



HAL
open science

Intérêt de l'étude des mutations des gènes p53 et FGFR3 dans les tumeurs de la vessie et le culot urinaire

Nicolas Noel

► **To cite this version:**

Nicolas Noel. Intérêt de l'étude des mutations des gènes p53 et FGFR3 dans les tumeurs de la vessie et le culot urinaire. Médecine humaine et pathologie. 2013. dumas-00910732

HAL Id: dumas-00910732

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00910732>

Submitted on 28 Nov 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Nicolas NOEL

Né le 30/09/1981 à Boulogne-Billancourt

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 30 OCTOBRE 2013

**INTERET DE L'ETUDE DES MUTATIONS DES GENES *p53* ET
FGFR3 DANS LES TUMEURS DE LA VESSIE ET LE CULOT
URINAIRE**

PRESIDENT DU JURY

Pr Philippe GRISE

DIRECTEUR DE THESE

Pr Christian PFISTER

MEMBRES DU JURY

Pr Jean-Christophe SABOURIN

Pr Louis SIBERT

ANNEE UNIVERSITAIRE 2012 - 2013
U.F.R. DE MEDECINE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Pascal JOLY
Professeur Bernard PROUST

DOYENS HONORAIRES : **Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. PIGUET – C. THUILLEZ**

PROFESSEURS HONORAIRES : **MM. M-P AUGUSTIN - J.ANDRIEU-GUITRANCOURT - M.BENOZIO- J.BORDE - Ph. BRASSEUR - R. COLIN - E. COMOY - J. DALION -. DESHAYES - C. FESSARD – J.P FILLASTRE - P.FRIGOT -J. GARNIER - J. HEMET - B. HILLEMAND - G. HUMBERT - J.M. JOUANY - R. LAUMONIER – Ph. LAURET - M. LE FUR – J.P. LEMERCIER - J.P LEMOINE - M^{le} MAGARD - MM. B. MAITROT - M. MAISONNET - F. MATRAY - P.MITROFANOFF - Mme A. M. ORECCHIONI - P. PASQUIS - H.PIGUET - M.SAMSON – Mme SAMSON-DOLLFUS – J.C. SCHRUB - R.SOYER - B.TARDIF - .TESTART - J.M. THOMINE – C. THUILLEZ - P.TRON - C.WINCKLER - L.M.WOLF**



PROFESSEURS

M. Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie Plastique
M. Bruno BACHY	HCN	Chirurgie pédiatrique
M. Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. Jacques BENICHOU	HCN	Biostatistiques et informatique médicale
M. Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Guy BONMARCHAND	HCN	Réanimation médicale

M. Olivier BOYER	UFR	Immunologie
M. Jean-François CAILLARD (Surnombre)	HCN	Médecine et santé au Travail
M. François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Philippe CHASSAGNE	HB	Médecine interne (Gériatrie)
M. Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
M. Alain CRIBIER (Surnombre)	HCN	Cardiologie
M. Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
M. Pierre CZERNICHOW	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean - Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et Imagerie Médicale
M. Stéfan DARMONI	HCN	Informatique Médicale/Techniques de communication
M. Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mme Danièle DEHESDIN	HCN	Oto-Rhino-Laryngologie
M. Jean DOUCET	HB	Thérapeutique/Médecine – Interne - Gériatrie.
M. Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
M. Philippe DUCROTTE	HCN	Hépto – Gastro - Entérologie
M. Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie Orthopédique - Traumatologique
M. Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
M. Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mlle Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
M. Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
M. Pierre FREGER	HCN	Anatomie/Neurochirurgie
M. Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et Santé au Travail
M. Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie Médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Michel GODIN	HB	Néphrologie
M. Philippe GRISE	HCN	Urologie
M. Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
M. Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
M. Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
M. Pascal JOLY	HCN	Dermato - vénéréologie
M. Jean-Marc KUHN	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques

Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie cytologie pathologiques
M. Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
M. Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
M. Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
M. Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
M. Eric LEREBOURS	HCN	Nutrition
Mlle Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
M. Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
M. Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie Cardiaque
M. Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. Eric MALLET (Surnombre)	HCN	Pédiatrie
M. Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mlle Isabelle MARIE	HB	Médecine Interne
M. Jean-Paul MARIE	HCN	ORL
M. Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - obstétrique
M. Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
M. Pierre MICHEL	HCN	Hépto - Gastro - Entérologie
M. Francis MICHOT	HCN	Chirurgie digestive
M. Bruno MIHOUT (Surnombre)	HCN	Neurologie
M. Jean-François MUIR	HB	Pneumologie
M. Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
M. Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
M. Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
M. Jean-Marc PERON	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
M. Christian PFISTER	HCN	Urologie
M. Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
M. Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
M. Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
M. François PROUST	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie et méd. du développement et de la reproduction
M. Jean-Christophe RICHARD (Mise en dispo)	HCN	Réanimation Médicale, Médecine d'urgence

M. Horace ROMAN	HCN	Gynécologie Obstétrique
M. Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
M. Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastro
Mme Céline SAVOYE – COLLET	HCN	Imagerie Médicale
M. Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mlle Florence THIBAUT	HCN	Psychiatrie d'adultes
M. Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
M. Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
M. Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. François TRON (<i>Surnombre</i>)	UFR	Immunologie
M. Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
M. Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique
M. Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie Réanimation chirurgicale
M. Pierre VERA	C.B	Biophysique et traitement de l'image
M. Eric VERIN	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
M. Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
M. Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
M. Jeremy BELLIEN	HCN	Pharmacologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
M. Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
M. Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
M. Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mme Catherine HAAS-HUBSCHER	HCN	Anesthésie - Réanimation chirurgicale
M. Serge JACQUOT	UFR	Immunologie

M. Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie Cellulaire
Mme Lucie MARECHAL-GUYANT	HCN	Neurologie
M. Thomas MOUREZ	HCN	Bactériologie
M. Jean-François MENARD	HCN	Biophysique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et Biologie moléculaire
M. Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
M. Francis ROUSSEL	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique LANIEZ	UFR	Anglais
Mme Cristina BADULESCU	UFR	Communication

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

M. Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
M. Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
M. Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
M. Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
M. Jean Pierre GOULLE	Toxicologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie
M. Olivier LAFONT	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX	Physiologie
M. Paul MULDER	Sciences du médicament
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
M Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mlle Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique BOUCHER	Pharmacologie
M. Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
M. Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
M. Jean CHASTANG	Biomathématiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mlle Cécile CORBIERE	Biochimie
M. Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mlle Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Roseline DUCLOS	Pharmacie Galénique
M. Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
M. François ESTOUR	Chimie Organique
M. Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla GHARBI	Chimie analytique

Mlle Marie-Laure **GROULT**
M. Hervé **HUE**
Mme Laetitia **LE GOFF**
Mme Hong **LU**
Mme Sabine **MENAGER**
Mme Christelle **MONTEIL**
M. Mohamed **SKIBA**
Mme Malika **SKIBA**
Mme Christine **THARASSE**
M. Rémi **VARIN** (MCU-PH)
M. Frédéric **ZIEGLER**

Botanique
Biophysique et Mathématiques
Parasitologie Immunologie
Biologie
Chimie organique
Toxicologie
Pharmacie Galénique
Pharmacie Galénique
Chimie thérapeutique
Pharmacie Hospitalière
Biochimie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme Sandrine **PANCHOU**

Pharmacie Officinale

PROFESSEUR CONTRACTUEL

Mme Elizabeth **DE PAOLIS**

Anglais

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Mazim **MEKAOUI**
Mlle Virginie **OXARAN**
M. Romy **RAZAKANDRAINIBE**

Chimie Analytique
Microbiologie
Parasitologie

**III –
MEDECINE
GENERALE**

PROFESSEURS

M. Jean-Loup HERMIL	UFR	Médecine générale
----------------------------	-----	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS :

M. Pierre FAINCILBER	UFR	Médecine générale
-----------------------------	-----	-------------------

M. Alain MERCIER	UFR	Médecine générale
-------------------------	-----	-------------------

M. Philippe NGUYEN THANH	UFR	Médecine générale
---------------------------------	-----	-------------------

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS :

M Emmanuel LEFEBVRE	UFR	Médecine générale
----------------------------	-----	-------------------

Mme Elisabeth MAUVIARD	UFR	Médecine générale
-------------------------------	-----	-------------------

Mme Marie Thérèse THUEUX	UFR	Médecine générale
---------------------------------	-----	-------------------

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre HENRI BECQUEREL

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

LISTE DES RESPONSABLES DE DISCIPLINE

Melle Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
M. Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
M. Roland CAPRON	Biophysique
M Jean CHASTANG	Mathématiques
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation, Economie de la Santé
Mle Elisabeth CHOSSON	Botanique
M. Jean-Jacques BONNET	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC	Parasitologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie
M. Olivier LAFONT	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie Galénique
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

MAITRES DE CONFERENCES

M. Sahil **ADRIOUCH**

Biochimie et biologie
moléculaire
(Unité Inserm 905)

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE**

Biochimie et biologie
moléculaire
(UMR 1079)

Mme Carine **CLEREN**

Neurosciences
(Néovasc)

Mme Pascaline **GAILDRAT**

Génétique moléculaire
humaine
(UMR 1079)

M. Antoine **OUVRARD-PASCAUD**

Physiologie (Unité
Inserm 1076)

Mme Isabelle **TOURNIER**

Biochimie (UMR 1079)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M. Serguei **FETISSOV**

Physiologie (Groupe
ADEN)

Mme Su **RUAN**

Génie Informatique

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propre à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Philippe GRISE,
Vous me faites l'honneur de présider ce jury.
Vos connaissances en urologie et vos qualités chirurgicales sont un exemple et me former à vos côtés est un honneur.
Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Christian PFISTER,
Vous me faites l'honneur de juger ce travail.
Pour votre accueil chaleureux, votre rigueur, votre enseignement mais aussi votre confiance et votre disponibilité pour la réalisation de ce travail,
Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Jean-Christophe SABOURIN,
Vous me faites l'honneur de juger ce travail.
Ce travail n'aurait pas été possible sans la collaboration étroite du service d'anatomopathologie du CHU de Rouen, que vous dirigez.
Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Louis SIBERT,
Vous me faites l'honneur de juger ce travail.
Pour votre disponibilité, vos précieux conseils, votre enseignement et votre présence toujours sympathique,
Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de mes sincères remerciements.

Aux anciens de Paris-Ouest : Baptiste, Laurène, Marion, Alex, Karine, Martin, Alexis, Xav, Felipe, Léa, Chloé, Gonzague, Florent. Plein de bons moments partagés, et malgré l'internat qui nous a envoyé aux quatre coins de la France, nous continuons et continuerons de nous revoir pendant longtemps...

Aux vieux copains de lycée : Benoit, Greg, Eric, Etienne, Mouloud, Bart, Benj, Matthieu, Thomas. Les moments passés ensemble se font malheureusement plus rares, mais sont donc bien plus intenses.

Aux carnaçais (et parisiens !) : Max, Guillaume, Camille, Capu, Clara. Toujours les mêmes blagues depuis 20 ans ...

Aux internes « Havrais », toujours présents depuis 5 ans : Mélanie et Matthieu, Guillaume et Sarah, Virginie, Anne et Thibaut, Greg, les 2 Vincent, Maud, Valentin et Marie, Caro et Eric, Katia... Enfants oblige, on s'est un peu calmé sur les fêtes depuis le Macumba même si l'on trouve encore toujours de bonnes occasions...

A tous mes chefs d'urologie, pour tout ce qu'ils m'ont apporté du point de vue humain et professionnel : Atman, Ismael, Simon, Hubert, Romain, Fabrice, Medhi, Latifa, Charles, Julien, Baptiste, Thomas, Yohann et Nicolas

A mes amis co-internes d'urologie : Erwan, Julien, Aymeric, FX, David, Guillaume, John, Benoît, Claire, Alex et ceux de Tours : Abéni, Marc, Etienne et Laure

A mes amis internes, croisés au fil des années, à l'hôpital et en dehors : Marie P, Fabien, Ali, Bertrand, Lilian, Rachid, Julien, Hubert, Ludo, Alice, Adrien, Marie L et tous ceux que je n'ai pas cités...

A tous les chirurgiens qui m'ont transmis leur passion chirurgicale et parfois leur bistouri : Monsieur Bessou, Fabien Doguet, les digestifs Mr Michot, Mr Tuech, Manu, les dieppois : Mr Del Gallo et Mr Goulet, les chirurgiens pédiatres : Monsieur Bachy, Madame Liard, Frederic et Marion, les vasculaires : Mr Plissonnier, Pascale, Laurent, Nathalie, Marion, les thoraciques : Mr Peillon, Jean-Marc, Jean, et les Tourangeaux : Mr Haillet, Mr Bruyère, Mr Boutin, Benjamin

A l'ensemble du personnel hospitalier : les infirmiers/infirmières, AS, IBODE, secrétaires des hôpitaux du Havre, Rouen, Dieppe et Tours. Un remerciement particulier pour les IBODE (surtout Joëlle) et pour les infirmières de consultation d'urologie de Rouen pour avoir permis la réalisation de cette étude grâce à votre implication.

A Jérôme et Géraldine pour votre implication dans ce projet, votre accueil, vos conseils et votre disponibilité durant mon année au laboratoire.

A ma famille, pour son amour et son soutien en toute circonstance

A Ségo, Baptiste et Augustin

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	18
INTRODUCTION	20
I. ETAT DES CONNAISSANCES	21
A) LE CANCER DE LA VESSIE	21
1) Epidémiologie	21
2) Facteurs de risque.....	21
3) Signes cliniques	22
4) Diagnostic.....	23
5) Classification des tumeurs de la vessie.....	23
6) Traitement des tumeurs de vessie.....	25
a) Les TVIM	25
b) Les TVNIM.....	26
7) Surveillance des TVNIM	28
a) L'endoscopie vésicale	28
b) Les cytologies urinaires	29
B) TESTS URINAIRES DANS LE DIAGNOSTIC ET LA SURVEILLANCE DES TUMEURS DE VESSIE ...	30
1) Le test NMP22 (Nuclear Matrice Protein 22)	30
2) Le BTA (Bladder Tumor Antigen) STAT et BTA TRAK.....	31
3) Le test ImmunoCyt/uCyt+	32
4) Le test UroVysion.....	33
5) Le test HA-Haase	34
6) L'analyse des microsatellites	34
C) MUTATIONS GENETIQUES DANS LA CANCEROGENESE VESICALE	36
1) Le gène <i>p53</i>	36
2) Le gène <i>FGFR3</i>	37
3) Rôle de <i>p53</i> et de <i>FGFR3</i> dans les tumeurs de vessie.....	37

II. NOTRE ETUDE.....	40
A) OBJECTIFS.....	40
B) MATERIEL ET METHODES.....	41
1) Prélèvement des échantillons.....	41
2) Protocole de préparation des culots urinaires	41
3) Extraction de l'ARN messager, rétrotranscription (RT) et PCR (Polymerase Chain Reaction) de <i>p53</i>	42
4) Extraction de l'ADN génomique (ADNg)	42
5) Analyse fonctionnelle de la protéine P53	42
6) Recherche des mutations HOTSPOT de <i>FGFR3</i>	45
C) ANALYSE STATISTIQUE	47
D) RESULTATS	48
1) Etude des mutations de <i>p53</i>	48
a) Stade tumoral et grade cellulaire des tumeurs.....	48
b) Etude des mutations de <i>p53</i> dans les tumeurs selon le stade tumoral	49
c) Etude des mutations de <i>p53</i> dans les tumeurs selon le grade cellulaire	51
d) Etude de la concordance des mutations de <i>p53</i> dans les tumeurs et le culot urinaire correspondant	53
2) Etude des mutations de <i>FGFR3</i>	54
a) Stade tumoral et grade cellulaire des tumeurs.....	54
b) Etude des mutations de <i>FGFR3</i> dans les tumeurs selon le stade tumoral.....	55
c) Etude des mutations de <i>FGFR3</i> dans les tumeurs selon le grade cellulaire.....	57
d) Etude de la concordance des mutations de <i>FGFR3</i> dans les tumeurs et le culot urinaire correspondant	59
3) Etude de la concordance des mutations du phénotype <i>p53/FGFR3</i> dans les tumeurs et le culot urinaire correspondant	60
4) Comparaison de la recherche des mutations de <i>p53</i> et <i>FGFR3</i> dans les urines avec les cytologies urinaires	62

III. DISCUSSION.....	63
A) LES MUTATIONS DE <i>p53</i> DANS LES TUMEURS VESICALES	63
B) LES MUTATIONS DE <i>FGFR3</i> DANS LES TUMEURS VESICALES	67
C) ETUDES DES MUTATIONS DE <i>p53</i> DANS LES URINES.....	70
D) ETUDE DES MUTATIONS DE <i>FGFR3</i> DANS LES URINES	72
E) ETUDE DU PHENOTYPE <i>p53/FGFR3</i> DANS LES TUMEURS VESICALES	73
F) ETUDE DU PHENOTYPE <i>p53/FGFR3</i> DANS LES URINES.....	73
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	76
BIBLIOGRAPHIE	77

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ADNc	Acide désoxyribonucléique codant
AFU	Association Française d'Urologie
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BTA	Bladder Tumor Antigen
CCAFU	Comité de Cancérologie de l'Association Française d'Urologie
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CIC	Centre d'Investigation Clinique
CIS	Carcinome In Situ
dNTP	déoxynucléotide
ddNTP	didéoxynucléotide
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
EXO 1	Exonucléase 1
FASAY	Functionnal Analysis of Separated Allele in Yeast
FEDER	Fond Européen de Développement Régional
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
G1, 2, 3	Grade 1, 2, 3
HA-Haase	Acide Hyaluronique – Hyaluronidase
HAS	Haute Autorité de Santé
hCFH	human Complement Factor H

hCFHrp	human Complement Factor H-related protein
HG	High Grade
KDa	KiloDalton
LG	Low Grade
LMP	Low Malignancy Potential
NMP22	Nuclear Matrice Protein 22
P53	Protein 53
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT	Rétrotranscription
RTUV	Résection Trans-Urétrale de Vessie
SAP	Shrimp Alkaline Phosphonucléase
SNaPSHOT	Single Nucleotide Primer Extension
SFMT	Société Française de Médecine du Travail
TE-Liac	TrisHCl, EDTA, acétate de lithium
TVIM	Tumeurs de Vessie Infiltrant le Muscle
TVNIM	Tumeurs de Vessie N'Infiltrant pas le Muscle
WT	Wild Type

INTRODUCTION

Le cancer de la vessie touche 12000 nouveaux patients par an en France, le positionnant à la 7^{ème} place des cancers les plus fréquents [1]. Ses facteurs de risque, le tabagisme et l'exposition professionnelle à des carcinogènes, sont bien établis [2].

Les tumeurs de la vessie n'infiltrant pas le muscle (TVNIM) sont les plus fréquentes lors du diagnostic. Si leur traitement repose sur la résection trans-urétrale de vessie (RTUV) et dans certains cas, la réalisation d'instillations vésicales, le taux de récurrence à 1 an est estimé à 70% [3]. C'est pourquoi une surveillance régulière de ces patients est nécessaire, par fibroscopie vésicale et réalisation de cytologies urinaires. Ces dernières restent actuellement le seul test urinaire recommandé par l'Association Française d'Urologie (AFU) pour la surveillance des patients aux antécédents de tumeur de la vessie, mais également pour le dépistage du carcinome vésical chez les travailleurs exposés [4]. Si la spécificité des cytologies urinaires est élevée, sa sensibilité est faible [5, 6, 7], notamment pour la détection des tumeurs de bas grade et sa réalisation reste très dépendante de l'expérience de l'anatomo-pathologiste. Mais aucun test urinaire n'a pour l'instant démontré sa supériorité par rapport à la cytologie urinaire.

