



ROYAUME DU MAROC
Université Mohammed V - Rabat
Faculté de Médecine et de Pharmacie
RABAT



Année 2022

N° : MM272022

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE « BIOTECHNOLOGIE MEDICALE »

OPTION : « BIOMEDICALE »

Intitulé

Evaluation du statut mutationnel du promoteur du gène VEGF dans une cohorte de cancer de la vessie au Maroc.

Soutenu le 22 Juillet 2022, par :

Mlle. ESSAFI SOUHAILA

Devant le jury composé de :

| | | |
|-----------------------------|---|--------------------------|
| Pr. Tarik AANNIZ | Professeur à Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat | Président de Jury |
| Dr. Mohammed ATTALEB | Chef de l'UBRM – CNESTEN – Rabat | Encadrant |
| Pr. Mounia BENSaid | Ecole Royale de Service de Santé Militaire à HMIM V | Examinatrice |
| Dr. Ilias HASSAN | Médecin au service d'urologie à HMIM V. Rabat | Examineur |

Avant-propos

Le présent travail est réalisé dans le cadre du Master en Biotechnologie Médicale dans la faculté de médecine et pharmacie à Rabat coordonné par Pr. OUIDGHIRI Mouna.

Il est le fruit d'une collaboration entre l'Unité de Biologie et Recherches Médicales du Centre National de l'Energie, Des Sciences Et Techniques Nucléaires (CNESTEN) et le Laboratoire MedBiotech à la Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat.

Il a été dirigé par Dr. Mohammed ATTALEB et Dr. Mohammed EL MZIBRI au sein de l'UBRM du CNESTEN.

Dédicace

*Je dédie humblement ce manuscrit
A Allah*

*Tout puissant qui m'a inspiré et qui m'a guidé dans le bon chemin
A ma très chère mère*

Des mots ne pourront jamais exprimer la profondeur de mon amour et mon affection

A toi maman, je dédie ce travail, que sans ton soutien, ton amour, n'aurait pu voir le jour.

Veillez trouver, chère mère, dans ce travail, le fruit de ton dévouement et de tes sacrifices ainsi que l'expression de ma gratitude et mon profond amour.

Puisse Dieu te préserver des malheurs de la vie et te procure longue vie.

A mon très cher père

Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et ton perfectionnisme.

Tu m'as appris, le sens du travail, de l'honnêteté et de la responsabilité. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, ma considération et l'amour éternel pour les sacrifices que tu m'as consentis pour mon éducation et mon bien être.

Puisse Dieu te garder et te procurer santé et longue vie.

A mes chères sœurs et à frères

Vous avez toujours été près de moi, vous m'avez offert beaucoup de tendresse durant mon parcours, surtout avec votre phrase célèbre « nous sommes un ». Merci, d'avoir montré tant de complaisance et de serviabilité à mon égard.

Puissions-nous rester unis dans la tendresse et fidèle à l'éducation que nous avons reçue. Je vous souhaite du bonheur et du succès dans toute votre vie.

A ma chère famille et A toutes mes amies

Votre soutien, votre amour et vos encouragements ont été pour moi d'un grand réconfort.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord adresser toute ma gratitude au corps pédagogique du Laboratoire MedBiotech.

J'adresse mes chaleureux remerciements au coordonnatrice du master Madame *OUADGHIRI Mouna*.

Je tiens à remercier le directeur Monsieur *Azeddine IBRAHIMI*, professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie Rabat, je lui exprime ma profonde gratitude.

Je remercie Pr. *Tariq AANNIZ* professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie Rabat (FMPR) d'accepter d'être le membre de jury

Ma profonde gratitude et inestimable respect à mon encadrant et chef de l'Unité de Biologie et Recherches Médicales au CNESTEN, *Dr. Mohammed ATTALIB* pour m'avoir confié ce travail et *Docteur Mounia BENSALD* professeur à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V à Rabat et *Docteur ILIAS Hassan* médecin au sein de service d'urologie à l'hôpital Militaire d'instruction Mohammed V d'avoir accepté d'examiner ce travail,

Je tiens à remercier très chaleureusement *Dr. Mohammed EL MZIBRI*, chef de la division des Sciences du vivant au Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires (CNESTEN). Il m'a honoré de sa confiance en m'acceptant et en me formant au sein de son équipe. Son écoute attentive et ininterrompue, sa gentillesse, ainsi que ses précieux conseils. Je lui adresse mes plus sincères remerciements.

Je transmets mes vifs témoignages de reconnaissance à la Doctorante *Mlle. EL AZZOUZI Meryem*, pour sa sympathie, sa disponibilité, ainsi que pour son aide précieuse durant toute la période de mon stage. Ses judicieux conseils ont contribué à alimenter ma réflexion lors de la réalisation de ce travail.

Je tiens également à mentionner tout le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de l'Unité de Biologie et de Recherches Médicales du CNESTEN, je remercie toute l'équipe pour leur sympathie et leurs conseils, particulièrement Monsieur Hassane JADDI et mes collègues : Lina, Ahlam, Yoness, ainsi que tous les doctorants (tes) : *Younes, Kawtar, Chaimae, Hajar, Rajae* leurs aides précieuses.

Liste des figures :

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Anatomie de la vessie | 2 |
| Figure 2 : Coupe histologique de la paroi urétérale normale | 3 |
| Figure 3: Classification TNM 2017 et sous-classification histopathologie..... | 6 |
| Figure 4: Distribution de taux d'incidence et de mortalité estimés normalisés selon l'âge en 2020, cancer de la vessie, tous sexes, tous âges. | 7 |
| Figure 5: La distribution des taux d'incidence et de mortalité du cancer de la vessie au Maroc | 8 |
| Figure 6: Distribution (%) des cancers selon la localisation et le sexe, Rabat-Maroc 2009 - 2012 | 8 |
| Figure 7: Cystoscopie vésicale dans le cas normal et dans le cas d'une tumeur urothéliale de haut grade | 11 |
| Figure 8: Voies de Carcinogénèse des tumeurs vésicales | 15 |
| Figure 9: La classification moléculaire du cancer de la vessie..... | 18 |
| Figure 10: Comparaison entre les quatre isoformes de VEGF..... | 23 |
| Figure 11: Représentation schématique des ligands de la famille VEGF et de leurs récepteurs..... | 24 |
| Figure 12: Voie de signalisation de récepteurs VEGFR1. | 25 |
| Figure 13: Voie de signalisation de récepteurs VEGFR2 | 26 |
| Figure 14: Voie de signalisation de récepteurs VEGFR3 | 27 |
| Figure 15: la position chromosomique du VEGF et les emplacements des polymorphismes analysés | 28 |
| Figure 16: Altérations de VEGF et progression tumorale dans les cancers de la vessie..... | 29 |
| Figure 17: Distribution des patients selon le grade tumoral..... | 39 |
| Figure 18: Distribution des patients selon le stade tumoral..... | 39 |
| Figure 19: Résultats du suivi des patients pour la progression..... | 40 |
| Figure 20: Résultats du suivi des patients pour la récurrence. | 40 |
| Figure 21: Exemple d'un résultat de dosage d'ADNg dans un échantillon. | 41 |
| Figure 22: Exemple de Résultat d'électrophorèse pour amplification du gène GAPDH (CN : contrôle négatif, MT : marqueur de taille 100 pb). | 41 |
| Figure 23: Exemple de Résultat d'électrophorèse pour amplification du gène VEGF (CN : contrôle négatif, MT : marqueur de taille 100 pb). | 42 |
| Figure 24: Exemple d'un électrophorégramme du VEGF du patient 9..... | 42 |
| Figure 25 : exemple d'un électrophorégramme obtenu par séquençage de la région promotrice du gène VEGF du patient 35(A)et 34(B) , montrant le polymorphisme hétérozygote..... | 43 |
| Figure 26: résultat du BLAST de la séquence d'échantillon 34, montrant le polymorphisme homozygote (C en T) sur la région promotrice du gène VEGF | 43 |
| Figure 27: exemple d'un électrophorégramme obtenu par séquençage de la région promotrice du gène VEGF du patient 1(A) et patients 50(B)..... | 44 |

