen receptor variant activity in models of castrate-resistant prostate cancer. *Oncotarget*. 2015;6(30):29782-94. Epub 2015/09/05.
107. Fu X, Jeselsohn R, Pereira R, et al. FOXA1 overexpression mediates endocrine resistance by altering the ER transcriptome and IL-8 expression in ER-positive breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(43):E6600-E9. Epub 2016/10/30.
108. Mehta RJ, Jain RK, Leung S, et al. FOXA1 is an independent prognostic marker for ER-positive breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2012;131(3):881-90. Epub 2011/04/20.
109. Lerner SP, McConkey DJ, Hoadley KA, et al. Bladder Cancer Molecular Taxonomy: Summary from a Consensus Meeting. *Bladder cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2016;2(1):37-47. Epub 2016/07/05.
110. Joulin V, Bories D, Eleouet JF, et al. A T-cell specific TCR delta DNA binding protein is a member of the human GATA family. *The EMBO journal*. 1991;10(7):1809-16. Epub 1991/07/01.
111. Van Allen EM, Mouw KW, Kim P, et al. Somatic ERCC2 mutations correlate with cisplatin sensitivity in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Cancer discovery*. 2014;4(10):1140-53. Epub 2014/08/07.
112. Lindgren D, Frigyesi A, Gudjonsson S, et al. Combined gene expression and genomic profiling define two intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome. *Cancer Res*. 2010;70(9):3463-72. Epub 2010/04/22.
113. Sjobahl G. Molecular Subtype Profiling of Urothelial Carcinoma Using a Subtype-Specific Immunohistochemistry Panel. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2018;1655:53-64. Epub 2017/09/11.
114. Sjobahl G, Eriksson P, Liedberg F, Hoglund M. Molecular classification of urothelial carcinoma: global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification. *The Journal of pathology*. 2017;242(1):113-25. Epub 2017/02/15.
115. Bankfalvi A, Simon R, Brandt B, et al. Comparative methodological analysis of erbB-2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. *Histopathology*. 2000;37(5):411-9. Epub 2000/12/19.
116. Solomon DA, Kim JS, Bondaruk J, et al. Frequent truncating mutations of STAG2 in bladder cancer. *Nature genetics*. 2013;45(12):1428-30. Epub 2013/10/15.

XI. Résumé - Abstract :

XI.1 Profils moléculaires prédictifs du potentiel métastatique du carcinome urothélial de la vessie de stade pT1 ou supérieur

Introduction: Les données des analyses génomiques des tumeurs de vessie ont défini des sous-groupes qui présentent une agressivité et une réponse à la chimiothérapie différents. Notre but était d'identifier des marqueurs moléculaires prédictifs de l'évolution tumorale.

Matériels et méthodes: Les ADNs de 54 tumeur solides et de 50 échantillons d'urines de patients avec une tumeur de vessie ont été hybridés sur la puce CGH (Comparative Genomic Hybridization) BCA-oligo. Des TMA (Tissue Micro Array) de 140 tissus paraffinés de tumeurs primitives et métastatiques, ont été analysés en immunohistochimie pour les marqueurs impliqués dans: stabilité de l'ADN, prolifération cellulaire et définition de sous-groupe basal ou luminal. Des corrélations avec les données cliniques ont été recherchées à tous les niveaux d'analyse.

Résultats: Le nombre d'altérations chromosomiques augmentait significativement avec le stade tumoral. La distribution de ces altérations était cohérente entre les ADNs extraits de tissu tumoral et de prélèvements urinaires. Si aucun marqueur immunohistochimique ne permettait de différencier les patients métastatiques ou non, des profils de marquage similaires ont été observés entre tumeurs primitives et métastases. La présence d'embolus tumoraux lymphatiques était prédictive du statut métastatique.