Deux gènes sont fortement impliqués dans la cancérogénèse vésicale : *p53* (impliqué dans le développement de tumeurs infiltrantes et/ou de haut grade) et *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3) (impliqué dans le développement de tumeurs non infiltrantes et/ou de bas grade) [8, 9, 10].

Notre étude rapporte les résultats de la recherche dans les tumeurs vésicales et le culot urinaire des mutations de *p53* par le FASAY (Functional Assay of Separated Allele in Yeast) [11] et de *FGFR3* par le SNaPshot (Single Nucleotide Primer Extension) [12], chez des patients atteints d'une tumeur vésicale, opérés par résection trans-urétrale de vessie au CHU de Rouen entre janvier 2011 et juin 2013.

I. ETAT DES CONNAISSANCES

A) LE CANCER DE LA VESSIE

1) Epidémiologie

Le cancer de la vessie est le 7^{ème} cancer le plus fréquent dans le monde chez les hommes et le 17^{ème} chez les femmes [1]. Son incidence est la plus élevée en Europe, Amérique du Nord et Afrique du Nord et la plus faible dans les pays asiatiques [13].

Le carcinome à cellules transitionnelles représente plus de 90% des cancers de vessie dans les pays occidentaux, contrairement aux pays d'Afrique du Nord où la fréquence des carcinomes épidermoïdes est plus élevée [14].

En France, le carcinome vésical touche environ 12000 nouveaux patients par an (sixième cancer le plus fréquent) et est responsable de 3% des décès par cancer dont 75% chez l'homme. L'âge moyen de survenu est de 65 ans [15]. Il touche près de 5 fois plus les hommes que les femmes [16]. Son incidence est en augmentation d'environ 1% par an mais sa mortalité reste stable chez l'homme et la femme [17].

En France, 90% des tumeurs de vessie sont urothéliales. Les 10% restants sont des carcinomes épidermoïdes et des adénocarcinomes.

2) Facteurs de risque

Le tabagisme et l'exposition professionnelle à des carcinogènes chimiques ont depuis longtemps montré leur lien avec l'augmentation du risque du cancer de vessie [2].

Le tabagisme est le premier facteur de risque de cancer de vessie. Chez les patients fumeurs, le risque de développer un cancer de vessie serait multiplié par 3 par rapport aux patients non-fumeurs [18], ce risque augmentant avec la durée et l'intensité de l'intoxication tabagique [19]. Ce risque est en rapport avec le nombre important de substances chimiques présentes dans le tabac, dont la 2-naphtylamine et le 4-

aminobiphenyl, éliminés par le système urinaire et responsables de mutations génétiques des cellules urothéliales conduisant à l'apparition de cellules cancéreuses. L'arrêt du tabagisme semblerait diminuer le taux de récurrence des cancers de la vessie [20].

L'exposition professionnelle à des carcinogènes chimiques est un facteur de risque de développement des cancers vésicaux connu depuis longtemps puisque Rhen avait publié, dès 1895, 3 cas de cancers de vessie chez des ouvriers travaillant dans l'industrie des colorants (contenant de l'aniline) [21]. Les substances impliquées sont les amines aromatiques (2-naphtylamine, 4-aminobiphenyl et benzidine), les nitrosamines et les hydrocarbures aromatiques polycycliques retrouvés notamment dans l'industrie du textile, du cuir, des colorants ou du pétrole [22].

On estime que 5 à 25% des cancers de la vessie sont imputables à une exposition professionnelle mais ceux-ci restent sous-déclarés [23].

D'autres facteurs de risque restent controversés tels que l'intoxication alcoolique chronique (augmentation pour certains du risque à partir de 5 verres par jour chez l'homme [24], pas de lien pour d'autres [25, 26]), le café ou le thé.

Pour les carcinomes épidermoïdes de la vessie, les facteurs de risque correspondent à une irritation chronique de la vessie comme les infections urinaires chroniques [27], la présence de corps étrangers intravésicaux (lithiases, sonde vésicale à demeure [28]), les vessies neurologiques [29] (stagnation urinaire chronique), la radiothérapie [30] et la bilharziose urinaire [31]. En effet, ces facteurs sont responsables de la survenue d'une métaplasie épidermoïde vésicale qui, dans 10% des cas, va dégénérer en carcinome épidermoïde [29].

3) Signes cliniques

L'hématurie macroscopique, classiquement terminale, constitue le signe clinique le plus fréquent. Dans 20% des cas, des signes d'irritation vésicale sont observés, à type de pollakiurie, impériosité ou brûlure urinaire.

Une tumeur vésicale peut également être découverte fortuitement lors d'un examen (échographie, scanner) ou chez les patients à risque surveillés régulièrement par des

cytologies urinaires. Enfin, elle peut se révéler lors de manifestations métastatiques ou d'envahissement locorégional [4].

4) Diagnostic

Lors de la suspicion d'une tumeur vésicale, différents examens paracliniques sont actuellement recommandés [4] :

- la cytologie urinaire qui permet de détecter dans les urines la présence de cellules tumorales. Ses caractéristiques seront décrites ultérieurement.
- l'échographie par voie sus-pubienne (sensibilité de détection d'une tumeur vésicale supérieure à 85%, notamment pour les tumeurs polypoides > 5 mm [32]).
- l'endoscopie vésicale qui précise le nombre, la taille, la topographie et surtout l'aspect des lésions vésicales.
- l'uroscanner qui permet d'éliminer une lésion associée du haut appareil urinaire.

Le diagnostic de tumeur vésicale demeure histologique et nécessite donc la réalisation d'une RTUV. Celle-ci, réalisée sous anesthésie générale ou rachianesthésie, doit être complète et profonde avec la présence de trousseaux musculaires.

L'examen anatomopathologique de la totalité des copeaux de résection permet ainsi une classification de la tumeur, selon le grade cellulaire et le stade tumoral, critères fondamentaux pour la prise en charge ultérieure.

5) Classification des tumeurs de la vessie

Les tumeurs de vessie sont classées selon le stade tumoral et le grade cellulaire.

Le stade tumoral permet de différencier deux entités fondamentales : les tumeurs de vessie n'infiltrant pas le muscle (TVNIM) et les tumeurs de vessie infiltrant le muscle (TVIM) (classification TNM 2009). (**Figure 1**)

Lors du diagnostic initial, en France, on estime que 75% à 85% des tumeurs de vessie sont des TVNIM et 15 à 25% sont des TVIM.

Les TVNIM sont constituées des tumeurs Ta (infiltration de l'urothélium), T1a (infiltration du chorion superficiel) et T1b (infiltration du chorion profond par invasion

de la muscularis mucosæ). L'invasion de la muscularis mucosæ par les tumeurs T1b serait un élément pronostique péjoratif pour la survie sans progression, la survie spécifique et la survie globale comparativement aux tumeurs T1a [33]. Le carcinome in situ (CIS) est une entité particulière car c'est une tumeur plane, mais très agressive, et qui, non traitée, évolue quasi constamment vers l'infiltration pariétale.

Les TVIM sont constituées des tumeurs T2a (envahissement du muscle superficiel), T2b (envahissement du muscle profond), T3a et b (envahissement microscopique et macroscopique du tissu péri-vésical), T4a (envahissement de la prostate, du vagin ou de l'utérus) et T4b (envahissement de la paroi pelvienne ou abdominale).

L'évaluation du stade tumoral sur le matériel de RTUV ne permet pas de séparer les stades T2a et T2b et la résection ne permet pas d'aller au-delà du stade T2. Seule l'analyse de la pièce de cystectomie permettra d'évaluer précisément l'infiltration.

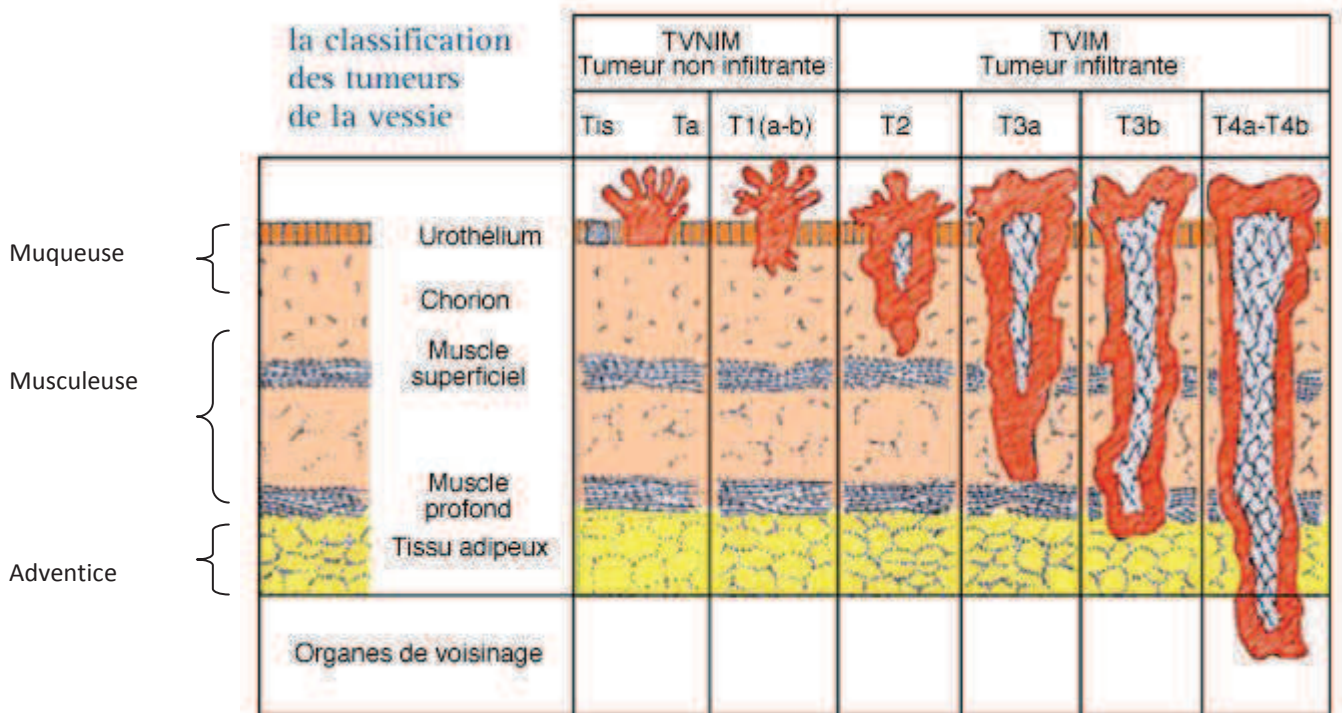


Figure 1: Classification des stades des tumeurs de la vessie (repris de Pointreau *et al.*) [34]

Le grade cellulaire permet de définir l'agressivité de la tumeur vésicale. La classification OMS 1973 a longtemps été utilisée, classant les tumeurs en carcinome de grade 1 (G1 : peu différenciée), grade 2 (G2 : moyennement différenciée) ou grade 3 (G3 : indifférenciée).

Cette classification a récemment été remplacée par la classification OMS 2004, qui classe les tumeurs en carcinome de bas grade (regroupant les G1 et certains G2) ou en carcinome de haut grade (regroupant certains G2 et les G3). Cette nouvelle classification présente une meilleure reproductibilité que la classification OMS 1973 et une simplification du classement entre tumeurs indolentes et agressives [35].

6) Traitement des tumeurs de vessie

a) Les TVIM

Après confirmation d'une TVIM sur la RTUV, le bilan d'extension comporte un scanner thoraco-abdomino-pelvien.

En cas de tumeur T2 N0 M0, le traitement de référence est la cystoprostatectomie chez l'homme et la pelvectomie antérieure chez la femme. Ce geste doit être complété d'un curage ganglionnaire étendu remontant jusqu'à la bifurcation aortique, qui sera à la fois diagnostique mais aussi curatif dans le cas de micro-métastases. Il permet de détecter 90% des métastases ganglionnaires contre 50% seulement en cas de réalisation d'un curage ilio-obturateur [36]. Une dérivation urinaire est proposée en fonction du contexte (néo-vessie par entérocystoplastie, dérivation non-continente type Bricker ou urétérostomies cutanées). En cas d'atteinte ganglionnaire ou du diagnostic de T3 sur la pièce de cystectomie en anatomopathologie, une chimiothérapie à base de platine doit être discutée. En cas de diagnostic de T4 sur la pièce de cystectomie, la chimiothérapie doit être réalisée.

Lorsque le diagnostic de tumeur de la vessie à haut risque de progression métastatique (T3 NX ou TX N1-N2) est porté en pré-opératoire sur le bilan d'extension, il est recommandé de réaliser une chimiothérapie à base de cisplatine suivie d'une réévaluation afin de proposer un traitement chirurgical aux patients répondeurs.

Enfin, au stade localement évolué ou métastatique, porté sur le bilan d'extension (T4 NX MX ou TX NX M1), le traitement de référence est la chimiothérapie à base de cisplatine.

Ces traitements sont à confronter à l'âge, la fonction rénale et l'état général du patient.

b) Les TVNIM

L'analyse des copeaux de RTUV selon le stade tumoral et le grade cellulaire permet de classer les TVNIM en risque faible, intermédiaire ou élevé de récurrence et de progression.

En effet, tout stade confondu, le taux de récurrence après RTUV est estimé à 70% la première année et 10 à 20% des TVNIM progressent vers des tumeurs invasives [3]. C'est pourquoi, il existe des facteurs pronostiques permettant de prédire le risque de récurrence et/ou d'infiltration afin d'adapter le traitement et la surveillance des TVNIM. Le nomogramme de l'EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer), utilisant six principaux paramètres clinicopathologiques (grade, stade, taille de la tumeur, taux antérieur de récurrence, présence de CIS concomitant et nombre de tumeurs) fait aujourd'hui référence [37]. Il permet de classer les TVNIM en risque faible, intermédiaire et élevé de récurrence et de progression (**figure 2**).

Risque faible	Ta unique, bas grade ou LMP* (grade 1) et diamètre < 3 cm et absence de récurrence tumorale
Risque intermédiaire	- Ta bas grade ou LMP (OMS 73) multifocal et/ou récidivante - T1 bas grade (grade 1-2)
Risque élevé	- Ta haut grade (grade 2/3 et 3) - T1 haut grade (grade 2/3 et 3) ou T1 récidivante - CIS (carcinome in situ)
*LMP : <i>Low Malignancy Potential</i> (tumeur à faible potentiel de malignité)	

Figure 2 : classification des TVNIM selon leur risque de récurrence et de progression [4]

En cas de risque faible, le seul traitement est la surveillance par cystoscopie à 3, 6 et 12 mois puis tous les ans pendant 10 ans (à vie si persistance du tabagisme).

En cas de risque intermédiaire, une chimiothérapie intra-vésicale de Mitomycine C doit être réalisée (4 à 6 semaines après la RTUV), diminuant le taux de récurrence tumorale [38]. La surveillance comporte une cystoscopie, couplée à des cytologies urinaires à 3, 6 et 12 mois puis tous les ans pendant 10 ans (à vie si persistance de l'intoxication tabagique). Elle comporte également un uroscanner tous les 2 ans ou en cas de cytologies urinaires positives ou de symptômes en faveur d'une atteinte du haut appareil urinaire.

En cas de TVNIM à risque élevé de récurrence, les instillations endovésicales de BCG (Bacilles de Calmette et Guérin) doivent être réalisées (en l'absence de contre-indications et 4 à 6 semaines après la RTUV), par un traitement d'attaque puis d'entretien sur une durée de 3 ans selon le schéma de Lamm [39], en fonction de la tolérance du patient. La surveillance comporte une cystoscopie (couplée à des cytologies urinaires) à 3, 6, 9 et 12 mois puis tous les 6 mois la 2^{ème} année puis annuellement à vie. Un uroscanner est réalisé selon les mêmes modalités que pour les tumeurs à risque intermédiaire.

7) Surveillance des TVNIM

Selon les recommandations du Comité de Cancérologie de l'AFU (CCAFU) [4], les patients aux antécédents de TVNIM doivent être étroitement surveillés par cystoscopie et cytologies urinaires.

a) L'endoscopie vésicale

Elle permet de visualiser l'urètre et la muqueuse vésicale. Réalisée en consultation, le matériel généralement utilisé est un cystoscope rigide chez les femmes, et un fibroscope souple chez les hommes. Le matériel est désinfecté et stérilisé selon les recommandations du Ministère de la Santé et la procédure est réalisée sous anesthésie locale. Après l'examen de l'urètre et de la prostate chez l'homme, l'exploration des différentes faces de la vessie permet de diagnostiquer l'existence d'une (ou plusieurs) récurrence tumorale, sa localisation et sa proximité avec les méats urétéraux.

La cystoscopie est un examen performant mais non dénué de risques et d'effets secondaires :

- elle reste un examen invasif, parfois douloureux ou traumatique.
- malgré les précautions, le taux d'infection urinaire après une cystoscopie est évalué à 4% [40, 41], sans qu'il n'ait été prouvé l'intérêt d'une antibioprophylaxie systématique.
- elle ne permet de diagnostiquer que les tumeurs macroscopiquement visibles et le diagnostic de tumeur plane (CIS) peut être difficile. Afin d'augmenter la sensibilité de la cystoscopie dans le dépistage des tumeurs de vessie, l'Hexvix® (instillation intravésicale d'héxaminolévéulinate et cystoscopie en lumière fluorescente) a été développé, permettant de diagnostiquer 20 % de tumeurs papillaires et 23 % de CIS supplémentaires par rapport à la cystoscopie en lumière blanche seule, avec 17 % des patients bénéficiant d'une prise en charge thérapeutique plus complète [42,43]. Les indications de l'utilisation de la fluorescence vésicale sont l'existence de lésions multifocales ou de diamètre supérieur à 3 cm, une récurrence tumorale précoce, l'existence de cytologies de haut grade et la surveillance des lésions à haut risque (T1G3 et CIS) [4].

- enfin, la « rentabilité » de la cystoscopie est faible puisque le pourcentage de cystoscopies mettant en évidence une tumeur vésicale, parmi les patients suspects de présenter une tumeur, est peu élevé puisqu'il est estimé à 14% [44]. La surveillance des tumeurs de vessie représente un coût important en terme de santé publique.

b) Les cytologies urinaires

La réalisation des cytologies urinaires consiste en la recherche de cellules tumorales dans les urines, par desquamation des cellules de la muqueuse vésicale. Il est donc recommandé de réaliser l'examen sur des urines fraîchement émises, en évitant les premières urines du matin et en répétant le prélèvement trois jours de suite. Après cyto centrifugation, fixation et coloration de Papanicolaou, les lames sont lues au microscope par un anatomo-pathologiste. Le diagnostic cytologique s'appuie sur des critères morphologiques objectifs, précis et reproductibles (données architecturales, anomalies nucléaires) [45]. Les cytologies peuvent être normales, de bas grade ou de haut grade.

Tous grades et stades confondus, la sensibilité des cytologies urinaires pour détecter la présence d'une tumeur de vessie varie en moyenne de 35 à 75% [5, 6, 7] selon les études, témoignant du manque de reproductibilité de la technique et de l'importance de l'expérience de l'anatomopathologiste. Plus précisément, si la sensibilité des cytologies urinaires est élevée pour détecter les tumeurs de haut grade (80 à 90%), celle-ci n'est que de 20% dans la détection des tumeurs de bas grade [46, 47], du fait de l'aspect bien différencié des cellules tumorales dans ce cas.