Liste des tableaux :

| | |
|---|----|
| Tableau I: Système de classification TNM proposé par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) en 2017 pour les cancers de la vessie..... | 4 |
| Tableau II: Distribution de taux d'incidence, mortalité et de prévalence du cancer de la vessie dans le Maroc | 7 |
| Tableau III: Incidences du cancer de la vessie pour la période 2013-2017 RCGC..... | 9 |
| Tableau IV: Catégories de risque pour les tumeurs de vessie non-invasives..... | 12 |
| Tableau V: Les gènes les plus fréquemment altérés dans le cancer de la vessie..... | 17 |
| Tableau VI: Les caractéristiques des amorces du gène <i>GAPDH</i> | 32 |
| Tableau VII: Les volumes et les concentrations de chaque composant de la PCR .. Erreur ! Signet non défini. | |
| Tableau VIII: le programme du thermocycleur pour l'amplification du gène <i>GAPDH</i> | 33 |
| Tableau IX: Les séquences nucléotidiques des amorces de <i>VEGF</i> et les tailles des amplicons..... | 34 |
| Tableau X : Le programme du thermocycleur avec les différentes températures..... | 34 |
| Tableau XI: Les réactifs utilisés dans la réaction de séquence..... | 35 |
| Tableau XII: Le programme du thermocycleur adopté lors de la réaction de séquences..... | 36 |
| Tableau XIII: Distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme <i>VEGF</i> -460C/ T , -2578A/C et -2549 I/D dans la population étudiée..... | 45 |
| Tableau XIV: Association entre le polymorphisme -460C/T et les données des patients..... | 46 |
| Tableau XV: Tableau d'association entre le polymorphisme -2578C/A et les données des patients.. | 47 |
| Tableau XVI : Association entre le polymorphisme <i>VEGF</i> -2549 I/D et les données démographiques et anatomopathologique | 47 |
| Tableau XVII: Corrélation du polymorphisme -460 C /T avec la récurrence et la progression..... | 48 |
| Tableau XVIII: Corrélation du polymorphisme -2578C/A avec la récurrence et la progression..... | 48 |
| Tableau XIX: Corrélation du polymorphisme -2549 I/D avec la récurrence et la progression | 48 |

Liste des abréviations :

AA : Amines aromatiques
AJCC : American Joint Committee on Cancer
BCG : Bacille Calmette-Guérin
BET : Bromure Ethidium
BG : Bas grade
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
CaU : Carcinome Urothéliale
CE : Cellule endothélium
CG : Cisplatine et Gemcitabine
CIRC : Agent international de recherche sur le cancer, : Centre International de Recherche sur le Cancer
CIS : Carcinome in situ
CN : Contrôle négatif, : contrôle négatif, : Contrôle négatif
CNESTEN : Centre National de l'Energie, Des Sciences Et Techniques Nucléaires
CV : Cancer de la Vessie
ddNTP : didésoxynucléotides triphosphates
DO : Densité optique
ECM : matrice extracellulaire
FAK : Kinase d'adhérence focale
GAPDH : D-glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques, : hydrocarbures aromatiques polycycliques
HG : Haut grade
HMIMV : l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V
LOH : Perte de l'hétérozygotie
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MMC : Mitomycine C, : Mitomycine C
MT : Marqueur de taille

MVAC Méthotrexate, Vinblastine, Doxorubicine, Cisplatine
NAC : néoadjuvante
NAT2 : N-acétyltransférase 2
NRP : Neuropilin
OMS : l'Organisation Mondiale de la Santé
PIGF : Placental Growth actor
PLC : Phospholipase C
PLC-g : Phospholipase C gamma-protéine
PPARG : peroxisome proliferator-activated receptor peroxisome proliferator-activated receptor
RCGC : Registre de la région de Grand Casablanca
RTK : Récepteur tyrosine kinase
SAP : phosphatase alcaline
SCC : Squamous Cell Carcinoma-like
SH : Schistosoma haematobium
SHB : protéine adaptatrice B
TBE : Tris-Borate-EDTA
TCGA : The cancer genome Atlas
TNM : T=Tumor, N=Nodes, M=Metastasis
TP53 : Tumor protein 53
TSV : Tumeurs Superficielles de la Vessie
TVIM : Tumeurs de vessie infiltrantes du muscle (
TVNIM : Tumeurs de vessie non infiltrantes du muscle
UBRM : Unité de Biologie et Recherche Médicale
UNC : University of North Carolina
UPK : uroplakines
VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VPF : facteur de perméabilité vasculaire

Résumé :

Titre : Evaluation de statut mutationnel du promoteur du gène VEGF dans une cohorte de cancer de la vessie au Maroc

Auteur : ESSAFI Souhaila

Mots clés : Cancer de la vessie - Gène *VEGF* –Angiogenèse –Polymorphisme – Séquençage de Sanger