Conclusion: l'utilisation dans la pratique clinique de la puce BCA-oligo pour prédire une évolution d'une tumeur de vessie vers un stade ou un grade plus élevé peut être envisagée, et réalisée sur un simple prélèvement urinaire. La recherche systématique d'embolus lymphatiques sur tumeurs primitives peut être utilisée pour prédire une évolution métastatique.

Mots clés : tumeur de vessie; pronostic; métastase; CGH array; clustering; immunohistochimie;

XI.2 Predictive Molecular Profiles of the Metastatic Potential of Urothelial Carcinoma of the Bladder Stage pT1 or Greater

Introduction: Recent data from genomic analysis of bladder tumors have identified subgroups with different aggressiveness patterns and chemotherapy response profiles. The aim of our study was to identify molecular markers that can be used in clinical practice, to predict the evolution of these tumors in order to personalize their management.

Materials and Methods: DNAs extracted from 54 solid tumors and 50 urine samples from patients with bladder cancer were hybridized on the BCA-oligo CGH (Comparative Genome Hybridization) chip. TMAs (Tissue Micro Array) from 140 paraffine-embedded tissues of primary and metastatic tumors, were analyzed in immunohistochemistry with antibodies directed against proteins involved in DNA stability, cell proliferation and the definition of basal or luminal subgroup. Correlations with clinical data were sought at all levels of analysis.

Results: The number of chromosomal alterations increased significantly with the tumor stage. In addition, the distribution of these alterations was consistent between the DNAs extracted from tumor tissue and those from urinary samples. If no immunohistochemical marker differentiated between metastatic and non-metastatic patients, similar labeling patterns were observed between primary tumors and metastases. Notably, the presence of lymphatic emboli was predictive of metastatic status.

Conclusion: The use in clinical practice of the BCA-oligo chip to predict a progression of a bladder tumor to a higher stage or grade may be considered. This analysis is feasible on urine sample. The systematic search for lymphatic emboli on primary tumors can be used in clinical practice to predict a metastatic evolution.

Key words: bladder cancer; prognosis; metastasis; CGH array; clustering; immunohistochemistry;

XI.3 Profili molecolari predittivi del potenziale metastatico del carcinoma uroteliale della vescica di stadio pT1 o superiore

Introduzione: i dati di analisi genomica per i tumori della vescica hanno definito sottogruppi che mostrano una aggressività e delle risposte alla chemioterapia differenti. Il nostro obiettivo era identificare marcatori molecolari predittivi dell'evoluzione tumorale.

Materiali e metodi: il DNA estratto da 54 tumori solidi e da 50 campioni di urina di pazienti con tumore alla vescica sono stati ibridizzati sul chip CGH (Comparative Genomic Hybridization) BCA-oligo. Dei TMA (Tissue Micro Array) di tessuti inclusi in paraffina da 140 tumori primitivi e metastatici sono stati analizzati mediante immunohistochimica per marcatori coinvolti in: stabilità del DNA, proliferazione cellulare e la definizione di sottogruppo basale o luminale. Le correlazioni con i dati clinici sono state ricercate a tutti i livelli di analisi.

Risultati: il numero di alterazioni cromosomiche aumenta significativamente con lo stadio del tumore. La distribuzione di queste alterazioni era coerente tra i DNA estratti da tessuto tumorale e campioni urinari. Se nessun marcatore immunohistochimico ha permesso di differenziare tra pazienti metastatici e non metastatici, sono stati osservati profili di marcatura coerenti tra tumori primari e metastasi. La presenza di emboli linfatici del tumore era predittiva dello stato metastatico.

Conclusione: L'uso nella pratica clinica del test BCA-oligo può essere realizzato per predire l'evoluzione di un tumore vescicale verso uno stadio o un grado superiore, ed eseguito su un semplice campione di urina. La ricerca sistematica di emboli linfatici sui tumori primari può essere utilizzata per prevedere un'evoluzione metastatica.

Parole chiave: tumore della vescica; prognosi; metastasi; Array CGH; clustering; immunohistochimica;