La spécificité des cytologies urinaires est par contre bonne, de 65 à 98% [5, 6, 7], atteignant même 100% dans certaines séries avec un taux important de CIS [48].

La faible sensibilité des cytologies urinaires, le coût et les complications de la fibroscopie vésicale ont amené la recherche de nouvelles méthodes de dépistage ou de surveillance des tumeurs de vessie. Idéalement, celle-ci doit être non invasive, simple, reproductible, avec une sensibilité et une spécificité élevées. Plusieurs tests, reprenant

le principe des cytologies urinaires (analyse des urines pour détecter une tumeur de vessie) ont été mis au point et commercialisés pour certains. Nous allons en présenter les principaux, leurs principes, leurs points positifs et leurs défauts.

B) TESTS URINAIRES DANS LE DIAGNOSTIC ET LA SURVEILLANCE DES TUMEURS DE VESSIE

1) Le test NMP22 (Nuclear Matrice Protein 22)

Le test NMP22 repose sur la détection dans les urines d'une protéine de la matrice du noyau impliquée dans la formation des fuseaux au cours de la mitose. En cas de tumeur de vessie, il existe une concentration de la matrice nucléaire 10 à 25 fois plus élevée que celle d'un urothélium normal, responsable d'une prolifération cellulaire anarchique [49]. Les cellules desquamant dans la vessie, le dosage du NMP22 est réalisé dans les urines. Le seuil de positivité du test est variable selon les études mais classiquement, le seuil de 6 U/mL, proposé par Stampfer est le plus utilisé [50]. Il existe un test rapide qualitatif (30 minutes) et un test quantitatif par méthode Elisa (5 heures).

Campos-Fernandes *et al.* ont réalisé en 2007 une revue de la littérature de ce test urinaire. La sensibilité moyenne était de 66% avec une spécificité moyenne de 75% tous stades et grades confondus [51]. Cette sensibilité était à pondérer en fonction de la taille tumorale (98,8% pour les tumeurs > 2cm contre 24,4% pour les tumeurs < 2 cm) [52], du grade cellulaire (34% pour les G1 contre 98% pour les G3) et du stade tumoral (52% pour les Ta contre 90% pour les tumeurs >Ta) [53, 54]. L'existence de nombreux faux positifs (25%) secondaires à des états inflammatoires de la muqueuse vésicale (cystite, lithiases, sonde JJ) était à prendre en compte dans l'utilisation du NMP22, plutôt comme un outil de suivi des tumeurs de vessie et non de dépistage.

Saint *et al.* [55], reprenant les 17 principaux articles de la littérature sur le test NMP22, concluaient que comme test de dépistage des tumeurs de vessie, le NMP22 avait une meilleure sensibilité mais une moins bonne spécificité que les cytologies urinaires. De

plus, sa valeur prédictive positive, très hétérogène (de 0 à 70%) ne permettait pas de le proposer comme test de dépistage. Comme outil de surveillance des tumeurs de vessie, le NMP22 avait une sensibilité supérieure à la cytologie urinaire mais une moins bonne spécificité. Dans ce cas, la valeur prédictive positive était proche de 70%, et augmentait à 90% en cas de couplage de ce test avec les cytologies urinaires. Il faut noter que ce test présentait également un intérêt pronostique : chez les patients en surveillance de leur tumeur de vessie, un test NMP22 positif sans lésion visualisée en cystoscopie était associé à un risque de récurrence tumoral multiplié par 10 par rapport aux patients chez qui la cystoscopie et le test NMP22 étaient négatifs [56].

Au total, le test NMP22 semblait avoir un intérêt dans le suivi des patients aux antécédents de tumeurs de vessie, notamment couplé aux cytologies urinaires, le taux élevé de faux positifs ne permettant cependant pas son utilisation comme outil de dépistage des tumeurs de vessie.

2) Le BTA (Bladder Tumor Antigen) STAT et BTA TRAK

Le test BTA est basé sur des anticorps qui permettent de détecter des niveaux élevés de hCFHrp (human complement factor H-related protein) dans les urines. Cette protéine est similaire au facteur H du complément humain (hCFH) qui est habituellement relargué par les cellules normales pour se protéger du système immunitaire. hCFHrp est quant à lui relargué par les cellules tumorales, mimant le rôle de hCFH, leur permettant d'échapper au système immunitaire [57]. Il existe un test dosant qualitativement le BTA (BTA STAT), qui dure 5 minutes, et un test quantitatif (BTA TRAK) immuno-enzymatique utilisant 2 anticorps monoclonaux spécifiques du BTA, dont la concentration est proportionnelle à l'absorption d'un rayon de 405 nm [51].

Pour le BTA STAT, il existait selon les études une sensibilité de 57 à 100% avec une moyenne à 72%. La sensibilité était plus élevée lorsque le stade tumoral (51% pour les pTa contre 85% pour les pT1) et le grade cellulaire étaient élevés (23% pour les tumeurs G1 contre 93% pour les tumeurs G3) [58]. La spécificité variait de 65 à 93%, avec une moyenne de 74%.

Pour le BTA TRAK, la sensibilité semblait varier de 56 à 74% (moyenne : 64%) et la spécificité de 51 à 95% (moyenne : 73%) [51].

Si la sensibilité était supérieure à celle des cytologies urinaires, ce test était moins spécifique avec l'existence de nombreux faux positifs et une valeur prédictive positive de 35% pour le BTA STAT. En effet, les inflammations locales de la vessie (infections, lithiases, sonde JJ ou vésicale [59], mais également la chimiothérapie intravésicale ou la BCGthérapie [60]) étaient responsables de nombreux faux positifs.

Les différentes études n'ont pas retrouvé de relation entre le dosage du BTA urinaire et le taux de récurrence ou de progression tumorale [51].

Au total, comme le NMP 22, le BTA test, devant l'existence de nombreux faux positifs, semblait avoir une indication limitée pour le suivi des récurrences des tumeurs de vessie.

3) Le test ImmunoCyt/uCyt+

Ce test repose sur une technique d'immunocytofluorescence utilisant 3 anticorps (M344, LDQ10 et 19A211) dirigés vers des antigènes spécifiques présents dans les cellules tumorales vésicales. La lecture se fait par un microscope à fluorescence par un anatomopathologiste. Ce test est utilisé conjointement à la cytologie urinaire, ayant pour but d'améliorer la sensibilité de cette dernière, pour la détection des tumeurs de bas grade [51].

La sensibilité de ce test, combiné aux cytologies urinaires, variait de 72 à 100% (moyenne de 86%). Si ce test était plus sensible pour la détection des tumeurs de haut grade, il permettait une bien meilleure détection des tumeurs de faible grade que la cytologie urinaire seule (sensibilité de 67% pour les tumeurs G1 pour Pfister *et al.* [61] à 85% pour Lodde *et al.* [62]).

La spécificité de l'ImmunoCyt/uCyt+ variait de 61 à 82% selon les études [61, 62], ce qui était inférieur à la cytologie urinaire seule. Mais, l'ImmunoCyt/uCyt ne semblait pas affecté par les états inflammatoires locaux ou les chimiothérapies intravésicales [63].

Son intérêt demeurait chez les patients suivis dans la surveillance de tumeurs de vessie. En effet, Piaton [64] avait noté que chez ces patients, en cas de test uCyt+ positif avec

une cystoscopie négative, le taux de récurrence tumorale à 1 an était de 33% contre seulement 4.7% chez les patients ayant un test et une fibroscopie négative. Ces différentes données pourraient ainsi permettre d'adapter le suivi par cystoscopie chez les patients aux antécédents de tumeur de vessie.

Ce test, néanmoins, nécessite un laboratoire équipé d'un matériel spécifique (microscope à fluorescence) et, de même que la cytologie urinaire, reste dépendant de l'expérience de l'anatomopathologiste.

4) Le test UroVysion

Ce test permet l'identification d'anomalies génétiques fréquemment observées dans les tumeurs de vessie, notamment la perte du locus 9p21 du chromosome 9 (codant pour un anti-oncogène : *p16*) ou des anomalies en nombre des chromosomes 3, 7 et 17 [51]. Ces anomalies sont identifiées par la méthode FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) qui repose sur l'hybridation de 2 brins d'ADN complémentaires avec des sondes d'oligonucléotides marquées à la fluorescéine.

Dans la littérature, la sensibilité de ce test pour la détection des tumeurs de vessie dans les urines était de 68 à 85% (moyenne de 80%). Cette sensibilité augmentait lorsque le grade tumoral augmentait (53 à 55% pour les tumeurs G1 contre 94 à 100% pour les tumeurs G3) [65,66].

La spécificité variait de 65% à 96%. Ce test ne paraissait pas modifié par les inflammations de la vessie (infections, lithiases) [57] témoignant d'un intérêt pronostique dans le suivi des patients aux antécédents de tumeurs de vessie. En cas de test positif et fibroscopie négative, le taux de récurrence à 1 an était de 28,6% contre 9,7% en cas de test FISH négatif [51]. Comme l'Immunocyt, le test UroVysion pourrait permettre d'adapter le rythme de surveillance par fibroscopie.

5) Le test HA-Haase

Le test HA-Haase (acide hyaluronique – hyaluronidase) permet le dosage dans les urines de l'acide hyaluronique et de la hyaluronidase, qui est une enzyme qui dégrade cet acide hyaluronique. Leur concentration est élevée dans les lésions tumorales vésicales et grâce à la desquamation des cellules tumorales vésicales dans la vessie, il est possible de les doser dans les urines. La sensibilité variait de 83 à 100% et la spécificité de 70 à 89% [51]. La valeur prédictive positive n'était que de 64% [67], les faux positifs étaient rapportés chez les patients atteints d'un adénome ou d'un cancer de prostate mais aussi de lithiases ou de lésions inflammatoires.

6) L'analyse des microsatellites

L'analyse des microsatellites a également été décrite pour rechercher dans les urines la présence d'une tumeur vésicale. Les microsatellites sont des séquences courtes (1 à 4 nucléotides), nombreuses (environ 100 000 séquences réparties sur l'ensemble du génome) et répétées de 10 à 60 fois. En pathologie tumorale, il est possible d'observer soit une perte d'hétérozygotie (perte du matériel génétique englobant un microsatellite), soit une instabilité de ces microsatellites [51]. La sensibilité de ce test pour la détection des tumeurs de vessie varie entre 49 et 95% [68, 69] et la spécificité de 89 à 100% [68, 70].

Le taux de faux positifs était de l'ordre de 10%, correspondant dans la plupart des cas à des états inflammatoires [51]. L'intérêt pronostique de ce test n'a pas été décrit, les études réalisées n'ayant pas de recul suffisant pour établir un lien entre instabilité des microsatellites et pronostic tumoral.

Actuellement, aucun des tests urinaires commercialisés ne représente le test urinaire idéal et ne peut donc remplacer la fibroscopie vésicale.

Un test urinaire fiable doit présenter plusieurs caractéristiques :

- une bonne sensibilité permettant de ne pas omettre une tumeur de haut grade
- une spécificité suffisamment élevée pour ne pas réaliser de trop nombreux examens invasifs inutiles
- une simplicité et une reproductibilité indispensable de la technique
- sans oublier si possible un coût faible

Si la sensibilité de certains tests était, au vue des données de la littérature, intéressante, comparée à celle des cytologies urinaires, la principale limite restait la présence de nombreux faux positifs en cas d'inflammation vésicale, de lithiases ou d'hématurie.

La détection dans les urines des mutations génétiques responsables des tumeurs vésicales, constitue donc une nouvelle voie de recherche, pouvant permettre d'augmenter la spécificité du test en diminuant le nombre de faux positifs.

C) MUTATIONS GENETIQUES DANS LA CANCEROGENESE VESICALE

De nombreux travaux de biologie moléculaire ont clairement démontré qu'il existait deux voies majeures dans la cancérogénèse vésicale : l'une pour les tumeurs infiltrantes et à haut risque de malignité caractérisée par la présence de mutations du gène suppresseur de tumeur *p53*, l'autre pour les tumeurs non-infiltrantes et à faible risque de malignité caractérisée par des mutations du gène *FGFR3* [9, 10].

1) Le gène *p53*

C'est un gène suppresseur de tumeur qui code pour une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés et d'un poids moléculaire de 53 kilodalton (kDa). Cette protéine est un facteur de transcription qui se fixe de manière spécifique sur les régions régulatrices de gènes dont elle contrôle l'expression et est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose et permet le maintien de l'intégrité du génome [71]. L'homme dispose d'un seul gène *p53* fonctionnel situé sur le bras court du chromosome 17.

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'Acide désoxyribonucléique (ADN), d'un domaine d'oligomérisation et d'un domaine basique C-terminal de localisation nucléaire [72]. 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 :

- l'arrêt transitoire du cycle cellulaire au niveau des phases G1 ou G2 [73] et la réparation de l'ADN [74].
- l'apoptose (suicide de la cellule), si les dommages que la cellule a subi ne peuvent pas être réparés, afin d'empêcher 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 [75].

2) Le gène *FGFR3*

Le gène *FGFR3* est localisé au niveau du chromosome 4, sur le bras court et comprend 19 exons. Il appartient à une famille de récepteurs à tyrosine kinase (comprenant également *FGFR1*, 2). L'épissage alternatif de l'Acide Ribonucléique (ARNm) génère différentes isoformes (*FGFR3b* et *FGFR3c*) dont l'expression varie selon les tissus. Il est impliqué 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 extra-cellulaires « immunoglobulin-like », ainsi que d'un domaine hydrophobe permettant son ancrage dans la membrane cellulaire et d'un domaine tyrosine kinase intra cytoplasmique [76]. Les domaines extra-cellulaires interagissent avec les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF). La fixation de ces derniers sur les domaines extra-cellulaires induit la dimérisation de *FGFR3* puis l'autophosphorylation de son domaine tyrosine kinase qui sera ainsi activé [76].

3) Rôle de *p53* et de *FGFR3* dans les tumeurs de vessie

L'inactivation de *p53* est impliquée dans 50% des cancers humains. 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 T2, certaines T1 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 [77]. Plusieurs techniques ont été décrites afin de

rechercher les mutations de *p53* dans les tumeurs de vessie. Tout d'abord, la méthode d'immuno-histochimie qui évalue la quantité de la protéine P53 dans les cellules. En effet, P53 étant plus stable lorsqu'elle est mutée, sa concentration intracellulaire augmente. Une autre technique utilisée est le séquençage systématique du gène *p53*. Mais ces méthodes ont montré leurs limites, une augmentation de P53 dans les cellules ou une mutation retrouvée sur le gène de *p53* ne reflétant pas systématiquement l'inactivité de la protéine. C'est pourquoi une analyse moléculaire de la protéine P53 paraît essentielle. Le FASAY a été développé afin de permettre l'analyse fonctionnelle de la protéine P53 dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* [11, 78]. C'est cette technique que nous avons retenue pour évaluer l'intégrité du gène *p53* dans notre étude.

Le rôle de *FGFR3* dans la cancérogénèse a initialement été identifié dans les myélomes multiples et les cancers du col utérin. Son implication dans les cancers de la vessie est plus récente. 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) [76, 79]. Pour certains auteurs, les tumeurs mutées pour *FGFR3* auraient un taux de récurrence inférieur à celles non-mutées [80].

La recherche de mutations de *FGFR3* a initialement été réalisée par un séquençage du gène. Van Oers *et al.* (2005) ont décrit le SNaPshot, méthode simple permettant de rechercher les mutations les plus fréquentes de ce gène, ponctuelles, très localisées et bien décrites, situées sur les exons 7, 10 et 15 (mutations HOTSPOT) [12]. C'est cette méthode que nous avons utilisé dans notre étude.

La coexistence, au sein d'une même tumeur, de mutations de *p53* et *FGFR3*, représentant les 2 voies majeures de la cancérogénèse vésicale, a été décrite et serait responsable de l'évolution d'une tumeur de bas grade, peu agressive, en tumeur de haut grade [10] (**Figure 3**).

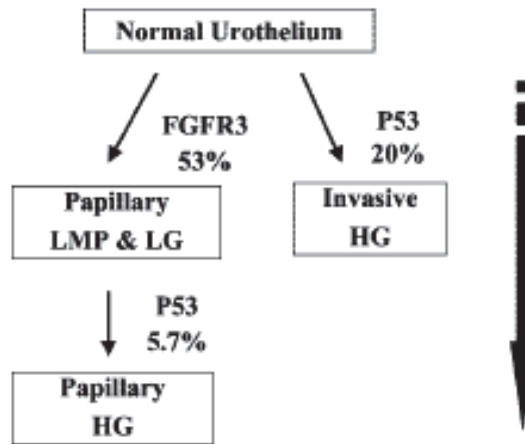


Figure 3 : Les mutations de *p53* et *FGFR3* définissent deux voies distinctes dans la cancérogénèse vésicale (d'après van Rhijn *et al.* 2004 [10]).

Les mutations de *p53* sont responsables du développement de tumeurs invasives et de haut grade (HG) et celles de *FGFR3*, de tumeurs de faible potentiel de malignité (LMP) et de bas grade (LG).

II. NOTRE ETUDE

A) OBJECTIFS

Actuellement, la détection des patients ayant une tumeur de vessie ainsi que la surveillance des patients aux antécédents de tumeur de vessie repose sur la cystoscopie et la cytologie urinaire, avec les inconvénients mentionnés auparavant. De même, nous avons vu qu'à l'heure actuelle, aucun test urinaire, en dehors des cytologies n'est recommandé dans le diagnostic ou le suivi des tumeurs de vessie

Il paraît donc intéressant de développer une nouvelle méthode non invasive, simple et fiable pour détecter dans les urines la présence d'une tumeur de vessie. Notre projet de recherche a fait l'objet d'une collaboration entre le Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) Charles Nicolle de Rouen et la société TOXEM, financé par la région Haute-Normandie et le Fond Européen de Développement Régional (FEDER). Trois phases distinctes sont prévues :

- la première phase, dont cette thèse rapporte les résultats, consiste à rechercher en parallèle les mutations de *p53* et *FGFR3* dans les tumeurs vésicales et le culot urinaire afin d'évaluer notre méthode de détection chez des patients ayant une tumeur de vessie confirmée (cohorte I).
- la deuxième phase consistera à évaluer l'intérêt et la faisabilité en pratique médicale courante de cette nouvelle méthode pour détecter précocement les récurrences tumorales chez des patients aux antécédents de tumeur de vessie au cours de leur surveillance, en association avec la cystoscopie et les cytologies urinaires et évaluer l'impact pronostique des mutations de *p53* et *FGFR3* sur les récurrences tumorales (cohorte II).
- enfin, la dernière phase consistera à utiliser cette nouvelle méthode de dépistage du cancer de la vessie dans une population exposée sur le plan professionnel considérée à risque pour le développement du cancer de vessie (cohorte III).

B) MATERIEL ET METHODES

1) Prélèvement des échantillons

Les patients sélectionnés, faisant partie de la cohorte I du projet, ont bénéficié d'une résection trans-urétrale de vessie au CHU de Rouen entre janvier 2011 et mars 2013. Chez tous ces patients, un prélèvement d'urine était réalisé en début de procédure et était conservé dans un flacon contenant un tampon de thiocyanate de guanidium, à 4°C. L'analyse en anatomo-pathologie du tissu prélevé chez ces patients a confirmé une tumeur et une partie de celle-ci a été conservée en tumorothèque (collection tumorale du service d'anatomo-pathologie du CHU de Rouen) à -80°C jusqu'à son analyse. Les culots urinaires prélevés ont été préparés et conservés à -80°C au Centre d'Investigation Clinique (CIC) du CHU de Rouen. Tous les patients sélectionnés ont reçu une information claire, loyale et appropriée et ont signé une autorisation écrite conforme aux recommandations de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) qui a donné son autorisation pour la réalisation de cette étude.