Au Maroc, le cancer de la vessie (CV) représente un problème majeur de santé publique compte tenu de sa lourde prise en charge et son prévalence et incidence qui sont toujours en augmentation. D'autant plus, ce type de cancer nécessite une surveillance et un suivi thérapeutique réguliers, dû au risque élevé de récurrence et de progression vers des stades avancés. Les progrès réalisés dans le discernement des mécanismes moléculaires de la cancérogenèse vésicale ont permis l'identification de nombreuses altérations génétiques et plus particulièrement des mutations activatrices qui peuvent être utilisées comme des biomarqueurs de diagnostic et de cibles thérapeutiques. Parmi ces variations, les polymorphismes localisés au niveau du promoteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*VEGF*) sont fortement associés à la récurrence et la progression métastatique dans différents types de cancer. Notre étude vise à évaluer le statut mutationnel du promoteur du gène *VEGF* dans une cohorte de 70 patients atteints du CV hospitalisés au Service d'urologie de l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V (HMIMV) à Rabat. Ceci est réalisé par la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) et le séquençage. Nos résultats reflètent la présence des polymorphismes (-460 C/T, -2578 C/A et -2549 I/D) au niveau de la région promotrice du gène *VEGF* avec de différentes fréquences : 48% (34/70) ; 70% (49/70) ; et 67.1% (47/70) respectivement. L'analyse statistique a révélé une corrélation significative entre le polymorphisme -460 C/T et le tabagisme ($p \text{ value} = 0.02 < 0.05$). Cependant, aucune corrélation significative n'a été détectée entre les polymorphismes -2578 C/A et -2549 I/D et les données clinico-pathologiques des patients. Nous suggérons que les polymorphismes identifiés dans notre cohorte (-460 C/T, -2578 C/A et -2549 I/D) du promoteur du gène *VEGF* sont impliqués dans le CV, et peuvent être une cible thérapeutique prometteuse contre le développement du CV.

Mots clés : Cancer de la vessie - Gène *VEGF* –Angiogenèse –Polymorphisme – Séquençage de Sanger

Abstract:

Title: Evaluation of the mutational status of the promoter of the VEGF gene in a cohort of bladder cancer in Morocco

Author: ESSAFI Souhaila

Keywords: Bladder cancer - VEGF gene - Angiogenesis - Polymorphism - Sanger sequencing

In Morocco, bladder cancer (BC) is a major public health problem due to its heavy management and its increasing prevalence and incidence. Even more, this type of cancer requires regular monitoring and therapeutic follow-up, due to the high risk of recurrence and progression to advanced stages. The progress that was made in discerning of molecular mechanisms of vesical carcinogenesis has led to the identification of numerous genetic alterations and more particularly activating mutations which can be used as diagnostic and therapeutic targets. Among these variations, vascular endothelium growth factor (VEGF) polymorphisms at the vascular endothelium growth factor promoter level are strongly associated with recurrence and metastatic progression in different types of cancer. Our study aims to assess the mutational status of the VEGF gene promoter in a cohort of 70 BC patients hospitalized at the Urology Department of the Mohammed V Military Training Hospital (HMIMV) in Rabat. This is achieved by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. Our results reflect the presence of polymorphisms (-460 C/T, -2578 C/A and -2549 I/D) at the VEGF promoter region with different frequencies: 48% (34/70) ; 70% (49/70) ; et 67.1% (47/70) respectively. Statistical analysis revealed a significant correlation between polymorphism -460 C/T and smoking (p value=0.02<0.05). However, no significant correlation was detected between the -2578 C/A and -2549 I/D polymorphisms and the patients' clinical-pathological data. We suggest that the polymorphisms identified in our cohort (-460 C/T, -2578 C/A and -2549 I/D) of the VEGF gene promoter are involved in the BC, and may be a promising therapeutic target against the development of the BC.

Keywords: Bladder cancer - VEGF gene - Angiogenesis - Polymorphism – Sanger Sequencing

الملخص:

العنوان: تقييم الحالة الطفرية لمحفز جين VEGF في مجموعة من سرطان المثانة في المغرب

المؤلف: سهيلة الصافي

الكلمات المفتاحية: سرطان المثانة - جين - VEGF تولد الأوعية - تعدد الأشكال - تسلسل سانجر

في المغرب، يعتبر سرطان المثانة مشكلة صحية عامة كبيرة بسبب انتشاره المتزايد وكلفته الباهظة. علاوة على ذلك، يتطلب هذا النوع من السرطان مراقبة منتظمة ومتابعة علاجية، نظراً لارتفاع مخاطر التكرار وبلوغه إلى مراحل متقدمة. أدى التقدم المحرز في التعرف على الآليات الجزيئية للسرطان الحويصلي إلى تحديد العديد من التعديلات الجينية وتفعيل الطفرات بشكل خاص والتي يمكن استخدامها كأهداف تشخيصية وعلاجية. من بين هذه الاختلافات، ترتبط الأشكال المتعددة الموضعية على مستوى محفز عامل نمو البطانة الوعائية (VEGF) ارتباطاً وثيقاً بالتكرار والتطور النقيلي في أنواع مختلفة من السرطان. تهدف دراستنا إلى تقييم الحالة الطفرية لمحفز الجينات VEGF في مجموعة مكونة من 70 مريضاً من قسم المسالك البولية في مستشفى التدريب العسكري محمد الخامس في الرباط. يتم تحقيق ذلك عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وتسلسل. تعكس نتائجنا وجود تعدد الأشكال T / C -460 ، A / C -2578 و VEGF 2549I/D-بترددات مختلفة

(48% 34/70), (70% (49/70), 67.1% (47/70) على التوالي. أظهر التحليل الإحصائي وجود علاقة بين تعدد الأشكال T / C 460- والتدخين ($p = 0.02 < 0.05$) ومع ذلك، لم يتم الكشف عن ارتباط كبير بين تعدد الأشكال -2578 C / A و -2549- I / D والبيانات السريرية المرضية للمرضى. نقترح أن الأشكال المتعددة التي تم تحديدها في مجموعتنا C -2578- A / و VEGF 61 I/D-2549-؛ لمحفز الجينات VEGF متضمنة في سرطان المثانة ، وقد تكون هدفاً علاجياً واعدًا ضد تطور سرطان المثانة).

الكلمات المفتاحية: سرطان المثانة - جين VEGF- تولد الأوعية - تعدد الأشكال - التسلسل سانجر