2) Protocole de préparation des culots urinaires

Les urines, prélevées au bloc opératoire juste avant de débiter la RTUV, étaient diluées au tiers avec un tampon de lyse (666g/L de thiocyanate de guanidium, 17,1g de N-Lauroylsarcosine, 0,05 mol/L d'acétate de sodium, 0,007% de β -mercapto-éthanol) [81, 82]. Ce tampon permettait la stabilisation des ARNm. L'urine était ensuite centrifugée pendant 15 min à 5000 rpm à 4°C puis à 10000g pendant 10 min à 4°C. Le culot était resuspendu avec 150 μ L du surnageant et le tube placé à -80°C jusqu'à analyse.

3) Extraction de l'ARN messenger, rétrotranscription (RT) et PCR (Polymerase Chain Reaction) de *p53*

L'extraction d'ARNm dans les tumeurs et les culots urinaires était réalisée selon le protocole du kit « Illustra QuickPrep Micro mRNA Purification » de GE Healthcare. Après ajout de 400µL de tampon d'extraction et de 800µL de tampon d'élution, l'ARNm était piégé dans une résine d'oligo(dT)-cellulose. Après centrifugation, la résine était conservée pour la poursuite de l'extraction d'ARNm et le surnageant était conservé pour l'extraction ultérieure d'ADN génomique. Après lavage de la résine avec un tampon TrisHCl, les ARNm étaient élués et conservés à -80°C. L'ADN codant (ADNc) de *p53* était obtenu par rétro-transcription grâce au Kit Verso de Thermo Scientific et amplifié par PCR en utilisant les amorces P3 (5'-ATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAA-3') et P4 (5'-ACCCTTTTGGACTTCAGGTGGCTGGAGT-3') [73] avec une polymérase haute-fidélité : la PrimeStar (TaKaRa). Cette PCR était réalisée à partir de 5µL de produit de RT, durant 45 cycles avec une température d'hybridation de 65°C. Le produit de PCR était ensuite migré par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% afin de contrôler l'existence d'une bande d'environ 1 kilobase confirmant l'amplification de l'ADNc de *p53*.

4) Extraction de l'ADN génomique (ADNg)

L'extraction d'ADNg des tumeurs et culots urinaires était réalisée selon le protocole du « Mini Kit QIAamp Viral RNA » de Qiagen sur le surnageant récupéré lors de l'extraction d'ARNm. Après élution, l'ADNg était conservé à -20°C.

5) Analyse fonctionnelle de la protéine P53

Le FASAY est un bio-essai simple, capable d'évaluer la capacité de transcription de la protéine P53. Les mutations de *p53* étaient mises en évidence en analysant la fonctionnalité de la protéine P53 exprimée dans un système eucaryote, la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette souche possède une seule copie fonctionnelle du gène indicateur *ade2* dont l'expression est sous le contrôle de la protéine P53. Un élément de réponse à P53 a été placé

dans le promoteur du gène *ade2*. L'activation du gène *ade2* permet la synthèse d'adénine nécessaire à la croissance des levures et leur permet donc de pousser sur un milieu carencé en adénine. Ainsi, les colonies de levures exprimant une protéine P53 sauvage, cultivées sur milieu minimum sans leucine et avec peu d'adénine (gélose SD-La) étaient blanches alors que les colonies exprimant une protéine P53 mutée étaient rouges, cette couleur rouge résultant d'une accumulation de produits intermédiaires du métabolisme de l'adénine.

Pour la réalisation du FASAY, nous avons utilisé la méthode de transformation des levures par choc thermique en présence d'acétate de lithium (TE-Liac). Le TE-Liac (TrisHCl, EDTA, acétate de lithium) permet de former des pores dans la paroi des levures facilitant ainsi le passage du plasmide. La transformation par choc thermique se faisait par un plasmide linéaire : pSS16. Ce plasmide est un vecteur porteur d'un gène codant pour la leucine, qui est un marqueur d'auxotrophie. En effet, les levures sont étalées sur une gélose SD-La, milieu dépourvu en leucine. En absence de ce plasmide ou si celui-ci ne se circularise pas, les levures ne peuvent pousser. La recombinaison homologe réalisée par Gap Repair avec l'ADNc de *p53* permet la circularisation de ce plasmide. Un schéma résumant la technique du FASAY est représenté **Figure 4**.

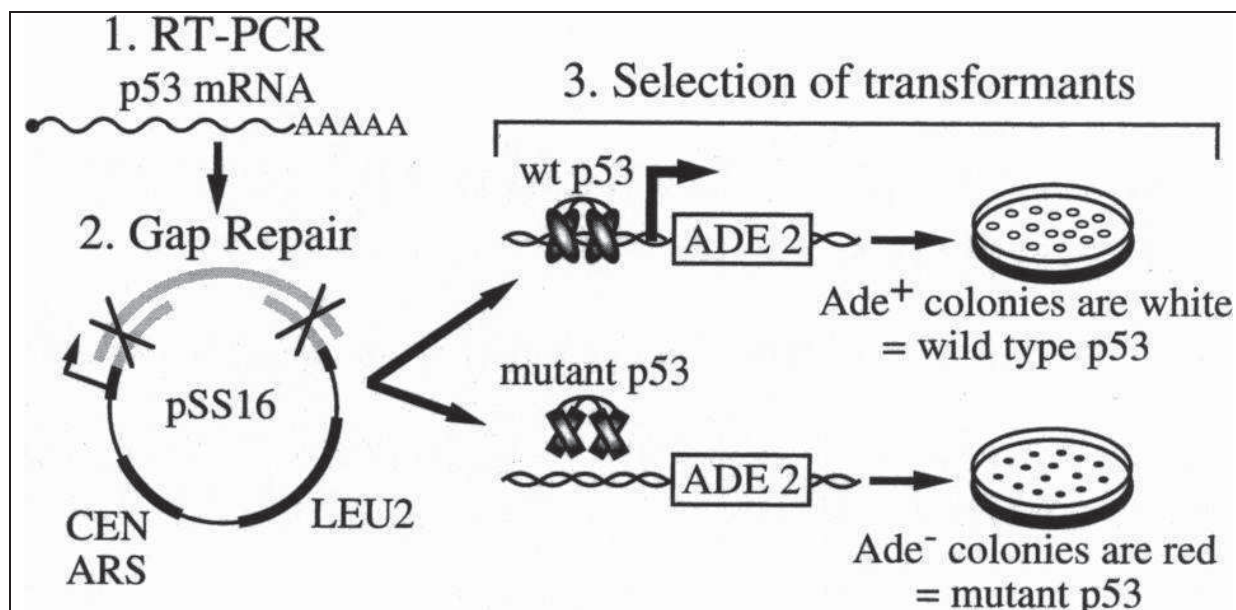


Figure 4 : Technique du FASAY (d'après Flaman *et al.* (1995) [11])

La levure *Saccharomyces cerevisiae* possède une seule copie fonctionnelle du gène indicateur *ade2* dont l'expression est sous le contrôle de la protéine P53. Un élément de réponse à P53 a été placé dans le promoteur du gène *ade2*. Les colonies de levure exprimant *p53* sauvage, cultivées sur milieu minimum sans leucine et avec peu d'adénine, sont blanches alors que les colonies qui expriment *p53* muté sont rouges. Cette couleur rouge résulte d'une accumulation de produits intermédiaires du métabolisme de l'adénine.

Les levures ainsi transformées étaient incubées pendant 3 jours à 30°C. Après deux jours supplémentaires à 4°C pour renforcer le contraste de couleur, les colonies rouges et blanches étaient comptabilisées. L'existence d'un rapport colonies rouges/ colonies totales >10% déterminait l'existence d'une mutation de *p53* [11].

L'ensemble de ce protocole était réalisé en parallèle avec une lignée cellulaire non mutée, MRC-5, qui est une lignée primaire de fibroblastes pulmonaires humains, et ce afin de vérifier la fidélité de la polymérase PrimeStar. MRC-5 servait donc de témoin négatif. Afin de vérifier le fonctionnement de l'expérimentation, un témoin positif, certifiant la transfection des levures par les plasmides était également réalisé par un plasmide fermé pSS16 circulaire. Pour ce témoin positif, les levures qui poussaient étaient alors rouges.

6) Recherche des mutations HOTSPOT de *FGFR3*

Celle-ci était réalisée selon la méthode SNaPshot décrite par Van Oers *et al.* en 2005 [12]. Le principe était le suivant : après amplification des exons d'intérêt par PCR, une réaction d'extension d'amorces était réalisée. Celle-ci était basée sur l'utilisation d'amorces spécifiques s'hybridant en amont du siège potentiel des mutations caractérisées et subissant une extension à l'aide de ddNTP (didéoxynucléotides). Ces derniers étaient couplés à un fluorochrome différent et ne permettaient pas l'incorporation d'autres nucléotides à leur suite (les amorces ne sont étendues que d'un nucléotide unique). La nature de chaque nucléotide incorporé à la suite de l'amorce était déterminée en analysant les amorces par électrophorèse capillaire et par lecture de la fluorescence émise.

Les huit mutations les plus fréquentes du gène *FGFR3*, ponctuelles et très localisées, étaient ainsi recherchées : 2 mutations sur l'exon 7, 2 sur l'exon 10 et 4 sur l'exon 15, selon le protocole détaillé ci-après.

La PCR multiplex était réalisée grâce au Multiplex PCR Kit (Qiagen), à partir de 2,5µL d'ADN génomique, afin d'amplifier nos 3 exons d'intérêt, avec une température d'hybridation de 65°C pendant 45 cycles en utilisant les amorces sens et antisens 5'-AGTGGCGGTGGTGGTGAGGGAG-3' et 5'-CCCACAGCTTCTGCCCCCGA-3' pour l'exon 7, 5'-GGGCATCCATGGGAGCC-3' et 5'-CAGCGTGGGCCGAGGT-3' pour l'exon 10 et 5'-CCCTGAGATGCTGGGAGCAG-3' et 5'-GTGTGGGAAGGCGGTGTTG-3' pour l'exon 15 [12]. Le produit de PCR était ensuite migré par électrophorèse sur un gel d'agarose à 3% afin de contrôler l'existence des 3 bandes à 266 kb (exon 15), 331 kb (exon10) et 374 kb (exon 7) confirmant l'amplification des 3 exons d'intérêt. Une purification de ce produit de PCR était réalisé à l'aide de deux enzymes : la SAP (Shrimp Alkaline Phosphonucléase) et l'EXO 1 (exonucléase 1) afin d'éliminer les amorces et dNTP en excès. Cette purification se faisait à 37°C pendant 1 heure suivie d'une dénaturation à 75°C pendant 15 minutes. La réaction d'extension d'amorces SnaPshot était réalisée en utilisant un mix de 7 amorces, s'hybridant en amont des sites potentiellement porteurs d'une des 8 mutations les plus fréquentes. Les amorces utilisées sont rapportées dans la **figure 5** [12] :

Exon	Amorce	Séquence	Extension d'amorce		Concentration finale dans le mix (μM)
			sauvage	mutant	
7	R248C	5'-T ₄₆ CGTCATCTGCCCCACAGAG-3'	C	T	0,61
7	S249C	5'-T ₂₈ TCTGCCCCACAGAGCGCT-3'	C	G	0,61
7	S249C-2	5'-T ₃₆ TCTGCCCCACAGAGCGCT-3'	C	G	0,61
10	G372C	5'-T ₂₉ GGTGGAGGCTGACGAGGCG-3'	G	T	0,2
10	Y375C	5'-T ₄₃ ACGAGGCGGGCAGTGTGT-3'	A	G	0,61
15	K652E/Q	5'-T ₅₀ GCACAACCTCGACTACTACAAG-3'	A	G/C	0,3
15	K652M/T	5'-T ₂₀ CACAACCTCGACTACTACAAGA-3'	A	T/C	0,2

Figure 5 : amorces utilisées pour l'extension d'amorces SNaPshot [12]

Elles s'hybrident sur l'ADNg en amont des sites potentiellement porteurs d'une mutation

Il existait 2 amorces pour rechercher la mutation sur le codon 249 différant par la taille de leur queue poly(dT). Dans la littérature, la mutation du codon 249 était la plus fréquente, mais les pics en électrophorèse capillaire étaient les plus faibles. La présence de ces 2 amorces était destinée à augmenter la sensibilité du SNaPshot pour la détection de cette mutation [12].

La PCR extension était caractérisée par 28 cycles, avec une température d'hybridation de 50°C.

Après purification, 1,5μL de produit d'extension était déposé dans un puits avec 10 μL d'un mélange de formamide et d'un marqueur de taille (120 LIZ de Applied Biosystems). Les échantillons étaient ensuite analysés grâce au séquenceur du service d'anatomo-pathologie (3130xl Genetic Analyzer d'Applied Biosystems) du CHU de Rouen. La nature de chaque nucléotide incorporé à la suite de l'amorce était déterminée en analysant les amorces par électrophorèse capillaire et par lecture de la fluorescence émise. La comparaison des nucléotides incorporés à un témoin non muté (lignée cellulaire MRC-5) permettait de définir l'existence de mutation dans la tumeur ou le culot urinaire étudié. Les mutations identifiées étaient confirmées par un deuxième passage en SNaPshot à partir d'une nouvelle PCR multiplex. Un schéma représentant le SNaPshot est représenté sur la **Figure 6**.

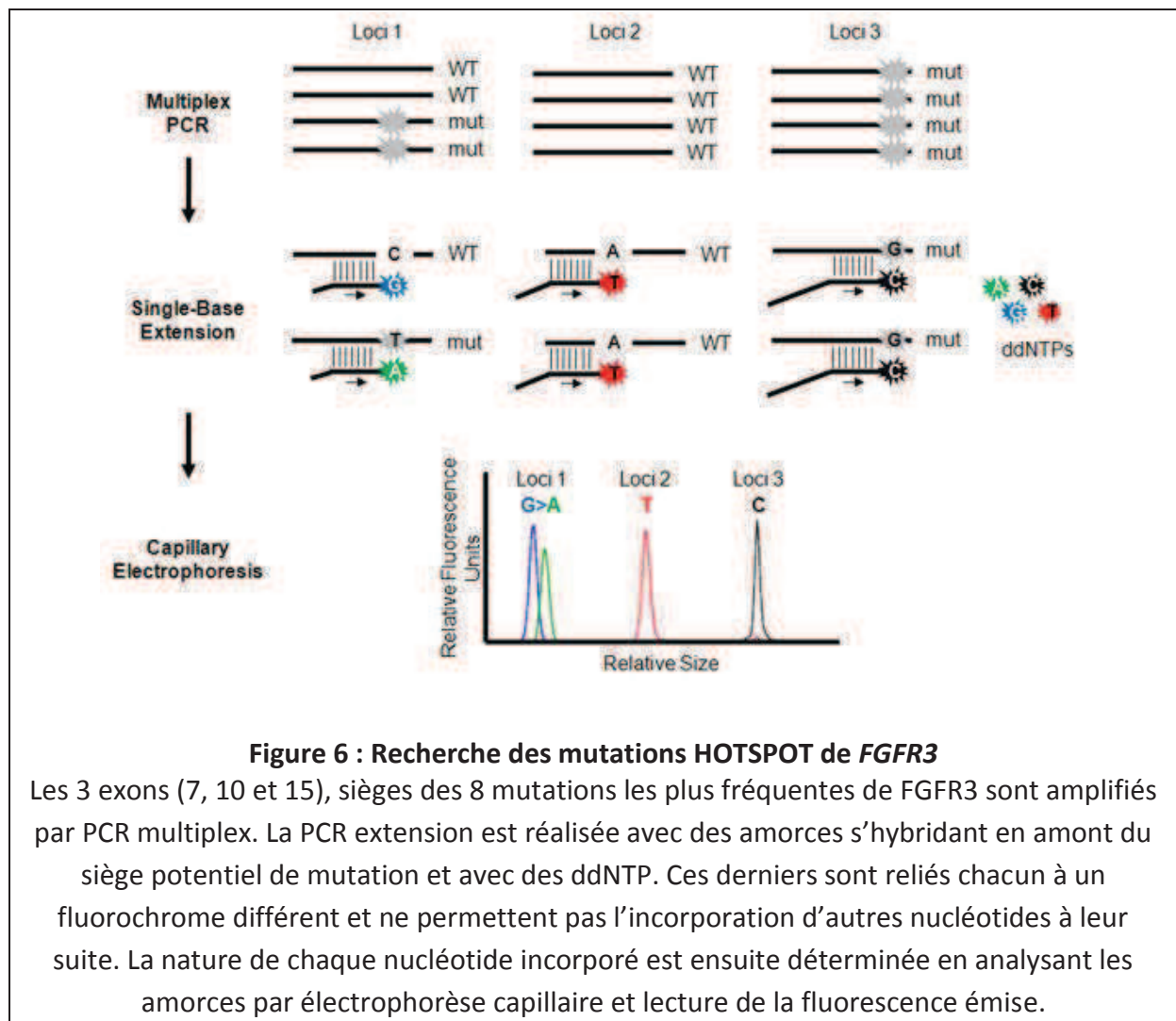


Figure 6 : Recherche des mutations HOTSPOT de *FGFR3*

Les 3 exons (7, 10 et 15), sièges des 8 mutations les plus fréquentes de *FGFR3* sont amplifiés par PCR multiplex. La PCR extension est réalisée avec des amorces s'hybridant en amont du siège potentiel de mutation et avec des ddNTP. Ces derniers sont reliés chacun à un fluorochrome différent et ne permettent pas l'incorporation d'autres nucléotides à leur suite. La nature de chaque nucléotide incorporé est ensuite déterminée en analysant les amorces par électrophorèse capillaire et lecture de la fluorescence émise.

C) ANALYSE STATISTIQUE

Pour l'analyse des mutations de *p53* et *FGFR3* dans les tumeurs, en fonction du stade tumoral et du grade cellulaire, le test de χ^2 a été utilisé pour la comparaison de ces données quantitatives. Lorsque les conditions n'étaient pas réunies pour l'utilisation de ce test (effectifs théoriques inférieurs à 5 dans certains groupes), le test exact de Fisher a été utilisé. Une valeur de $p < 0.05$ était considérée comme significative pour notre étude statistique.

Pour l'analyse de la concordance entre les mutations de *p53* et/ou *FGFR3* dans les tumeurs et le culot urinaire, nous avons calculé de façon classique la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives positives et négatives.

D) RESULTATS

1) Etude des mutations de *p53*

a) Stade tumoral et grade cellulaire des tumeurs

Dans notre étude, 72 tumeurs et culots urinaires ont été étudiés à la recherche de mutation du gène *p53*. Concernant le stade tumoral, 35 tumeurs étaient de stade Ta (49% des cas), 11 de stade T1 (15% des cas), 14 de stade T2 (19% des cas) et 12 (17% des cas) étaient histologiquement du carcinome in situ (**Figure 7**).

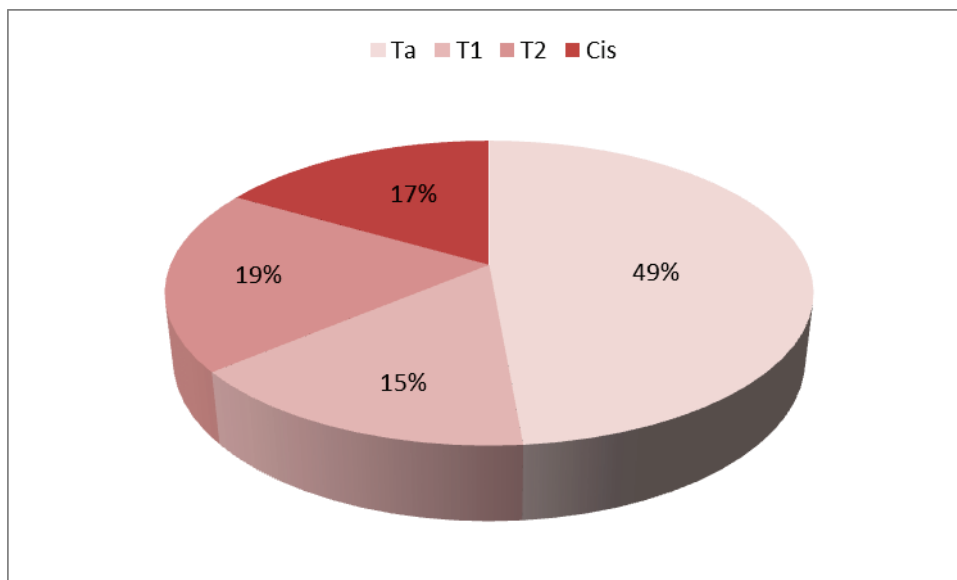


Figure 7 : Répartition des tumeurs étudiées dans la cohorte I à la recherche des mutations de *p53*, selon le stade tumoral.

Concernant le grade cellulaire, 5 tumeurs étaient de grade G1 (7% des cas), 20 de grade G2 (28% des cas) et 47 de grade G3 (65% des cas) (**Figure 8**). Actuellement, la classification OMS 2004 est utilisée pour classer les tumeurs en haut grade et bas grade. Dans notre étude, nous avons utilisé l'ancienne classification OMS 73, plus utilisée pour la classification des tumeurs dans le service d'anatomopathologie du CHU de Rouen.

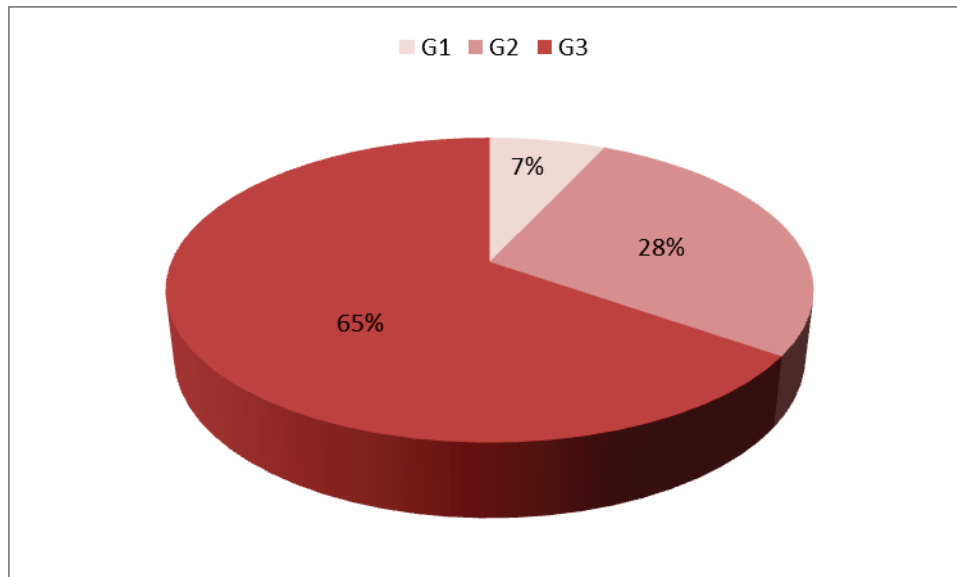


Figure 8 : Répartition des tumeurs étudiées dans la cohorte I à la recherche des mutations de *p53*, selon le grade cellulaire.

b) Etude des mutations de *p53* dans les tumeurs selon le stade tumoral

Au total, sur les 72 tumeurs étudiées, tous stade tumoral et grade cellulaire confondus, 36 patients présentaient une mutation de *p53* dans leur tumeur vésicale (50% des cas) et 36 patients présentaient une tumeur sauvage (wild type : WT) pour *p53*.

Pour les 35 tumeurs de stade Ta étudiées, il existait une mutation de *p53* pour 13 patients (37,1% des cas). Cinq tumeurs de stade T1, sur les 11 étudiées, présentaient cette mutation (45,4% des cas).

Une mutation du gène *p53* était retrouvée pour 11 tumeurs de stade T2 sur 14 (78,5% des cas), de même que pour les 7 tumeurs classées CIS sur 12 (58,4% des cas). Ces résultats sont rapportés dans le tableau 1 et dans la **figure 9**.

Stade tumoral	Statut pour <i>p53</i>	
	WT	Muté
Ta	22 (62,9%)	13 (37,1%)
T1	6 (54,6%)	5 (45,4%)
T2	3 (21,5%)	11 (78,5%)
CIS	5 (41,6%)	7 (58,4%)

Tableau 1 : Répartition des mutations de *p53* dans la cohorte I selon le stade tumoral

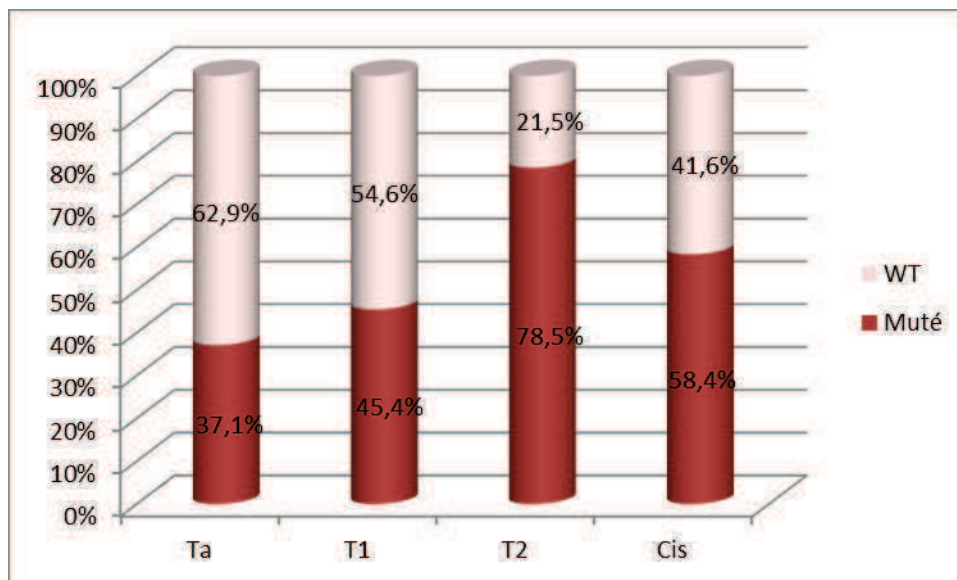


Figure 9 : Histogramme représentant le taux de tumeurs mutées pour *p53* dans la cohorte I en fonction du stade tumoral.

Il n'existait pas de différence significative dans la répartition du taux de tumeurs porteuses d'une mutation de *p53* selon le stade tumoral ($p=0.06$) mais une forte tendance vers la significativité, en faveur d'un taux plus important de mutation de *p53* lorsque la tumeur était classée T2 et CIS.

c) Etude des mutations de *p53* dans les tumeurs selon le grade cellulaire

Sur les 5 tumeurs de grade 1 étudiées, 2 tumeurs étaient porteuses d'une mutation pour *p53* (40% des cas). Quatre tumeurs sur les 20 étudiées de grade 2 étaient mutées pour *p53* (20% des cas). Enfin, 30 tumeurs sur 47 de grade 3 étaient porteuses d'une mutation de *p53* (63,8% des cas).

Ces résultats sont rappelés dans le **tableau 2** et la **figure 10**.

Grade cellulaire	Statut pour <i>p53</i>	
	WT	Muté
G1	3 (60%)	2 (40%)
G2	16 (80%)	4 (20%)
G3	17 (36,2%)	30 (63,8%)

Tableau 2 : Répartition des mutations de *p53* dans la cohorte I selon le grade cellulaire

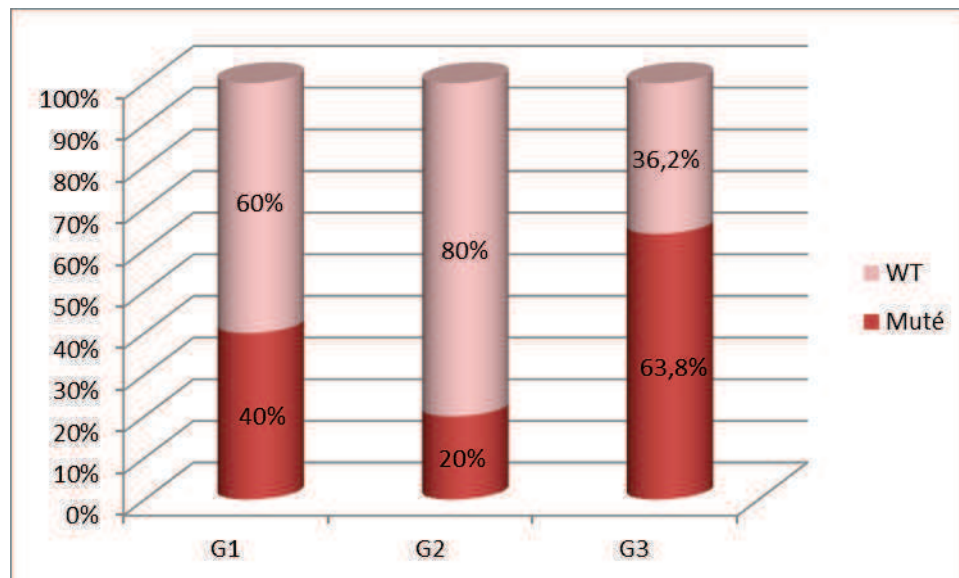


Figure 10 : Histogramme représentant le taux de tumeurs mutées pour *p53* dans la cohorte I en fonction du grade cellulaire

Il existait une différence significative dans la répartition du taux de tumeurs présentant une mutation de *p53* en fonction de leur grade cellulaire ($p=0,002$).

On ne retrouvait pas de différence significative dans la répartition du taux de tumeurs mutées pour *p53* entre les tumeurs G1 et G3 ($p=0.36$) et entre les tumeurs G1 et G2 ($p=1$). Par contre, il existait une différence significative dans la répartition du taux des tumeurs mutées pour *p53* entre les tumeurs classées G2 et G3 ($p= 0.001$), en faveur d'un taux plus élevé de tumeurs mutées lorsque leur grade augmentait.

Comme expliqué auparavant, nous avons utilisé l'ancienne classification OMS 73 pour classer les tumeurs selon leur grade cellulaire. Afin de classer les tumeurs en haut grade et bas grade, selon la classification OMS 2004, nous avons séparé les tumeurs de grade 2 en deux groupes : le premier était composé des tumeurs TaG2 et ces tumeurs étaient ajoutées aux tumeurs G1 afin de former le groupe « bas grade ». Les tumeurs T1G2 étaient ajoutées aux tumeurs de grade 3 pour former le groupe « haut grade ».

Sur les 20 tumeurs G2, 16 ont donc été classées « bas grade » et 4 ont été classées « haut grade ». Sur les 21 tumeurs de « bas grade », 6 présentaient une mutation de *p53* (29%). Sur les 51 tumeurs de « haut grade », 30 présentaient une mutation de *p53* (59%) (**Tableau 3**).

		Statut pour p53	
		WT	Muté
Grade cellulaire	Bas grade	15 (71%)	6 (29%)
	Haut grade	21 (41%)	30 (59%)

Tableau 3 : Répartition des mutations de *p53* dans la cohorte I selon le grade cellulaire classé en bas grade et haut grade

Il existait une différence significative dans la répartition du taux de tumeurs présentant une mutation de *p53* ($p=0,02$), en faveur d'un taux plus important de tumeurs mutées lorsque le grade cellulaire était élevé.

d) Etude de la concordance des mutations de *p53* dans les tumeurs et le culot urinaire correspondant

Une mutation de *p53* était observée pour 36 tumeurs. Cette mutation existait dans 13 cas lors de l'analyse du culot urinaire correspondant et n'a pas été retrouvée dans les 23 autres culots urinaires.

Dans la cohorte I, 36 tumeurs n'étaient pas porteuses d'une mutation à *p53*. 31 culots urinaires correspondant ne présentaient pas de mutation à *p53* et pour les 5 autres, une mutation de *p53* a été retrouvée.

Ces résultats sont rappelés dans le **tableau 4**.

	Tumeurs		
		WT	Mutée
Culots urinaires	WT	31	23
	Muté	5	13

Tableau 4 : concordance des mutations de *p53* dans les tumeurs et le culot urinaire correspondant

La sensibilité, c'est-à-dire la probabilité de détecter dans le culot urinaire une mutation de *p53* existante dans la tumeur, **était de 36,1%**.

La spécificité, c'est-à-dire la probabilité de ne pas retrouver dans le culot urinaire une mutation de *p53*, alors qu'elle n'existait pas dans la tumeur **était de 86,1%**.

La valeur prédictive positive, c'est-à-dire la probabilité que la tumeur soit porteuse d'une mutation de *p53* lorsque le culot urinaire est porteur d'une mutation, **était de 72,2%**.

La valeur prédictive négative, c'est-à-dire la probabilité que la tumeur ne soit pas porteuse de mutation pour *p53* lorsque le culot urinaire n'est pas muté, **était de 57,4%**.

2) Etude des mutations de *FGFR3*

a) Stade tumoral et grade cellulaire des tumeurs

Dans notre étude, 83 tumeurs et culots urinaires ont été étudiés à la recherche de mutation du gène *FGFR3*.

Concernant le stade tumoral, 44 tumeurs étaient de stade Ta (41% des cas), 14 de stade T1 (17% des cas), 18 de stade T2 (22% des cas) et 17 cas de carcinome in situ (20% des cas) (**Figure 11**).

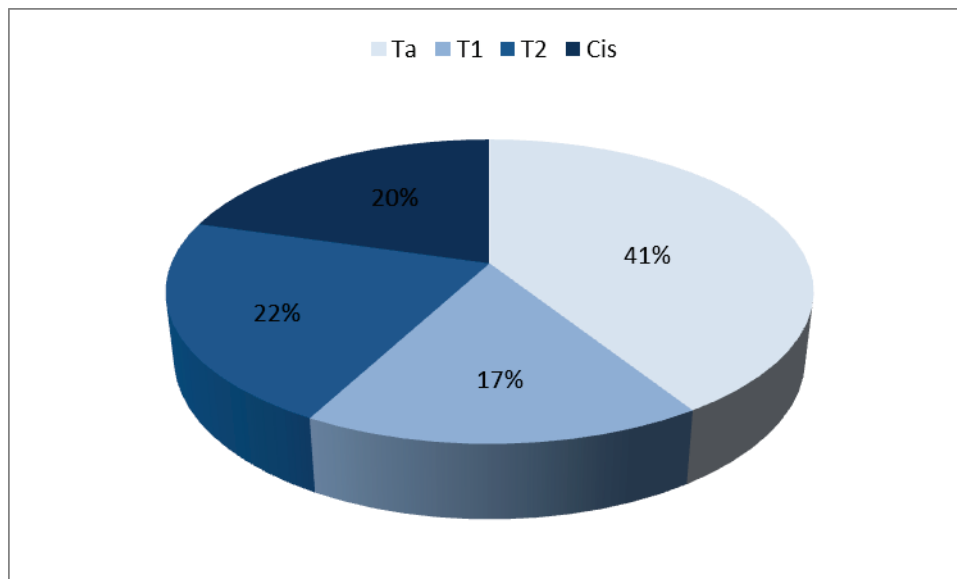


Figure 11 : Répartition des tumeurs étudiées dans la cohorte I à la recherche des mutations de *FGFR3*, selon le stade tumoral.

Concernant le grade cellulaire, 6 tumeurs étaient de grade 1 (7% des cas), 19 tumeurs de grade 2 (23% des cas) et 58 tumeurs de grade 3 (70% des cas) (classification OMS 73) (Figure 12).

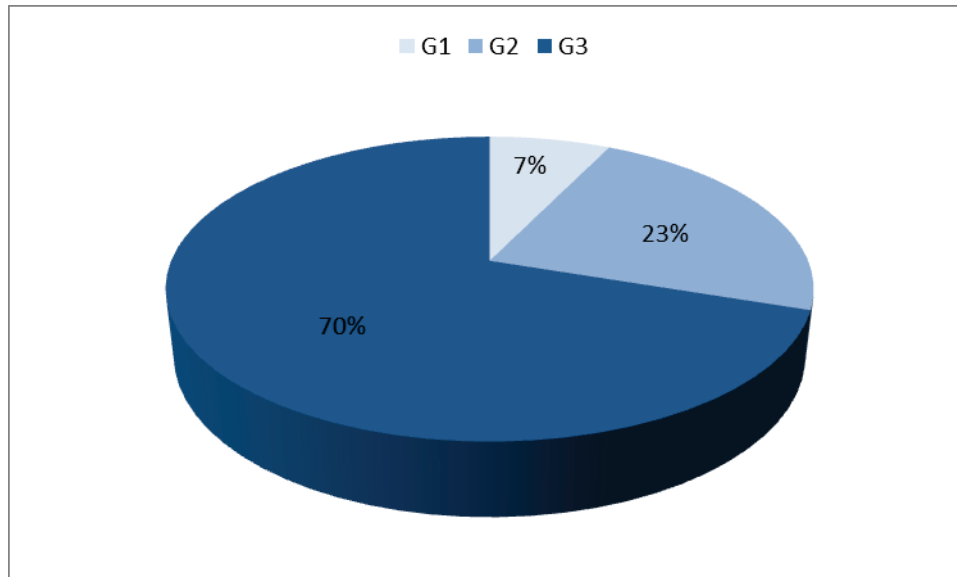


Figure 12 : Répartition des tumeurs étudiées dans la cohorte I à la recherche des mutations de *FGFR3*, selon le grade cellulaire.

b) Etude des mutations de *FGFR3* dans les tumeurs selon le stade tumoral

Au total, sur les 83 tumeurs étudiées, tous stade tumoral et grade cellulaire confondus, il existait une mutation de *FGFR3* chez 21 patients (25,3% des cas).

Sur les 35 tumeurs de stade Ta étudiées, 16 tumeurs présentaient une mutation de *FGFR3* (45,7 % des cas). Trois tumeurs de stade T1, sur les 14 étudiées, étaient porteuses de cette mutation (21,4% des cas). Une mutation du gène *FGFR3* a été retrouvée pour 2 tumeurs de stade T2 sur 18 (11,1%).

Aucune tumeur de carcinome in situ n'a été identifiée comme porteuse d'une mutation de *FGFR3*. Ces résultats sont rapportés dans le **tableau 5** et dans la **figure 13**.