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Introduction | 1 |
| Partie 1 : Le cancer de la vessie | 2 |
| I. Rappel anatomique de la vessie..... | 2 |
| II. Classification histopathologique des tumeurs de vessie | 3 |
| II.1. Classification TNM | 4 |
| II.2. Grade tumorale | 5 |
| II.3. Classification clinique | 5 |
| II.4. Classification histologique..... | 6 |
| III. Epidémiologie | 6 |
| 1. Cancer de la vessie au monde | 6 |
| 2. Cancer de la vessie au Maroc | 7 |
| IV. Facteurs de risques du cancer de la vessie | 9 |
| 1. Tabagisme..... | 9 |
| 2. Expositions professionnelles | 9 |
| 3. L'infection | 10 |
| 4. Facteurs héréditaires et génétiques :..... | 10 |
| V. Symptômes et diagnostic du cancer de la vessie | 10 |
| 1. Symptômes du cancer de la vessie..... | 10 |
| 2. Diagnostic du cancer de la vessie | 11 |
| VI. Traitements du cancer de la vessie..... | 12 |
| 1. Stratification du risque | 12 |
| 2. Traitement des tumeurs urothéliales superficielles..... | 12 |
| 3. Traitement des tumeurs urothéliales infiltrantes | 13 |
| VII. Génétique du cancer de la vessie | 14 |
| 1. Altérations génétiques | 15 |
| 1.1. Altérations génétiques dans le cancer de la vessie non-infiltrant le muscle | 16 |
| 1.2. Altérations génétiques dans le cancer de la vessie infiltrant le muscle..... | 16 |
| VIII. Classification moléculaire du cancer de la vessie : | 18 |
| Partie 2 : Facteur de croissance endothéliaux vasculaires..... | 22 |
| I. <i>VEGF</i> et ses récepteurs Système <i>VEGF/VEGFR</i> | 22 |
| 1. caractéristiques structurales et biologiques | 22 |
| 1.1. Gène <i>VEGFA</i> | 22 |
| 2. Le <i>VEGFR</i> : caractéristiques structurales et biologiques | 23 |
| 2.1. Structure et activation..... | 23 |
| II. Rôle du <i>VEGF</i> et de ses récepteurs dans l'angiogenèse physiologique | 27 |

| | |
|---|----|
| III. <i>VEGF</i> dans le cancer de la vessie..... | 28 |
| A. Matériel : | 31 |
| I. Phase pré-analytique : | 31 |
| II. Phase analytique : | 31 |
| B. Résultats et Discussion | 39 |
| I. Résultats | 39 |
| 1. Résultats anatomopathologiques. | 39 |
| 2. Résultats du suivie des patients | 40 |
| 3. Dosage d'ADN extrait | 40 |
| 4. Résultats du test de qualité d'ADN par amplification du gène <i>GAPDH</i> | 41 |
| 5. Résultats de l'étude des mutations du gène <i>VEGF</i> (-460 C/T, -2578 C/A) | 42 |
| 6. Résultats d'analyse des séquences du gène <i>VEGF</i> : | 45 |
| 7. Association entre le statut mutationnel du promoteur du gène <i>VEGF</i> et les données cliniques des patients : | 45 |
| II. Discussion | 49 |
| Conclusion et perspectives | 52 |
| Références | 53 |
| Annexes : | 57 |

Introduction

Le Cancer de la Vessie (CV) est le 4^{ème} cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez l'homme et le 10^{ème} cancer le plus répandu dans le monde[1]. Il s'agit d'un cancer qui est dominant chez le sexe masculin, due essentiellement au tabagisme et à l'exposition professionnelle à des agents carcinogènes. Au Maroc, selon les deux registres régionaux de rabat et de Casablanca, le cancer est le 10^{ème} avec une incidence de 4.8 et 3.7 respectivement[2] [3]. Le CV présente une hétérogénéité biologique importante qui permet de le classer en : Tumeurs vésicales infiltrant le muscle (TVIM) et non infiltrant le muscle (TVNIM) qui représente environ 70 à 75 % des tumeurs de vessie nouvellement diagnostiquées avec un risque élevé de récurrence (70 à 85%) et un risque moins élevé de progression (10 à 30%) vers des TVIMs [4]. Actuellement, le diagnostic du cancer de la vessie repose principalement sur la cystoscopie et la cytologie urinaire. La cystoscopie permet d'identifier la plupart des lésions et fournit des informations pronostiques essentielles, mais il s'agit d'une procédure invasive qui ne permet pas de prédire précisément l'issue du patient. La cytologie urinaire est la méthode non invasive standard pour la détection du CV et le suivi de la maladie. Cependant, cette méthode permet de repérer les tumeurs de haut grade, mais elle présente une faible sensibilité (35 %) à la détection de tumeurs de bas grade[5]. Durant cette dernière décennie, les progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la cancérogenèse et la progression tumorale du CV ont permis de mieux comprendre cette dichotomie histologique et fournissent un cadre de réflexion et d'évaluation pour les nouveaux traitements dans le contexte de la thérapie ciblée et la médecine personnalisée. C'est dans cet esprit de classification moléculaire que s'installe l'objectif général de ce projet qui vise à caractériser les anomalies moléculaires critiques impliqués dans le CV au niveau des échantillons (biopsies, urines, sang) prélevés chez des patients atteints du CV, afin d'identifier des biomarqueurs moléculaires qui peuvent servir comme des alternatives de diagnostic, de pronostic et/ou de traitement de ce type de cancer. L'objectif spécifique de cette étude est d'évaluer le statut mutationnel de la région promotrice du gène VEGF dans une cohorte de 70 patients Marocain atteints de CV et d'étudier l'association entre les différentes altérations génétiques détectées du gène VEGF et les données clinico- pathologiques des patients.

Chapitre 1 : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : Le cancer de la vessie

I. Rappel anatomique de la vessie

La vessie est un organe musculaire creux et très extensible qui fait partie de l'appareil urinaire, il sert de réservoir temporaire de l'urine qui provient des reins à travers l'uretère connecté à son côté antérieur avant que la miction ait lieu. Cet organe est situé directement dans la loge antérieure de la cavité pelvienne derrière la symphyse pubienne au niveau du bassin (figure 1). L'urine se récolte vers la vessie via deux uretères connectés à son côté antérieur. Elle permet d'accumuler en moyenne 500 ml d'urine.

Chez les deux sexes, la morphologie et la topographie de la vessie se diffèrent. Chez l'homme, la vessie se situe au-delà du plancher pelvien et de la prostate, derrière laquelle se trouvent le rectum, les canaux séminaux, et les vésicules séminales. Tandis que chez la femme, la vessie se situe directement devant l'utérus, la partie supérieure du vagin et le rectum[6].