	Statut pour <i>FGFR3</i>		
		WT	Muté
Stade tumoral	Ta	19 (54,3%)	16 (45,7%)
	T1	11 (78,6%)	3 (21,4%)
	T2	16 (88,9%)	2 (11,1%)
	Cis	16 (100%)	0

Tableau 5 : Répartition des mutations de *FGFR3* dans la cohorte I selon le stade tumoral

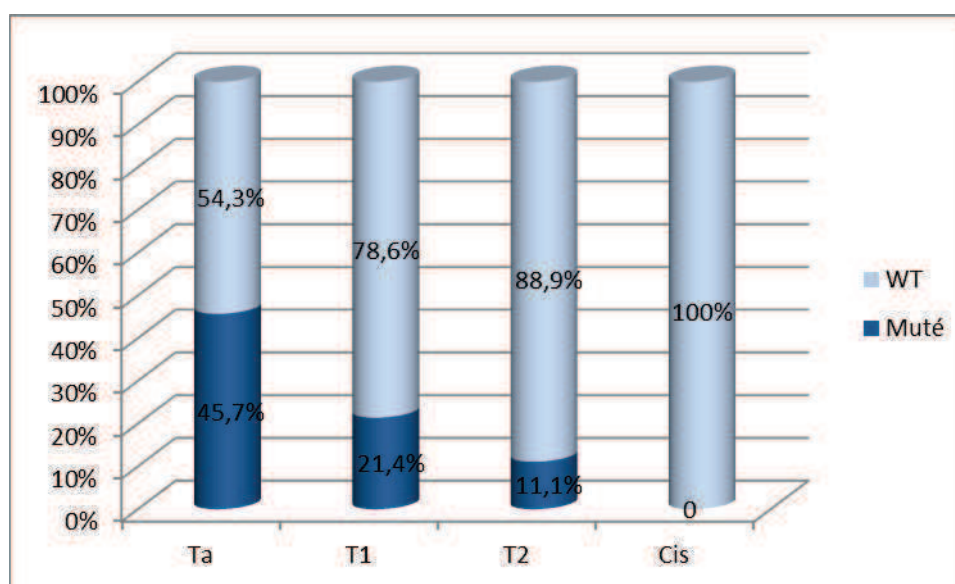


Figure 13 : Histogramme représentant le taux de tumeurs mutées pour *FGFR3* dans la cohorte I en fonction du stade tumoral.

Il existait une différence significative dans la répartition du taux de tumeurs mutées pour *FGFR3* selon le stade tumoral ($p < 0.001$).

Il n'existait pas de différence significative dans la répartition du taux de tumeurs porteuses d'une mutation de *FGFR3* entre les tumeurs de stade Ta et T1 ($p = 0.11$), T1 et T2 ($p = 0.42$), T1 et Cis ($p = 0.09$) et T2 et Cis ($p = 0.16$). Il existait en revanche une différence significative dans la répartition des tumeurs mutées pour *FGFR3* entre les tumeurs de stade Ta et T2 ($p = 0.011$) et Ta et Cis ($p = 0.001$), en faveur d'une diminution du taux de tumeurs mutées pour *FGFR3* lorsque le stade augmentait.

c) Etude des mutations de *FGFR3* dans les tumeurs selon le grade cellulaire

Sur les 6 tumeurs de grade 1 étudiées, 3 tumeurs présentaient une mutation pour le gène *FGFR3* (50% des cas). Onze tumeurs sur les 20 étudiées de grade 2 étaient mutées pour *FGFR3* (55% des cas). Enfin, 7 tumeurs sur les 57 de grade 3 étaient porteuses d'une mutation de *FGFR3* (12,2% des cas).

Ces résultats sont rappelés dans le **tableau 6** et la **figure 14**.

	Statut pour <i>FGFR3</i>		
		WT	Muté
Grade cellulaire	G1	3 (50%)	3 (50%)
	G2	9 (45%)	11 (55%)
	G3	50 (87,8%)	7 (12,2%)

Tableau 6 : Répartition des mutations de *FGFR3* dans les tumeurs selon le grade cellulaire

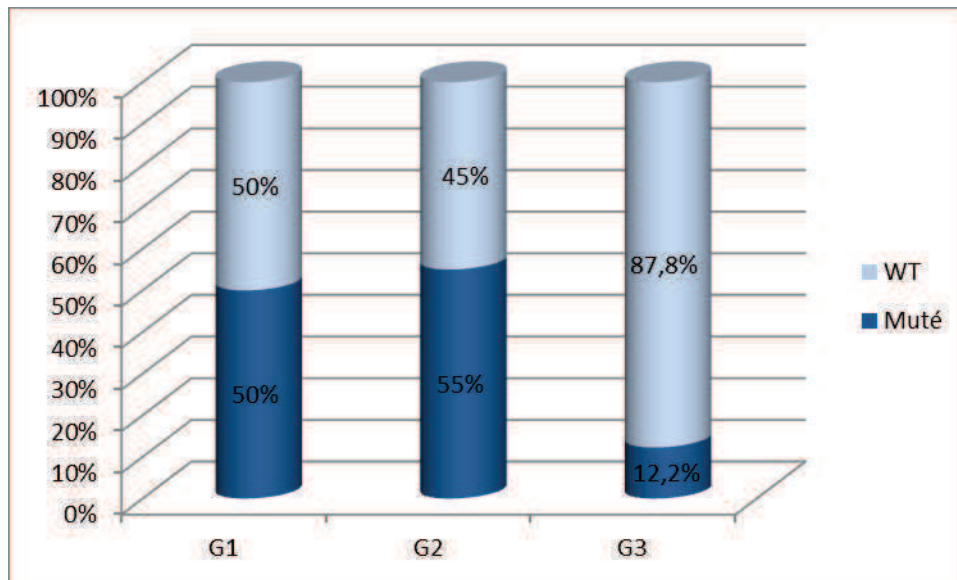


Figure 14 : Histogramme représentant le taux de tumeurs mutées pour *FGFR3* dans la cohorte I en fonction du grade cellulaire.

Il existait une différence significative dans la répartition du taux de tumeurs mutées pour *FGFR3* en fonction du grade tumoral ($p < 0.001$).

Il n'existait pas de différence significative dans la répartition du taux de tumeurs porteuses d'une mutation de *FGFR3* entre les tumeurs de grade G1 et G2 ($p = 1$) et G1 et G3 ($p = 0.04$, mais après application de la correction de Bonferroni, la significativité n'était atteinte que si $p < 0,016$).

Il existait une différence significative dans la répartition des tumeurs mutées pour *FGFR3* entre les tumeurs de grade G2 et G3 ($p < 0,001$), en faveur d'une augmentation du taux de tumeurs mutées lorsque le grade cellulaire augmentait.

De même que pour l'étude des mutations de *p53* dans les tumeurs, nous avons voulu classer les tumeurs en bas grade et haut grade. Sur les 20 tumeurs de grade 2, 16 tumeurs TaG2 ont été classées avec les tumeurs G1 en « bas grade » et 4 tumeurs T1G2 ont été classées avec les G3 en « haut grade ». Sur les 22 tumeurs de « bas grade », 11 présentaient une mutation de *FGFR3* (50% des cas). Sur les 61 tumeurs de « haut grade », 10 présentaient une mutation de *FGFR3* (16%) (**Tableau 7**).

	Statut pour FGFR3		
Grade cellulaire		WT	Muté
	Bas grade	11 (50%)	11 (50%)
	Haut grade	51 (84%)	10 (16%)

Tableau 7 : Répartition des mutations de *FGFR3* dans les tumeurs selon le grade cellulaire classé en « bas grade » et « haut grade »

Il existait une différence significative dans la répartition du taux de tumeurs mutées pour *FGFR3* ($p=0,002$) en faveur d'un taux plus faible de tumeurs de haut grade mutées.

d) Etude de la concordance des mutations de *FGFR3* dans les tumeurs et le culot urinaire correspondant

Une mutation de *FGFR3* a été mise en évidence pour 21 tumeurs. Cette mutation était retrouvée dans 11 culots urinaires correspondant et n'a pas été retrouvée dans les 10 autres culots urinaires correspondant.

62 tumeurs n'étaient pas porteuses d'une mutation pour *FGFR3*. Dans 60 culots urinaires correspondant, il n'existait pas de mutation à *FGFR3*. On retrouvait une mutation pour *FGFR3* dans 2 culots correspondant.

Ces résultats sont rappelés dans le **tableau 8**.

	Tumeurs		
Culots urinaires		WT	Mutée
	WT	60	10
	Muté	2	11

Tableau 8 : concordance des mutations de *FGFR3* dans les tumeurs et le culot urinaire correspondant

La sensibilité, c'est-à-dire la probabilité de détecter dans le culot urinaire une mutation de *FGFR3* existante dans la tumeur, **était de 52,4%**.

La spécificité, c'est-à-dire la probabilité de ne pas retrouver dans le culot urinaire une mutation de *FGFR3*, alors qu'elle n'existe pas dans la tumeur **était de 96,8%**.

La valeur prédictive positive, c'est-à-dire la probabilité que la tumeur soit porteuse d'une mutation de *FGFR3* lorsque le culot urinaire est porteur d'une mutation, **était de 84,6%**.

La valeur prédictive négative, c'est-à-dire la probabilité que la tumeur ne soit pas porteuse de mutation pour *FGFR3* lorsque le culot urinaire n'est pas muté, **était de 85,7%**.

3) Etude de la concordance des mutations du phénotype *p53/FGFR3* dans les tumeurs et le culot urinaire correspondant

Au total dans cette étude, l'analyse du statut de *p53* et *FGFR3* a été réalisée pour 67 couples tumeurs/culots urinaires correspondants.

Une mutation pour *FGFR3* et/ou *p53* existait dans 46 tumeurs (68,6% des cas). Pour ces 46 tumeurs, 26 présentaient une mutation pour *p53* (57%), 13 présentaient une mutation pour *FGFR3* (28%) et nous avons mis en évidence une double mutation, à la fois pour *p53* et *FGFR3*, dans 7 tumeurs (15% des cas) : 1 tumeur TaG1, 2 tumeurs TaG2, 3 tumeurs TaG3 et 1 tumeur T2G3.

La même mutation était retrouvée dans 22 culots urinaires correspondant et n'a pas été mise en évidence dans les 24 autres culots urinaires correspondant.

21 tumeurs ne présentent aucune mutation pour *p53* ou *FGFR3* (31,4% des cas). Dans 16 culots urinaires correspondant, il n'a effectivement pas été retrouvé de mutation de *FGFR3* ou de *p53*, mais une mutation pour au moins l'un des 2 gènes a été retrouvée dans 5 culots urinaires (**Tableau 9**).

	Tumeur		
		WT	Muté
Culots urinaires	WT	16	24
	Muté	5	22

Tableau 9 : concordance des mutations de *p53* et/ou *FGFR3* entre les tumeurs et les culots urinaires correspondant

La sensibilité, c'est-à-dire la probabilité de détecter dans le culot urinaire une mutation de *FGFR3* et/ou *p53* existante dans la tumeur, **était de 47,8%**.

La spécificité, c'est-à-dire la probabilité de ne pas retrouver dans le culot urinaire une mutation de *FGFR3* et/ou *p53*, alors qu'elle n'existe pas dans la tumeur **était de 76,2%**.

La valeur prédictive positive, c'est-à-dire la probabilité que la tumeur soit porteuse d'une mutation de *FGFR3* et/ou *p53* lorsque le culot urinaire est porteur d'une mutation, **était de 81,5%**.

La valeur prédictive négative, c'est-à-dire la probabilité que la tumeur ne soit pas porteuse de mutation pour *FGFR3* et/ou *p53* lorsque le culot urinaire n'est pas muté, **était de 40%**.

Sur ces 67 tumeurs, 18 étaient classées en « bas grade » et 49 en « haut grade ».

Pour la détection des tumeurs de « bas grade », la sensibilité de notre test urinaire était de 25%, la spécificité de 83%, la valeur prédictive positive de 75% et la valeur prédictive négative de 36%.

Pour la détection des tumeurs de « haut grade », la sensibilité de notre test urinaire était de 54%, la spécificité de 79%, la valeur prédictive positive de 86% et la valeur prédictive négative de 40%.

4) Comparaison de la recherche des mutations de *p53* et *FGFR3* dans les urines avec les cytologies urinaires

Dans 37 cas, sur les 67 couples tumeur/culot urinaire analysés pour *p53* et *FGFR3*, des cytologies urinaires ont été réalisées avant la résection trans-urétrale de vessie.

Sur ces 37 couples, 26 tumeurs présentaient une mutation pour *p53* et/ou *FGFR3*. La sensibilité des cytologies urinaires pour la détection de ces 26 tumeurs était de 81%. La sensibilité de notre test pour la détection de ces 26 tumeurs était de 46%. En associant notre test et les cytologies urinaires, la sensibilité était de 88%.

Sur ces 26 tumeurs, 8 étaient de « bas grade ». La sensibilité de détection de notre test de ces tumeurs était de 12,5%, la sensibilité des cytologies urinaires était de 87,5%.

Pour les 18 tumeurs de « haut grade », la sensibilité de détection de notre test urinaire était de 61% et la sensibilité des cytologies urinaires étaient de 77%.

La comparaison de la spécificité de ces tests urinaires ne pouvait être réalisée, étant donné l'absence de bras témoin dans notre étude (absence de patients sans tumeur de vessie).

III. DISCUSSION

A) LES MUTATIONS DE *p53* DANS LES TUMEURS VESICALES

L'analyse des mutations observées de *p53* par le test fonctionnel du FASAY dans les tumeurs de vessie amène plusieurs remarques.

D'une part, sur les 72 tumeurs étudiées, 50% sont porteuses d'une mutation de ce gène (36 cas), confirmant son rôle majeur dans la carcinogénèse vésicale, suspecté par Spruck [8] dès 1994 et confirmé par Bakkar [9] et van Rhijn [10].

D'autre part, il existe une différence du taux de mutation dans ces tumeurs selon leur stade tumoral et leur grade cellulaire. En effet, dans notre étude, plus le stade tumoral comportait une infiltration du chorion, voir du muscle vésical, plus le taux de tumeurs mutées augmentait (37,1% pour les tumeurs Ta versus 78,5 % pour les tumeurs T2). De même, plus le grade cellulaire augmentait, plus le taux de tumeurs mutées pour *p53* était important (40% pour les tumeurs de grade 1 versus 63,8% pour les tumeurs G3), témoignant du rôle de *p53* dans le développement de tumeurs agressives.

Dans notre étude, pour 52% des tumeurs mutées pour *p53*, nous retrouvions un taux de colonies rouges supérieur à 50%, qui évoquait une mutation du gène sur ses 2 allèles. P53 étant un facteur de transcription, l'existence d'une mutation d'un seul des 2 allèles ne suffirait pas pour provoquer des dérégulations et une multiplication anarchique de la cellule. La réalité est plus complexe, certains auteurs ayant décrit un « effet dominant négatif » des protéines P53 mutées dans une cellule [83]. En effet, celles-ci se fixeraient sur les protéines P53 sauvages, entraînant leur inactivation. C'est pour cela que l'existence d'une mutation de *p53* sur un seul des 2 allèles est responsable d'une dégénérescence de la cellule et de l'initiation de la cancérogénèse.

Dans la littérature, trois études, pertinentes pour leur méthodologie méritent d'être discutées.

La première est celle de Lamy *et al.*, publiée en 2006, [84] qui a étudié les mutations de *p53* et *FGFR3* pour 107 tumeurs de vessie en utilisant également le FASAY pour rechercher les mutations de *p53*. Il est décrit une augmentation du taux de mutation de *p53* dans les tumeurs infiltrantes (10% des Ta, 42% des T1 et 58% des T2) et dans les tumeurs de haut grade cellulaire (23% des G1, 3% des G2 et 44% des G3) (**Tableau 10 et 11**).

La seconde étude, publiée en 2004 par van Rhijn *et al.* [10] est intéressante par le nombre de tumeurs étudiées (260 cas). Les mutations de *p53* étaient détectées par immunohistochimie (utilisation d'anticorps anti-*p53*). Il existait également un taux de tumeurs mutées pour *p53* qui augmentait avec le stade tumoral (11% des Ta, 51% des T1 et 56% des T2) et le grade cellulaire (1% des G1, 15% des G2 et 54% des G3) (**Tableau 10**).

La troisième étude est une méta-analyse de Neuzillet *et al.* [85], parue en 2012, réunissant les 8 études les plus pertinentes et puissantes portant sur la recherche des mutations de *p53* et *FGFR3* dans les tumeurs de vessie. Pour la détection des mutations de *p53*, deux études avaient utilisé le FASAY alors que les autres avaient eu recours à la méthode de séquençage. Au total, 917 tumeurs ont été analysées dans cette étude (535 issues des 8 études et 382 issues d'analyse réalisées dans différents centres parisiens). Il était observé un taux de tumeurs mutées pour *p53* augmentant avec le stade tumoral (6,5% des Ta, 40,5% des T1, 50,7% des T2) et grade cellulaire (3,7% des G1, 12% des G2 et 46,3% des G3) (**Tableau 10 et 11**).

	Stade tumoral			Grade Tumoral		
	Ta	T1	T2	G1	G2	G3
Lamy [84] (2006)	44%	33%	23%	12%	26%	62%
Van Rhijn [10] (2004)	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Neuzillet [85] (2012)	38%	39%	23%	8%	27%	65%
Notre étude	58%	18%	24%	7%	28%	65%

Tableau 10 : Caractéristiques (stade tumoral et grade cellulaire) des tumeurs étudiées pour la recherche des mutations de *p53* dans les études de Lamy, van Rhijn, Neuzillet et notre étude

	Technique	Stade tumoral			Grade tumoral		
		Ta	T1	T2	G1	G2	G3
Lamy [84] (2006)	FASAY	10%	42%	58%	23%	3%	44%
Van Rhijn [10] (2004)	Immunohistochimie	11%	51%	56%	1%	15%	54%
Neuzillet [85] (2012)	FASAY et séquençage	7%	40%	51%	4%	12%	46 %
Notre étude	FASAY	37%	46%	79%	40%	20%	64%

Tableau 11 : Comparaison des taux de mutation de *p53* dans les tumeurs vésicales en fonction de leur stade tumoral et de leur grade cellulaire, dans les études de Lamy, van Rhijn, Neuzillet et notre étude

La répartition des mutations de *p53* dans les tumeurs, retrouvée dans notre étude, était donc superposable aux données de la littérature.

Néanmoins le taux de mutation tumoral était supérieur dans notre étude par rapport à celui des précédentes études, quel que soit le stade tumoral et le grade cellulaire. La fréquence des tumeurs de grade 3 dans notre série étant sensiblement équivalente et ne pouvant expliquer cette différence, ceci fait discuter l'importance de la technique utilisée pour la détection des mutations de *p53*. Le FASAY, qui étudie la fonctionnalité de la protéine P53, est une technique fiable et reproductible. Watanabe *et al.* [86], en 2004, concluaient à sa supériorité, en comparaison avec les techniques d'immunohistochimie. Il présente également l'avantage d'être plus simple d'utilisation que les techniques de séquençages, également pourvoyeuses de faux positifs car détectant des mutations du gène *p53* sans conséquence sur sa fonctionnalité.

Cette différence pour le taux de tumeurs mutées à *p53* est maximale dans notre étude pour les tumeurs de stade Ta avec un taux de 37% contre 10, 11 et 7% respectivement dans les études de Lamy, van Rhijn et Neuzillet. Dans notre étude, 5 tumeurs étaient TaG1, 16 étaient TaG2 et 14 étaient TaG3. Le taux de tumeurs mutées à *p53* était de 40% pour les G1, 25% pour les G2 et 50% pour les G3. Nous retrouvons donc dans les tumeurs de stade Ta, une augmentation du taux de mutation en fonction du grade cellulaire (l'analyse des tumeurs de grade 1 étant difficile du fait de leur faible nombre). Le taux de mutation pour les tumeurs Ta de haut grade peut donc expliquer notre pourcentage élevé de tumeurs Ta mutées pour *p53*.