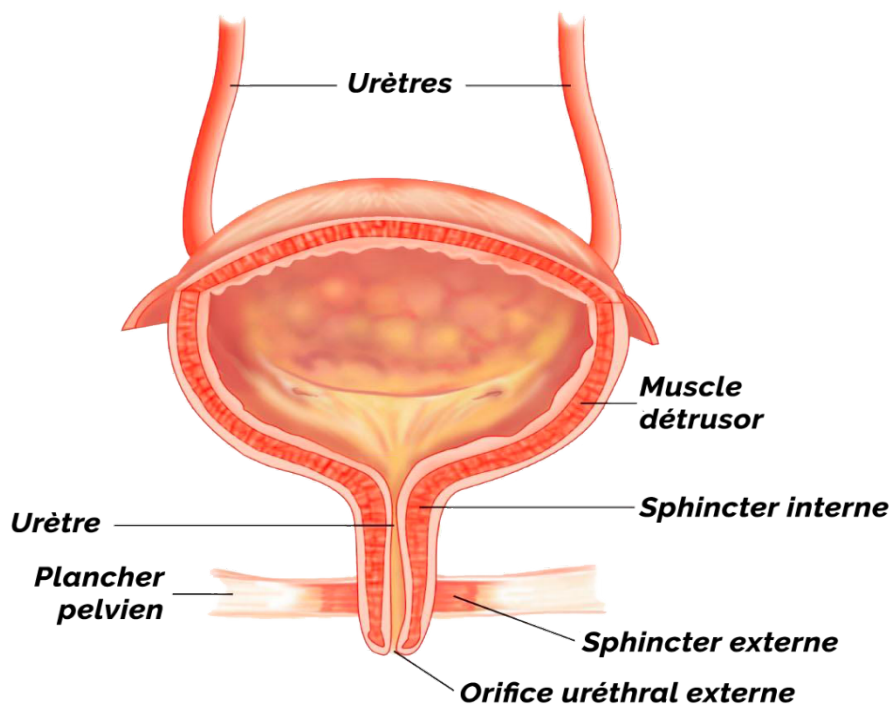


Figure 1 : Anatomie de la vessie [7].

La vessie se constitue de quatre couches différentes de la paroi vésicale, de l'intérieur de la vessie vers l'extérieur est décrite comme suit (figure2) :

- **Couche épithéliale** est un tissu qui tapisse la paroi vésicale appelée l'urothélium et qui est au contact avec les urines. Cette dernière constituée de trois couches (couche apicale, intermédiaire et basale).
- **Lamina propria** appelée aussi choriion : c'est une couche qui sépare l'urothélium du muscle détrusor et contient des vaisseaux sanguins, des nerfs et des glandes.
- **La couche musculieuse** est une couche de muscle, appelée aussi détrusor, qui permet à la vessie de se contracter et d'expulser de l'urine.
- **Adventice** est une couche la plus externe de la vessie qui est composée du tissu conjonctif lâche [8] .

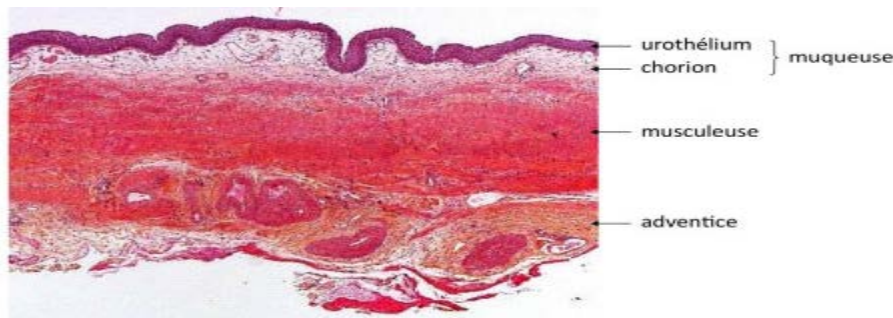


Figure 2 :Coupe histologique de la paroi urétérale normale [9].

II. Classification histopathologique des tumeurs de vessie

La prise en charge thérapeutique du CV est basée principalement sur la classification des tumeurs vésicales. La classification des tumeurs de vessie est fondée sur trois critères principaux ; la classification histopathologique qui permet de préciser le type histologique de la tumeur en déterminant la malignité ainsi que l'évolution, le stade ou le degré d'invasion du cancer dans la paroi vésicale qui permet de prévoir le risque et de déterminer la stratégie de traitement, ceci se fait selon la classification TNM(T=Tumor, N=Nodes, M=Metastasis) [10] et le grade qui reflète le degré de différenciation cellulaire, y compris les tumeurs de bas grade sont les tumeurs bien différenciées et donc présent un bon pronostic et les tumeurs de haut grade sont les tumeurs moins différenciées et donc présent un mauvais pronostic.

II.1. Classification TNM

Les tumeurs de la vessie sont classées selon la classification TNM qui est proposée par l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) en 2017 ([5],[11]). Le principe de la classification TNM repose sur trois critères :

- **Tumeur** : suivie d'un chiffre de 0 à 4, correspond au niveau de la présence de la lésion dans la paroi vésicale de la vessie.
- **Ganglion ou Node** : suivie d'un chiffre de 0 à 3, indique si le cancer a atteint les ganglions lymphatiques et détermine l'existence de métastases ganglionnaires.
- **Métastases** : suivie d'un 0 ou d'un 1, indique la présence ou l'absence de métastases à distance qui sont loin de la vessie[12], l'étude de ces critères permettra de classer le cancer dans l'un des stades présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau I) :

Tableau I: Système de classification TNM proposé par l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) en 2017 pour les cancers de la vessie [7].

| Stade T | Description | Dénomination |
|---------|---|--------------|
| pTa | Tumeur papillaire de grade variable sans infiltration de la lamina propria | TVNIM |
| pTis | Tumeur plane de haut grade sans infiltration - carcinome in situ | |
| pT1 | Tumeur papillaire de grade variable avec infiltration de la lamina propria mais sans infiltration du muscle | |
| pT2 | Tumeur envahissant la musculature | |
| pT2a | Tumeur envahissant la musculature superficielle (moitié interne) | TVIM |
| pT2b | Tumeur envahissant la musculature profonde (moitié externe) | |
| pT3 | Tumeur envahissant le tissu péri-vésical | |
| pT3a | Atteinte microscopique | |
| pT3b | Atteinte macroscopique (masse extra-vésicale) | |
| pT4 | Tumeur envahissant l'une ou l'autre des structures suivantes: prostate, vésicules séminales, utérus, vagin, paroi pelvienne ou paroi abdominale | |
| T4a | Prostate, vésicules séminales, vagin ou utérus | |
| T4b | Paroi pelvienne ou paroi abdominale | |
| N | ganglions lymphatiques régionaux | |
| Nx | renseignements insuffisants pour classer l'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux | |
| N0 | pas d'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux | |
| N1 | atteinte d'un seul ganglion lymphatique pelvien (hypogastrique, obturateur, iliaque externe ou pré-sacré) ; | |
| N2 | atteinte de multiples ganglions lymphatiques pelviens (hypogastrique, obturateur, iliaque externe ou pré-sacré) | |
| N3 | atteinte d'un (ou plusieurs) ganglion(s) lymphatique(s) iliaque(s) primitif(s). | |
| M | métastases à distance | |
| M0 | absence de métastase à distance | |
| M1 | métastase(s) à distance | |

II.2. Grade tumorale

Il existe un autre système de classification de cancer de la vessie qui permet de déterminer l'agressivité de la tumeur vésicale et évaluer la malignité d'une tumeur. Il s'agit du grade tumoral qui permet de distinguer le degré de la différenciation cellulaire en gardant le niveau d'anomalies architecturales et les caractéristiques des cellules tumorales par rapport aux cellules normales, permettant ainsi une distinction entre les tumeurs bien différenciées qui caractérisent les tumeurs de bas grade et peu différenciées qui caractérisent les lésions de haut grade.

En 2016, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a mis une nouvelle version de la classification des tumeurs de la vessie en divisant le Carcinome Urotheliale (CaU) en deux groupes :les CaU non infiltrants et les CaU infiltrants avec des caractéristiques cliniques différentes. Cette dernière permet de réaliser un pronostic adéquat pour l'orientation de la charge thérapeutique ([13] ,[14]). Dans cette classification l'OMS a mis en place trois niveaux de grade différents, indiquant ainsi :

- Les néoplasies de bas potentiel de malignité
- Les tumeurs vésicales de bas grade
- Les tumeurs vésicales de haut grade [5]

II.3. Classification clinique

Le cancer de la vessie est une maladie hétérogène, classé cliniquement en deux groupes : Tumeurs de vessie non infiltrantes du muscle (TVNIM) qui regroupent les stades pTis, pTa et pT1 et les Tumeurs de vessie infiltrantes du muscle (TVIM) qui regroupent les stades pT2, PT3 et PT4 (figure3) [15].

La fréquence et les taux de survie du CV dépendent du stade tumoral qui est un facteur pronostic essentiel: les TVNIM représentent d'environ 70% à 80% des cancers de la vessie avec une survie de 95 % à 5 ans[16],[17] , tandis que les TVIM représentent 20% à 30% des tumeurs vésicales avec une survie de 50% à 5 ans [4].

Les TVNIM ont un potentiel risque de récurrence et de progression métastatiques avec des fréquences de 70% et 25% respectivement. La progression tumorale peut évoluer vers des métastases représentant ainsi le principal risque des TVIM [18], [10] .

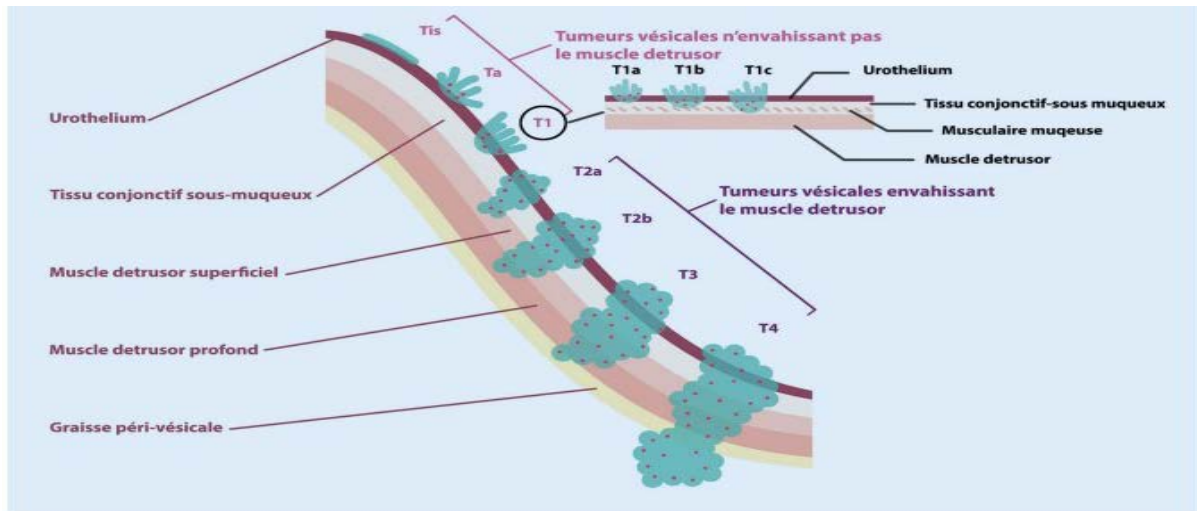


Figure 3: Classification TNM 2017 et sous-classification histopathologie [16].

II.4. Classification histologique

D'un point de vue histologique, le cancer de la vessie est caractérisé par une large variété de formes histopathologiques qui est généralement subdivisée en deux catégories :

- ✚ Les tumeurs d'origine épithéliale : représentent 97% des tumeurs vésicales qui regroupent le carcinome urothélial transitionnel ; considéré comme le type histologique le plus fréquent (90%) dans les cancers de la Vessie, le carcinome épidermoïde (environ 5%) qui désigne le carcinome à cellule squameuse et l'adénocarcinome (moins de 2%) [19].
- ✚ Les tumeurs non épithéliales : sont des tumeurs rares qui peuvent être bénignes ou malignes et qui représentent moins de 5% [20].

III. Epidémiologie

1. Cancer de la vessie au monde

Selon les dernières données publiées par GLOBOCAN en 2020, le cancer de la vessie est le **10^{ème}** cancer le plus répandu dans le monde, en particulier dans les pays développés avec **573 278 (3%)** personnes ont été diagnostiqués de CV, son incidence continue à augmenter régulièrement dans l'échelle mondiale tandis que la mortalité représente la **13^{ème}** cause la plus fréquente de décès dans le monde dont la totalité des décès est de **212 536 morts (2.1%)**.

Le cancer de la vessie est caractérisé par une prédominance masculine dont le pourcentage est quatre fois plus important chez l'homme que chez la femme, avec une incidence de 9,5/100 000 chez les hommes et de 2,4/100 000 chez les femmes dans le monde (figure 4) [1].

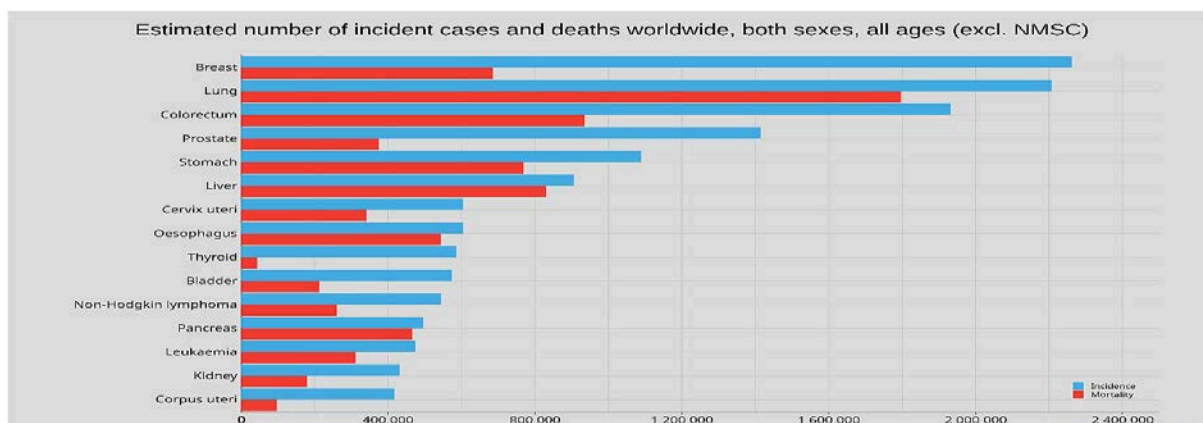


Figure 4: Distribution de taux d'incidence et de mortalité estimés normalisés selon l'âge en 2020, cancer de la vessie, tous sexes, tous âges [21].