La méthode de recherche des mutations de *p53*, par l'analyse de la fonctionnalité de sa protéine (FASAY), semble de fait la plus pertinente. Elle requiert néanmoins une parfaite conservation du tissu analysé car nécessite la présence d'ARN messager, extrêmement fragile.

B) LES MUTATIONS DE *FGFR3* DANS LES TUMEURS VESICALES

L'analyse de 83 tumeurs a révélé la présence d'une mutation de *FGFR3* dans 21 cas (25%). A l'inverse de *p53*, les mutations de *FGFR3* étaient retrouvées plus fréquemment pour les lésions de faible grade cellulaire (50% des tumeurs G1, 55% des G2 et 12% des G3) ou lorsque la tumeur était peu invasive (45% des tumeurs Ta, 21% des T1 et 11% des T2). Il est d'ailleurs important de noter qu'aucune tumeur agressive de type CIS ne présente de mutation de *FGFR3*.

FGFR3 est à considérer, à l'inverse de *p53*, comme un proto-oncogène, activé par sa mutation et sa surexpression. C'est pourquoi, la mutation d'un seul de ses allèles est responsable d'un phénomène de tumorigénèse.

Dans l'étude de Lamy [84], le SNaPShot a également été utilisé pour rechercher les mutations de *FGFR3*, dans les mêmes tumeurs que pour la recherche des mutations de *p53*, en fonction de leur stade tumoral et de leur grade cellulaire (tableau 11). Il existait une diminution du taux de mutation de *FGFR3* en fonction du stade tumoral (66% des tumeurs Ta mutées, 26% des T1 et 12% des T2) et lorsque le grade cellulaire augmentait (54% des G1, 85% des G2 et 20% des G3) (Tableau 12).

Dans l'étude de van Rhijn [10], la recherche des mutations de *FGFR3* était réalisée par séquençage. Les auteurs observaient également une diminution du taux de mutation de *FGFR3* en fonction du stade tumoral (77% des Ta, 31% des T1 et 15% des T2) et lorsque le grade cellulaire augmentait (85% des G1 mutées, 71% des G2 et 26% des G3) (Tableau 12).

Enfin, dans l'étude de Neuzillet [85], la recherche des mutations de *FGFR3* était réalisée par SNaPShot ou séquençage. Les conclusions étaient les mêmes avec un taux de tumeurs mutées qui diminuait lorsque le stade tumoral augmentait (65% des Ta, 30% des T1 et 11% des T2) et lorsque le grade cellulaire augmentait (70% des G1, 68% des G2 et 19% des G3) (Tableau 12).

	Stade tumoral			Grade tumoral		
	Ta	T1	T2	G1	G2	G3
Lamy [84] (2006)	44%	33%	23%	12%	27%	61%
Van Rhijn [10] (2004)	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Neuzillet [85] (2012)	37%	40%	23%	8%	26%	66%
Notre étude	66%	21%	27%	7%	23%	70%

Tableau 11 : Caractéristiques (stade et grade) des tumeurs étudiées pour la recherche des mutations de *FGFR3* dans les études de Lamy, van Rhijn, Neuzillet et notre étude.

	Technique	Stade tumoral			Grade tumoral		
		Ta	T1	T2	G1	G2	G3
Lamy [84] (2006)	SNaPShot	66%	26%	12%	54%	85%	20%
Van Rhijn [10] (2004)	SSCP	77%	31%	15%	85%	71%	26%
Neuzillet [85] (2012)	SNaPShot et séquençage	65%	30%	11%	70%	68%	19%
Notre étude	SNaPShot	46%	21%	11%	50%	55%	12%

Tableau 12 : Comparaison des taux de mutation de *p53* dans les tumeurs vésicales en fonction de leur stade et de leur grade, dans les études de Lamy, van Rhijn, Neuzillet et notre étude

Nous avons remarqué que, contrairement à *p53*, notre taux global de tumeurs mutées pour *FGFR3* était plus faible, quel que soit le stade tumoral ou le grade cellulaire. Une des explications étant la technique utilisée, le SNaPShot, décrit par van Oers [12] en 2005. Dans cette technique, l'utilisation de 2 amorces était préconisée pour rechercher l'existence d'une mutation du codon 249, la taille du pic sur l'électrophorèse capillaire étant plus faible alors que les mutations de *FGFR3* au niveau de ce codon étaient les plus fréquentes (ce qui est le cas dans notre étude car 12 des 21 mutations de *FGFR3* retrouvées dans les tumeurs sont sur le codon 249). Nous avons rencontré ces difficultés dans l'analyse de ce codon, nécessitant un changement d'amorces pour aboutir à des résultats plus fiables. Ceci a pu contribuer à un taux de détection de mutation sensiblement plus faible. Ce taux plus faible de détection des mutations de *FGFR3* était maximal pour les tumeurs Ta (46% des tumeurs mutées dans notre étude contre 66%, 77% et 65% pour Lamy, van Rhijn et Neuzillet). L'étude détaillée de ce sous-groupe notait un taux de mutation de *FGFR3* de 50% pour les tumeurs G1 et G2 et de 38% pour les tumeurs G3.

Au total, le nombre et la répartition des mutations de *p53* et *FGFR3* dans notre étude, était superposables aux données de la littérature. Nous retrouvons cette image en « miroir », avec un taux de tumeurs mutées pour *p53* qui suit inversement la courbe de celui des tumeurs mutées pour *FGFR3*, en fonction du stade tumoral et du grade cellulaire. Cela permettait de valider notre technique par FASAY et SNaPShot pour la recherche des mutations de *p53* et *FGFR3*.

C) ETUDES DES MUTATIONS DE *p53* DANS LES URINES

Lors de chaque résection de vessie, un prélèvement d'urine était réalisé, dans un tampon de thiocyanate de guanidium, puis conservé à 4°C avant d'être centrifugé. La recherche des mutations de *p53* et *FGFR3* était alors réalisée sur ce culot urinaire.

Dans l'analyse des mutations de *p53*, la sensibilité du test urinaire, c'est-à-dire la probabilité de retrouver dans le culot urinaire des cellules porteuses d'une mutation à *p53* lorsque la tumeur était mutée, approchait 40%. La spécificité était de 86%, la valeur prédictive positive de 72% et la valeur prédictive négative de 57%.

Dans la littérature, peu d'études ont recherché les mutations de *p53* dans les cellules du culot urinaire. La plus importante demeure celle d'Eissa et al. [87], en 2010, comportant 100 patients atteints d'une tumeur vésicale, 93 patients avec une pathologie urologique bénigne et 47 patients témoins sains. Il existait une sensibilité de 37% pour la détection des mutations de *p53* dans les urines et une spécificité de 100%. La recherche des mutations était réalisée par séquençage avec pour les groupes témoins sains de tumeur de vessie, l'absence de toute mutation de *p53* dans les urines (à noter que ce groupe témoin n'existait pas dans notre étude prospective).

Citons également l'étude de Prescott *et al.* [88], publiée en 2001, ayant recherché les mutations de *p53* dans les tumeurs et le culot urinaire correspondant de 49 patients, par séquençage (au total, seulement 20 patients présentaient une tumeur mutée à *p53*). La sensibilité retrouvée était de 84% et la spécificité de 97%.

De même, l'étude de Schlichtholz [77] en 2004 utilisant le FASAY, retrouvait une sensibilité de l'ordre de 80%. Il faut cependant noter que ce résultat ne concernait que 10 patients, le but principal de l'étude était d'analyser la valeur pronostique des mutations de *p53* dans les tumeurs.

Au total, dans notre étude, la sensibilité du test urinaire à la recherche des mutations de *p53*, était faible puisque seulement un tiers des mutations tumorales pour *p53* étaient retrouvés dans le culot urinaire.

Le FASAY, pour la détection des mutations de *p53*, est utilisé sur les tumeurs de vessie depuis de nombreuses années à Rouen. Notre analyse confirmait son efficacité avec un taux de tumeurs mutées de 50%. Son utilisation sur le culot urinaire est plus récente. Deux problèmes peuvent expliquer la faible sensibilité.

Tout d'abord, le nombre de cellules tumorales analysables dans le culot urinaire pouvant rendre difficile la mise en évidence de mutations de *p53*. En effet, le FASAY a été développé à partir de l'étude de tumeurs, riches en cellules. Le taux de 10% de colonies rouges signait l'existence d'une mutation, ce chiffre étant obtenu par comparaison avec le taux de colonies rouges retrouvées dans des tissus non tumoraux. Dans le culot urinaire, le pourcentage de cellules mutées desquamées et récupérées dans les urines est faible par rapport aux cellules desquamant de l'urothélium normal. Ce taux de 10% pourrait être réévalué pour signer la présence de cellules mutées à *p53* dans les urines et nécessiterait donc l'étude de culots urinaires chez des patients sains (témoins négatifs).

Enfin, l'analyse de *p53* est réalisée à partir de l'ARNm, beaucoup plus fragile que l'ADN. Si les urines prélevées étaient immédiatement mises en contact avec un tampon de thiocyanate de guanidium devant stabiliser l'ARNm (testé avant la mise en place de la cohorte) et conservées à 4°C, l'hypothèse qu'une partie du matériel analysable soit détériorée est malgré tout envisageable.

Il est important de noter l'excellente spécificité du test de recherche des mutations de *p53* dans le culot urinaire (86,1%). En effet, les autres marqueurs urinaires testés jusqu'alors péchaient généralement par leur spécificité et leurs faux positifs, ce qui ne semble pas être le cas dans la recherche des mutations de *p53* dans cette étude (spécificité de 75% pour le NMP22, de 74% pour le BTA Stat et de 60 à 80% pour l'ImmunoCyt).

D) ETUDE DES MUTATIONS DE *FGFR3* DANS LES URINES

Dans notre étude, pour la détection des mutations de *FGFR3* dans les urines, la sensibilité de notre test urinaire était de 52,4%, la spécificité était excellente, à 96,8%, la valeur prédictive positive était de 84,6% et la valeur prédictive négative de 85,7%. Ces résultats étaient donc nettement supérieurs à ceux retrouvés pour la recherche des mutations de *p53*, même si la sensibilité restait faible.

Dans la littérature, deux études étaient intéressantes pour comparer nos résultats car utilisant une méthodologie proche.

Citons tout d'abord l'étude de van Rhijn *et al.* [89] dans laquelle les mutations de *FGFR3* étaient recherchées dans 59 tumeurs et culots urinaires correspondant, par séquençage. Parmi les 21 tumeurs présentant une mutation pour *FGFR3*, celle-ci était présente dans le culot urinaire pour 11 patients. La sensibilité du test était donc de 52% et la spécificité de 100%. Ces chiffres étaient superposables aux nôtres, sur un nombre de tumeurs mutées équivalentes.

Van Oers [12], en 2005, dans son étude décrivant le SNaPSHOT, a étudié 64 tumeurs et culots urinaires pour la recherche des mutations de *FGFR3*. Il concluait à la simplicité et à l'efficacité de cette méthode : 29 tumeurs présentaient une mutation pour *FGFR3*, cette mutation était retrouvée dans 18 culots urinaires, soit une sensibilité de 62% et une spécificité de 88%.

Si la sensibilité, dans notre étude, pour la recherche des mutations de *FGFR3* n'était que de 52%, elle apparaissait néanmoins intéressante, en comparaison aux cytologies urinaires, lorsqu'on se rappelle que les mutations de *FGFR3* prédominent dans les tumeurs de faible grade. En effet, selon les études, la sensibilité des cytologies urinaires pour détecter les tumeurs de vessie de bas grade est faible, proche de 20%. Autre point positif, la spécificité de la recherche de *FGFR3* dans les urines était excellente (96,8%).

E) ETUDE DU PHENOTYPE p53/FGFR3 DANS LES TUMEURS VESICALES

Sur les 67 tumeurs étudiées à la recherche des mutations de *p53* et de *FGFR3*, 46 tumeurs (68,6% des cas), présentaient une mutation au moins pour l'un des 2 gènes, dont 26 présentaient une mutation pour *p53* (57%), 13 une mutation pour *FGFR3* (28%) et nous avons mis en évidence une double mutation, à la fois pour *p53* et *FGFR3*, dans 7 tumeurs (15% des cas) : 1 tumeur TaG1, 2 tumeurs TaG2, 3 tumeurs TaG3 et 1 tumeur T2G3. L'existence d'une double mutation au sein d'une même tumeur semblait relever de 2 différents mécanismes d'oncogénèse, qui parfois s'intriquaient occasionnellement. Au moment de la RTUV, dans notre étude, une seule de ces tumeurs était infiltrante, les autres restant superficielles mais de haut grade dans la moitié des cas. Il sera intéressant d'évaluer le pronostic de ces tumeurs, en terme de récurrence et d'infiltration.

F) ETUDE DU PHENOTYPE p53/FGFR3 DANS LES URINES

Nous avons recherché les mutations de *p53* et *FGFR3* dans les urines en tenant compte du statut tumoral des patients, pour 67 couples tumeur/culot urinaire. A notre connaissance, il s'agit de la première étude recherchant les mutations de *p53* et *FGFR3* sur la tumeur et le culot urinaire. Pour ce test urinaire, il existait une sensibilité de 47,8%, une spécificité de 76,2%, une valeur prédictive positive de 81,5% et une valeur prédictive négative de 40%.

L'étude du phénotype tumoral *p53/FGFR3* dans les tumeurs reposait sur les travaux suggérant l'existence de 2 voies majeures dans la cancérogénèse vésicale : l'une pour les tumeurs infiltrantes et/ou de haut grade (mutation de *p53*) et l'autre pour les tumeurs non infiltrantes et/ou de bas grade (mutation de *FGFR3*). La recherche dans le culot urinaire de ce phénotype *p53/FGFR3* trouvait donc toute sa logique. Un point positif était la confirmation de la possibilité d'extraire l'ARNm (pour la recherche de *p53*) et l'ADN (pour la recherche de *FGFR3*) sur un seul et unique prélèvement d'urine. Néanmoins, il existe des limites à ce test urinaire que nous avons mis en évidence au cours de notre étude.

Confirmant les résultats obtenus lors de l'analyse séparée des mutations de *FGFR3* et *p53*, la sensibilité reste faible puisque moins d'une tumeur mutée sur 2 est détectée dans les urines.

Nous avons recherché si les tumeurs de haut grade étaient détectées plus fréquemment avec notre test urinaire. Pour cette analyse, nous avons séparé les tumeurs de grade 2 en « bas grade » lorsqu'elles étaient de stade Ta et en « haut grade » lorsqu'elles étaient de stade T1. Cette classification est critiquable car rigoureusement, il faudrait relire les lames histologiques de ces tumeurs pour les classer en bas ou haut grade. En l'absence de relecture, elle nous a paru la plus proche de la réalité, permettant une analyse plus solide et plus moderne.

La sensibilité de détection des tumeurs de « haut grade » était de 54% et la spécificité de 79%. Pour la détection des tumeurs de « bas grade », la sensibilité diminuait à 25% et la spécificité augmentait à 83%. Ces résultats étaient décevants, notamment pour la détection des tumeurs de bas grade cellulaire. En effet, ces tumeurs étaient celles pour lesquelles la cytologie urinaire était moins informative. Nous aurions pu espérer une meilleure sensibilité avec notre test urinaire, avec la recherche de *FGFR3*, fréquemment muté dans les tumeurs de bas grade. Ces différents résultats sont à analyser à la lumière des remarques faites auparavant, à savoir que le taux de tumeurs de faible grade cellulaire et stade tumoral, mutées pour *FGFR3*, était finalement faible dans notre étude.

Pour Zuiverloon *et al.* [90], la taille de la tumeur vésicale augmentait la sensibilité pour la détection des mutations de *FGFR3* dans les urines (sensibilité de 100% pour un volume tumoral supérieur à 3 cm). Dans cette étude, les urines étaient collectées chaque jour, pendant 6 jours avant la RTUV. Réaliser des prélèvements urinaires successifs (comme c'est le cas pour les cytologies urinaires sur 3 jours) est effectivement une méthode pouvant permettre d'augmenter la sensibilité, la probabilité de récolter des cellules tumorales étant majorée. Enfin, comme cela a été décrit pour plusieurs tests urinaires, associer notre test aux résultats de la cytologie urinaire devrait permettre également d'augmenter la sensibilité de détection des tumeurs vésicales.

Dans notre étude, en associant notre test aux cytologies urinaires, la sensibilité de détection d'une tumeur vésicale mutée à *p53* et/ou *FGFR3* était de 88% (pour les 26 tumeurs mutées). Mais notre test n'a détecté que 2 tumeurs non détectées par les cytologies urinaires. Dans notre étude, la comparaison de notre test aux cytologies urinaires trouve

plusieurs limites. Tout d'abord, le faible effectif (26 patients) utilisé pour comparer les sensibilités des 2 tests urinaires. Puis, l'impossibilité de comparer la spécificité du test, notre étude ne comportant pas de bras témoin de patients sans tumeur de vessie. On peut également évoquer les différences de réalisation de ces tests puisque les cytologies urinaires n'ont été réalisées dans les mêmes conditions que notre test seulement chez la moitié des patients (les autres ayant été réalisées en ville, parfois de manière répétée). Ce qui amène la dernière limite qui est le taux anormalement élevé de la sensibilité des cytologies urinaires dans notre test (81%), notamment pour les tumeurs de faible grade (87,5% des 8 tumeurs de faibles grades détectées par la cytologie urinaire).

Il est intéressant de noter la bonne spécificité de notre test, de même que sa valeur prédictive positive, attestant du faible nombre de faux positifs et donc de la nécessité de rechercher une tumeur de vessie en cas de positivité du test. Ces données sont importantes pour un test de dépistage ou de surveillance afin de limiter les explorations inutiles.

Concernant le taux de faux positifs de notre test, nous ne disposons pas dans notre étude prospective d'un bras témoin, (patients sans tumeur vésicale, ayant par exemple une endoscopie vésicale pour hypertrophie bénigne de prostate), pour éliminer chez ces patients la présence de mutations de *p53* ou *FGFR3* dans les urines. Eissa *et al.* [87] avaient recherché, sans aucun résultat positif, des mutations de *p53* dans les culots urinaires de 140 patients sans tumeur ou antécédents de tumeur de vessie.

Forts de ce résultat, deux hypothèses peuvent expliquer la présence d'une mutation dans le culot urinaire alors que la tumeur de vessie correspondante n'en exprimait pas (5 cas sur 67 patients dans notre étude). Tout d'abord, on peut suspecter l'existence associée d'une tumeur urothéliale du haut appareil urinaire. Dans notre étude, le bilan du haut appareil n'avait pas révélé ce type de lésion chez les 5 patients. Enfin, il faut se rappeler que la résection de vessie emporte de la tumeur mais aussi du tissu sain. L'analyse du tissu à la recherche de mutation de *p53* chez ces 5 patients a ainsi pu intéresser un fragment tissulaire sain.

Enfin, il est également essentiel de rappeler que notre test urinaire ne recherchait que les tumeurs mutées à *p53* et/ou *FGFR3* qui ne représentent que 2/3 des tumeurs de la vessie.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a permis d'évaluer un nouveau test urinaire pour la détection des tumeurs de vessie. La sensibilité du test *p53/FGFR3* dans les urines (48%) ne permet actuellement pas de remplacer le couple cytologies/fibroscopie vésicale dans le diagnostic et la surveillance des tumeurs de vessie mais peut se positionner comme un complément. L'analyse des mutations de *p53* et *FGFR3* dans les tumeurs a confirmé le rôle majeur joué par ces gènes dans la cancérogénèse vésicale, le premier dans les tumeurs agressives et/ou infiltrantes, le second dans les tumeurs peu agressives et/ou non infiltrantes. Forts de ces résultats, le rôle de ces gènes dans le pronostic tumoral vésical (récidive, infiltration) mérite d'être étudié.