2. Cancer de la vessie au Maroc

Selon les dernières données publiées par Globocan ; **2 268 pour 100 000** (3%) des marocains sont diagnostiqués atteints du cancer de la vessie en 2020 en mettant le cancer de la vessie en fonction de l'incidence, mortalité et prévalence au **8^{ème}** rang des cancers les plus couramment diagnostiqués dans le Maroc (Tableau II).

La prévalence à 5 ans du cancer de la vessie en 2020 a atteint **15,11** pour 100 000 de populations marocaines et représente **3,6%** du total des décès (*GLOBOCAN 2020*).

Tableau II: Distribution de taux d'incidence, mortalité et de prévalence du cancer de la vessie dans le Maroc.

| Cancer | NEW CASES | | | | Deaths | | | | 5-year prevalence (all ages) | |
|-------------------------------|-----------|------|------|----------|--------|------|------|----------|------------------------------|---------------------|
| | Number | Rank | (%) | Cum.risk | Number | Rank | (%) | Cum.risk | Number | Prop. (per 100 000) |
| Breast | 11 747 | 1 | 19.8 | 5.84 | 3 695 | 2 | 10.5 | 1.86 | 31 420 | 168.98 |
| Lung | 7 353 | 2 | 12.4 | 2.24 | 6 551 | 1 | 18.6 | 2.01 | 7 717 | 20.91 |
| Prostate | 4 429 | 3 | 7.5 | 2.76 | 1 875 | 4 | 5.3 | 0.53 | 9 135 | 49.87 |
| Non-Hodgkin lymphoma | 2 463 | 4 | 4.1 | 0.65 | 1 448 | 5 | 4.1 | 0.36 | 6 191 | 16.77 |
| Colon | 2 405 | 5 | 4.1 | 0.69 | 1 386 | 6 | 3.9 | 0.37 | 5 220 | 14.14 |
| Thyroid | 2 311 | 6 | 3.9 | 0.58 | 344 | 22 | 0.98 | 0.06 | 6 802 | 18.43 |
| Stomach | 2 294 | 7 | 3.9 | 0.64 | 2 016 | 3 | 5.7 | 0.56 | 3 056 | 8.28 |
| Bladder | 2 268 | 8 | 3.8 | 0.67 | 1 268 | 8 | 3.6 | 0.33 | 5 576 | 15.11 |
| Cervix uteri | 2 165 | 9 | 3.6 | 1.22 | 1 199 | 12 | 3.4 | 0.74 | 5 206 | 28.00 |
| Rectum | 1 919 | 10 | 3.2 | 0.56 | 988 | 13 | 2.8 | 0.26 | 4 541 | 12.30 |
| Leukaemia | 1 607 | 11 | 2.7 | 0.37 | 1 232 | 10 | 3.5 | 0.28 | 4 124 | 11.17 |
| Brain, central nervous system | 1 607 | 12 | 2.7 | 0.42 | 1 347 | 7 | 3.8 | 0.37 | 3 823 | 10.36 |
| Liver | 1 311 | 13 | 2.2 | 0.35 | 1 251 | 9 | 3.5 | 0.34 | 1 471 | 3.99 |
| Pancreas | 1 278 | 14 | 2.2 | 0.37 | 1 220 | 11 | 3.5 | 0.36 | 1 092 | 2.96 |
| Ovary | 1 222 | 15 | 2.1 | 0.68 | 815 | 14 | 2.3 | 0.49 | 2 939 | 15.81 |
| Larynx | 1 213 | 16 | 2.0 | 0.38 | 770 | 15 | 2.2 | 0.24 | 3 011 | 8.16 |
| Nasopharynx | 879 | 17 | 1.5 | 0.24 | 537 | 16 | 1.5 | 0.17 | 2 360 | 6.39 |
| Kidney | 777 | 18 | 1.3 | 0.20 | 430 | 19 | 1.2 | 0.10 | 2 113 | 5.72 |
| Hodgkin lymphoma | 758 | 19 | 1.3 | 0.16 | 252 | 23 | 0.71 | 0.05 | 2 247 | 6.09 |
| Corpus uteri | 732 | 20 | 1.2 | 0.48 | 161 | 24 | 0.46 | 0.11 | 2 104 | 11.32 |
| Lip, oral cavity | 731 | 21 | 1.2 | 0.20 | 391 | 20 | 1.1 | 0.10 | 1 707 | 4.62 |
| Gallbladder | 612 | 22 | 1.0 | 0.17 | 448 | 18 | 1.3 | 0.12 | 730 | 1.98 |
| Oesophagus | 482 | 23 | 0.81 | 0.13 | 457 | 17 | 1.3 | 0.12 | 525 | 1.42 |
| Multiple myeloma | 461 | 24 | 0.78 | 0.13 | 389 | 21 | 1.1 | 0.11 | 1 003 | 2.72 |
| Melanoma of skin | 248 | 25 | 0.42 | 0.07 | 114 | 26 | 0.32 | 0.03 | 634 | 1.72 |
| Vulva | 240 | 26 | 0.40 | 0.12 | 108 | 27 | 0.31 | 0.04 | 612 | 3.29 |
| Anus | 234 | 27 | 0.39 | 0.07 | 125 | 25 | 0.35 | 0.03 | 560 | 1.52 |
| Hypopharynx | 149 | 28 | 0.25 | 0.03 | 90 | 28 | 0.26 | 0.02 | 211 | 0.57 |
| Salivary glands | 143 | 29 | 0.24 | 0.03 | 88 | 29 | 0.25 | 0.01 | 370 | 1.00 |
| Testis | 138 | 30 | 0.23 | 0.06 | 30 | 34 | 0.09 | 0.01 | 458 | 2.50 |
| Oropharynx | 131 | 31 | 0.22 | 0.04 | 75 | 30 | 0.21 | 0.02 | 292 | 0.79 |
| Kaposi sarcoma | 96 | 32 | 0.16 | 0.02 | 51 | 32 | 0.14 | 0.00 | 228 | 0.62 |
| Vagina | 86 | 33 | 0.14 | 0.05 | 39 | 33 | 0.11 | 0.02 | 197 | 1.06 |
| Mesothelioma | 79 | 34 | 0.13 | 0.02 | 73 | 31 | 0.21 | 0.02 | 83 | 0.22 |
| Penis | 12 | 35 | 0.02 | 0.01 | 9 | 35 | 0.03 | 0.00 | 30 | 0.16 |
| All cancer sites | 60 370 | | | 15.30 | 15 265 | | | 0.11 | 137 120 | 244.1 |

Selon les statistiques du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) publié en 2020, le cancer de la vessie est classé en 10ème rang des cancers chez les deux sexes au Maroc (figure 5). Son incidence était de 5.6% et son taux de mortalité était de 3,1% [21].