En effet, deux types de population sont à risque de tumeur de vessie et nécessitent une surveillance : les patients aux antécédents de tumeur de vessie et les patients exposés professionnellement à des carcinogènes urinaires.

Pour les premiers, le taux de récurrence tumoral est estimé à 70% la première année. La recherche des mutations de *p53* et *FGFR3* dans les urines peut être réalisable en parallèle des cytologies urinaires, permettant d'augmenter la sensibilité de détection des tumeurs vésicales sans en altérer la spécificité, cette dernière restant en effet élevée dans notre test (76%). C'est donc l'objectif de la phase II de notre projet FEDER, qui évaluera l'intérêt de notre test dans le suivi des patients aux antécédents de tumeur de vessie, notamment dans la détection précoce des récurrences tumorales. Cette phase II évaluera également l'impact pronostique des mutations de *p53* et *FGFR3* dans la récurrence et l'infiltration tumorale. En effet, pour certains auteurs, l'existence d'une mutation à *p53* dans la tumeur initiale aurait un rôle pronostique péjoratif dans la survie sans récurrence, au contraire des mutations de *FGFR3*. Mais ces données sont contradictoires dans la littérature.

Pour la surveillance des travailleurs exposés professionnellement à des carcinogènes urinaires, les recommandations actuelles établies par l'AFU, la Société Française de Médecine du Travail (SFMT) et la Haute Autorité Sanitaire (HAS) n'ont pas validé d'autres tests que les cytologies urinaires pour le dépistage des tumeurs de vessie. Il sera donc intéressant d'évaluer l'apport diagnostique de notre test, associé aux cytologies urinaires dans le dépistage des tumeurs de vessie dans cette population. Ceci représente la phase III de notre projet.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Haiyan C, Meilin W, Zhendong Z. Bladder cancer epidemiology and genetic susceptibility. *J Biomed Res* 2013 May; 27(3): 170-178
- [2] Burch JD, Rohan TE, Howe GR *et al.* Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: a case-control study. *Int J Cancer* 1989; 44:622-8
- [3] Irani J. Prise en charge des tumeurs de vessie n'infiltrant pas le muscle (TVNIM). *Prog Urol* 2009; 19, 248-253
- [4] Pfister C, Roupret M, Wallerand H *et al.* (Oncology Committee of the French Association of Urology). Recommendations onco-urology 2010 : Urothelial tumors. *Prog Urol* 2010; 4:S255-74
- [5] 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* 2001; 47:379-83.
- [6] Paoluzzi M, Cuttano MG, Mugnaini P *et al.* Urinary dosage of nuclear matrix protein 22 (NMP22) like biologic marker of transitional cell carcinoma (TCC): a study on patients with hematuria. *Arch Ital Urol Androl* 1999; 71:13-18.
- [7] Sarosdy MF, Kahn PR, Ziffer MD *et al.* Evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization (FISH) assay in the initial diagnosis of bladder cancer in patients with hematuria. *J Urol* 2004; 171 (4 Suppl):66
- [8] Spruck CH 3rd, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M *et al.* Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1994 1; 54(3):784-8
- [9] 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 research* 2003; 63(23):8108-12
- [10] Van Rhijn BW, Van der Kwast TH, Vis AN *et al.* *FGFR3* and *TP53* characterize alternative genetic pathways in pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res.* 2004; 64(6):1911
- [11] Flaman JM, Frebourg T, Moreau V *et al.* A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 25;92:3963-7
- [12] 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. *Clin Cancer Res* 2005; 11(21):7743-8
- [13] Wu X, Ros MM, Gu J *et al.* Epidemiology and genetic susceptibility to bladder cancer. *BJU Int.* 2008; 102:1207-15
- [14] Chopin D, Gattegno B. Epidemiologie descriptive des tumeurs superficielles de la vessie. *Prog Urol* 2001; 11:953-960

- [15] Belot A, Grosclaude P, Bossard N *et al.* Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2008; 56:159-75
- [16] Irani J. Epidemiologie du cancer de vessie. *Prog Urol*, 2003; 13: 1207-1208
- [17] Rebillard X, Grosclaude P, Leuret T *et al.* Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer urologique en France en 2010. *Prog Urol*. 2010, Suppl.4, S211-S214
- [18] Zeegers MP, Tan FE, Dorant E *et al.* The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer* 2000; 89:630-639
- [19] Brennan P, Bogillot O, Greiser E *et al.* Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 2000; 86:289-94
- [20] Aveyard P, Adab P, Cheng KK *et al.* Does smoking status influence the prognosis of bladder cancer? A systematic review. *BJU Int*. 2002; 90:228-239
- [21] Rehn L. Blasengeschwuelste bei Fuchsin-Arbeiten. *Arch Klin Chir* 1895: 588-600
- [22] Guy L. Les tumeurs de vessie d'origine professionnelle. *Progrès FMC* 2007; 17,4,18-24
- [23] Imbernon E. Estimation du nombre de cas de certains cancers attribuables à des facteurs professionnels en France : 15-16. Département santé travail- Institut de veille sanitaire, 2003, 28 pages, Saint-Maurice, France
- [24] Donato F, Boffeta P, Fazioli R *et al.* Bladder cancer, tobacco smoking, coffee and alcohol drinking in Brescia, northern Italy. *Eur J Epidemiol* 1997; 13:795-800
- [25] Pelucchi C, Negri E, Franceschi S *et al.* Alcohol drinking and bladder cancer. *J Clin Epidemiol* 2002; 55:637-41
- [26] Zeegers MP, Volovics A, Dorant E *et al.* Alcohol consumption and bladder cancer risk: results from The Netherlands Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2001; 153:38-41
- [27] Widran J, Sanchez R, Gruhn J. Squamous metaplasia of the bladder: a study of 450 patients. *J Urol* 1974; 112, 479-485
- [28] Laskowski TZ, Scott FB. Cutaneous vesicostomy as means of urinary diversion: 3 years of experience. *J Urol* 1965; 94, 549-554
- [29] Kaufman JM, Fam B, Jacobs SC *et al.* Bladder cancer and squamous metaplasia in spinal cord injury patients. *J Urol*, 1997; 118, 967-971
- [30] Sheaff M, Jenkins BJ. Squamous cell carcinoma of the bladder following radiotherapy for transitional cell carcinoma. *Br J Urol* 1994; 74, 131-132
- [31] El-Bolkainy MN, Mokhtar NM, Ghoneim MA *et al.* The impact of schistosomiasis on the pathology of bladder carcinoma. *Cancer* 1981; 48, 2643-2648
- [32] Stamatiou K, Papadoliopoulos I, Dahanis S *et al.* The accuracy of ultrasonography in the diagnosis of superficial bladder tumors in patients presenting with hematuria. *Ann Saudi Med* 2009 Mar-Apr; 29(2): 134-137

- [33] Rouprêt M, Seisen T, Compérat E *et al.* Prognostic interest in discriminating muscularis mucosa invasion (T1a vs T1b) in nonmuscle invasive bladder carcinoma: French national multicenter study with central pathology review. *J Urol.* 2013 Jun; 189(6):2069-76
- [34] Pointreau Y, Klotz S, Denis F *et al.* *Cancer/radiothérapie* 2010 Vol 14 p189-197
- [35] May M, Brookman-Amissah S, Roigas J *et al.* Prognostic Accuracy of Individual Urologists in Non Invasive Urinary Bladder Carcinoma : A Multicentre Study Comparing the 1973 and 2004 World Health Organisation Classifications. *Eur Urol* 2009; 10.1016
- [36] Karl A, Carroll PR, Gshwend JE *et al.* The impact of lymphadenectomy and lymph node metastasis on the outcomes of radical cystectomy for bladder cancer. *Eur Urol* 2009; 55:826-35
- [37] 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. *Eur Urol* 2006; 49:466-77
- [38] Huncharek M, McGarry R, Kupelnick B. Impact of intravesical chemotherapy on recurrence rate of recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: results of a meta-analysis. *Anticancer Res* 2001; 21:765-9
- [39] Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD *et al.* Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study. *J Urol* 2000 Apr; 163(4):1124-9
- [40] Karmouni T, Bensalah K, Alva A *et al.* Place de l'antibioprophylaxie lors d'une cystoscopie en ambulatoire. *Prog Urol* 2001; 11,11,1239-1241
- [41] Almallah YZ, Rennie CD, Stone J *et al.* Urinary tract infection and patient satisfaction after flexible cystoscopy and urodynamic evaluation. *Urology* 2000 Jul; 56(1):37-9.
- [42] Witjes JA, Redorta Palou J, Jacqmin D *et al.* Hexaminolevulinate-guided fluorescence cystoscopy in the diagnosis and follow up of patients with non muscle invasive bladder cancer; review of the evidence and recommendations. *Eur Urol* 2010; 57:607-614.
- [43] Jocham D., Witjes F., Wagner S. *et al.* Improved detection and treatment of bladder cancer using Hexaminolevulinate Imaging: a prospective, phase III multicenter study. *J Urol* 2005; 174:862-866.
- [44] Meuleman E.J., Delaere K.P. Diagnostic efficacy of the combination of urine cytology, urine analysis and history in the follow-up of bladder carcinoma. *Br J Urol*, 1988; 62(2): p. 150-3.
- [45] Fontanière B, Ranchère-Vince D, Landry JL *et al.* Critères de qualité de la cytologie urinaire pour le diagnostic tumoral. *Prog Urol* 2011 ; 11,867-875
- [46] Grossman H.B. New methods for detection of bladder cancer. *Semin Urol Oncol* 1998; 16: 17-22
- [47] Kannan V, Bvose S : Low grade transitional cell carcinoma and instrument artefact. A challenge in urinary cytology. *Acta Cytol*, 1993; 37: 899-902
- [48] Quek P, Chin CM, Lim PH. The role of BTA stat in clinical practice. *Ann Acad Med Singapore* 2002; 31:212-16

- [49] Irani J. : Les nouveaux tests diagnostiques des tumeurs urothéliales de vessie. *Prog Urol* 1998; 8 : 481-486.
- [50] Stampfer D.S., Carpinito G.A., Rodriguez- Villanueva J.: Evaluation of NMP in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 1998; 159:394-398.
- [51] Campos-Fernandes JL, Descotes F, Andre J *et al.* Intérêt des marqueurs urinaires dans le diagnostic et le suivi des tumeurs urothéliales de vessie. *Prog Urol* 2007; 17,23-24
- [52] Berezney R: The nuclear matrix : a heuristic model for investigating genomic organization and function in the cell nucleus. *J Cell Biochem* 1991; 47 : 109-123.
- [53] Shariat S.F., Zippe C., Ludecke G. *et al.* : Normograms including nuclear matrix protein 22 for prediction of disease recurrence and progression in patients with Ta, T1 or CIS transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2005; 173 : 1518-1525.
- [54] Johnston B., Moraes A., Emerson L. *et al.*: Rapid detection of bladder cancer : a comparative study of point of care tests. *J Urol* 1997; 158 : 2098- 2103
- [55] Saint F, Quintens H, Roupret M, *et al.* Actualités urologiques concernant les tests diagnostiques utilisés pour les tumeurs de vessie : le NMP22. *Prog Urol* 2011; 21, 4, 245-249
- [56] Gupta NP, Sharma N, Kumar R. Nuclear Matrix protein 22 as adjunct to urine cytology and cystoscopy in follow-up of superficial TCC of urinary bladder. *Urology* 2009; 73:592-596
- [57] Budman LI, Kassouf W, Steinberg JR. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Can Urol Assoc J* 2008 Jun; 2(3): 212-221
- [58] Gutierrez Banos J.L., Martin Garcia B., De Diego Rodriguez E. *et al.*: The BTA STAT test in the follow-up for bladder cancer. *Arch Esp Urol* 1999; 52 : 856-861.
- [59] Sharma S, Zippe CD, Pandrangi L, *et al.* Exclusion criteria enhance the specificity and positive value of NMP22 and BTA Stat. *J Urol* 1999 Jul; 162(1):53-7
- [60] Raitanen MP, Hellstrom P, Martilla T *et al.* Effect of intravesical instillations on the human complement factor H related protein (BTA Stat) test. *Eur Urol* 2001; 40:422-6
- [61] Pfister C., Chautard D., Devonec M., *et al.*: Immunocyt test improves the diagnostic accuracy of urinary cytology : results of a French multicenter study. *J Urol* 2003; 169: 921-924.
- [62] Lodde M., Mian C., Negri G., *et al.*: Role of uCyt+ in the detection and surveillance of urothelial carcinoma. *Urology* 2003; 61: 243-247.
- [63] Mian C, Lodde M, Comloj E *et al.* The value of the ImmunoCyt/uCyt+ test in the detection and follow-up of carcinoma in situ in the urinary bladder. *Anticancer Res* 2005; 25:3641-4
- [64] Piaton E., Ruffion A., Collet F. *et al.* : Apport de l'immunocytochimie en fluorescence (uCyt+) dans la surveillance après résection des tumeurs vésicales. *Prog Urol* 2004; 14: 315-319.
- [65] Placer J, Espinet B, Salido M *et al.* : Clinical evaluation of multiprobe FISH assay in voided urine specimens for the detection of bladder cancer and its recurrences compared with urinary cytology. *Eur Urol* 2002;42: 547-552

- [66] Sarosdy MF, Schellhamer P, Bokinsky G : Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J Urol* 2002; 168: 1950-1954
- [67] Hautmann S, Toma M, Lorenzo Gomez MF *et al.* Immunocyt and the HA-HAase urine tests for the detection of bladder cancer: a side-by-side comparison. *Eur Urol* 2004 Oct; 46(4):466-71
- [68] Little B, Hugues A, Young MR *et al.* : Use of a polymerase chain reaction analysis of urinary DNA to detect bladder carcinoma. *Urol Oncol* 2005 ; 23:102-107
- [69] Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M *et al.* : Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 1996; 271: 659-662.
- [70] Mourah S, Cussenot O, Vimont V *et al.*: Assesment of microsatellite instability in urine in the detection of transitional-cell carcinoma in the bladder. *Int J Cancer* 1998; 79:629-633
- [71] Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE *et al.* The P53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *J Urol* 2003; 169(4): 1219-28
- [72] Lodish H, Berk A, Zipurskys L *et al.* *Molecular cell biology*, TENNEY S (Ed), United states 1999
- [73] Hermeking H, Lengauer C, Polyak K *et al.* 14-3-3 σ is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular Cell* 1998; 1, 3-11
- [74] Braithwaite AW, Royds JA, Jackson P. The P53 story: layers of complexity. *Carcinogenesis* 2005; 1161-1169
- [75] Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ. The role of *p53* in apoptosis. *Discov Med* 2010; 9(45):145-52
- [76] Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH *et al.* Frequent *FGFR3* mutations in papillary non-invasive Bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 2001; 158:1955-1959
- [77] 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; 12: 2319-2323
- [78] Pfister C, Flaman JM, Martin C *et al.* Selective detection of inactivating mutations of the tumor suppressor gene *p53* in bladder tumors. *J Urol* 1999; 161(6):1973-5
- [79] Sibley K, Cuthbert D, Knowles M. Loss of heterozygosity at 4p16.3 and mutations of *FGFR3* in transitional cell carcinoma. *Oncogene* 2001 20: 686-691
- [80] Zieger K, Dyrskjot L, Wiuf C *et al.* Role of activating *FGFR3* mutations in the development of bladder tumors. *Clin Cancer Res* 2005 11:7709-7719
- [81] Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 2006; 1(2):581-5
- [82] Menke T, Warnecke J. Improved conditions for isolation and quantification of RNA in urine specimens. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1022:185-9

- [83] Dridi W, Krabchi K, Gadji M *et al.* Dominant negative activity of mutated p53 proteins. *Med Sci* 2006 Mar; 22(3):301-7.
- [84] Lamy A, Gobet F, Laurent M *et al.* Molecular profiling of bladder tumors based on the detection of *FGFR3* and *TP53* mutations. *J Urol* 2006; 176:2686-9
- [85] 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)
- [86] Watanabe J, Nishiyama H, Okubo K *et al.* Clinical evaluation of *p53* mutations in urothelial carcinoma by IHC and FASAY. *Urology* 2004 May; 63(5):989-93.
- [87] Eissa S, Zohny SF, Zekri AR *et al.* Diagnostic value of fibronectin and mutant p53 in the urine of patients with bladder cancer: impact on clinicopathological features and disease recurrence. *Med Oncol* 2010 Dec; 27(4):1286-94
- [88] Prescott JL, Montie J, Pugh TW *et al.* Clinical sensitivity of p53 mutation detection in matched bladder tumor, bladder wash, and voided urine specimens. *Cancer* 2001 Jun 1; 91(11):2127-35.
- [89] van Rhijn BW, Lurkin I, Chopin D *et al.* Combined microsatellite and *FGFR3* mutation analysis enables a highly sensitive detection of urothelial cell carcinoma in voided urine. *Clin Cancer Res* 2003; 9:257-263
- [90] T Zuiverloon, M van der Aa, Theo van der Kwast *et al.* *FGFR3* mutation analysis on voided urine for surveillance of patients with low grade non-muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16:3011-3018

Résumé

Le risque de récurrence tumorale et d'infiltration musculaire des tumeurs de vessie n'infiltrant pas le muscle (TVNIM) impose une surveillance par cytologies urinaires, avec une spécificité élevée mais une faible sensibilité pour la détection des tumeurs de bas grade, et par cystoscopie. Deux voies majeures existent dans la cancérogénèse vésicale : l'une caractérisée par l'altération du gène suppresseur de tumeur *p53* et l'autre impliquant les mutations du gène *FGFR3*.

Notre objectif était l'étude de ces mutations en fonction du stade tumoral et du grade cellulaire dans les tumeurs vésicales et les urines recueillies lors de la résection trans-urétrale de vessie (RTUV).

Les mutations de *p53* ont été recherchées par le FASAY, permettant une analyse fonctionnelle de la protéine P53. Les mutations de *FGFR3* ont été recherchées par le SNaPShot, détectant les 8 mutations ponctuelles les plus fréquentes de ce gène.

Le taux de tumeurs mutées pour *p53* augmentait avec le caractère péjoratif du stade tumoral ($p=0.06$) et du grade cellulaire ($p=0.002$), contrairement au taux de tumeurs mutées pour *FGFR3* ($p<0.001$). Au total, 67 couples tumeur/ culot urinaire ont été analysés. Une mutation pour *FGFR3* et/ou *p53* existait dans 46 tumeurs (68,6%). La sensibilité de détection d'une de ces mutations dans les urines lorsqu'elle existait dans la tumeur était de 47,8%, la spécificité était de 76,2%, la valeur prédictive positive était de 81,5% et la valeur prédictive négative était de 40%.

Cette étude a confirmé l'importance des gènes *p53* et *FGFR3* dans la cancérogénèse vésicale. Si la sensibilité de notre test urinaire ne permettait pas de remplacer le couple cytologies urinaires/fibroscopie vésicale, il pouvait se positionner comme un complément dans la détection des tumeurs de vessie. L'impact des mutations de ces gènes dans le pronostic des TVNIM reste à évaluer.

Mots clés : Tumeur vésicale, Culot urinaire, FGFR3, p53, FASAY, SNaPShot