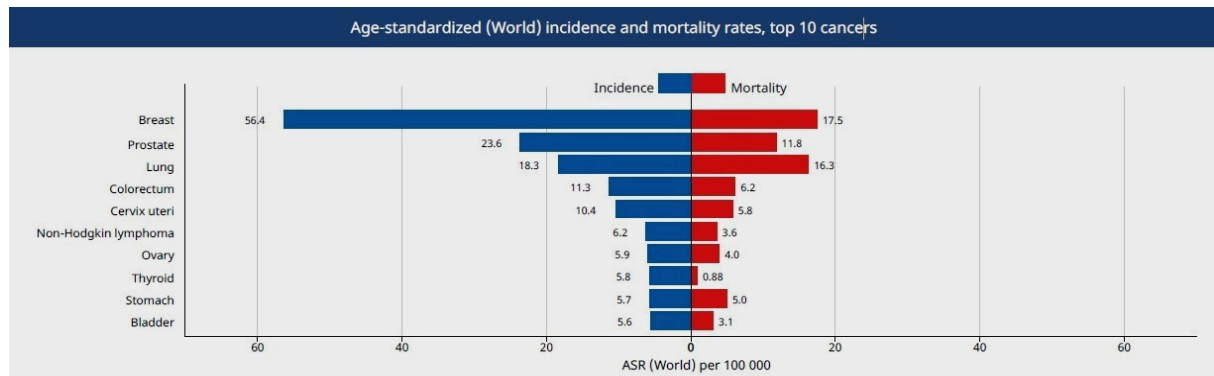


Figure 5: La distribution des taux d'incidence et de mortalité du cancer de la vessie au Maroc.

Au Maroc, il n'y a pas de registre national, mais il existe deux registres régionaux. Il s'agit du registre de Rabat de 2012 présentant les nouveaux cas du cancer à Rabat, durant la période 2009-2012, selon le rapport de ce registre ; le cancer de la vessie est classé le 3ème rang le plus fréquent des cancers diagnostiqués au Maroc chez les hommes en représentant une fréquence d'atteinte de 6,6%, par contre, chez les femmes, il n'a pas été classé parmi les 18 cancers les plus fréquemment diagnostiqués à Rabat (Figure 6) [3].

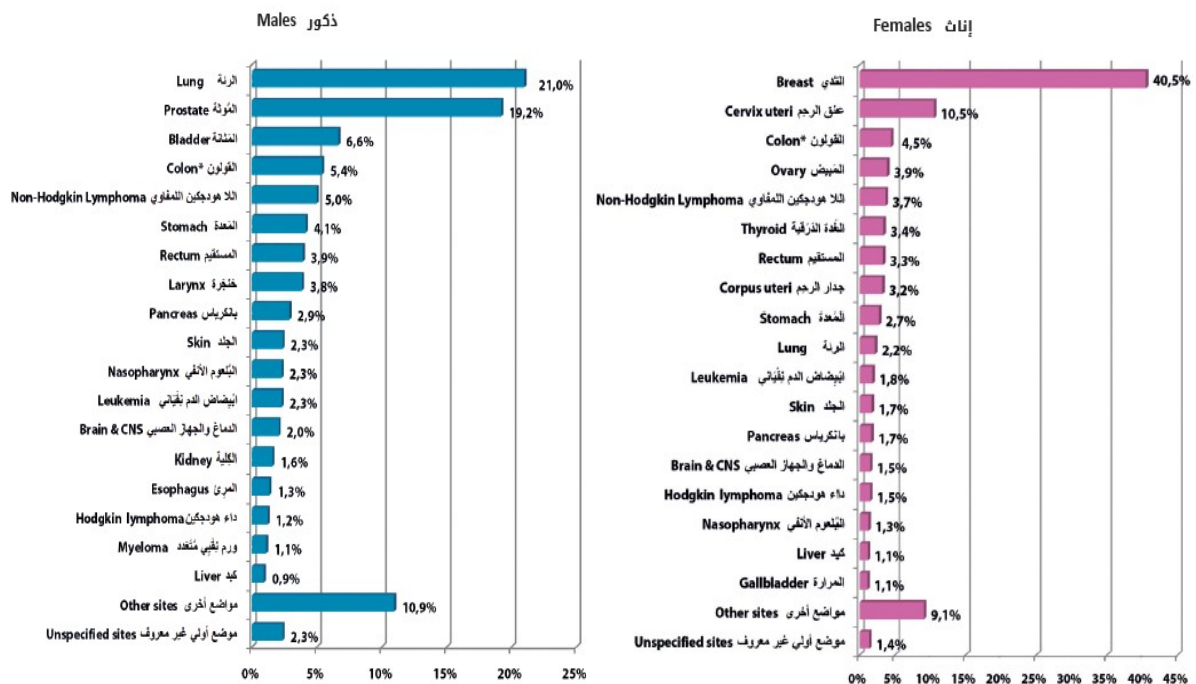


Figure 6: Distribution (%) des cancers selon la localisation et le sexe, Rabat-Maroc 2009 - 2012 (Registre des Cancers de Rabat., 2012) [3].

Le registre de la région de Grand Casablanca (RCGC) couvre des données analysées portant sur une période de cinq années successives (de 2013 à 2017) dont le cancer de la vessie a touché **573** cas (2,6%) pour 100 000 habitants. Les sujets atteints du CV étaient de sexe masculin dans une incidence de **5,4** pour 100 000 hommes comparativement aux femmes avec **0,8** pour 100000 femmes (Tableau III) [2].

Tableau III: Incidences du cancer de la vessie pour la période 2013-2017 RCGC [21] .

| | Hommes | Femmes | Deux sexes |
|--|--------|--------|------------|
| Cas incidents | 573 | 82 | 655 |
| Fréquence (%) | 5,4 | 0,6 | 2,6 |
| Incidence brute /100000 | 5,4 | 0,8 | 3,0 |
| Incidence standardisée sur la population Marocaine /100000 | 4,3 | 0,6 | 2,4 |
| Incidence standardisée sur la population Mondiale /100000 | 5,6 | 0,7 | 3,1 |
| Incidence cumulée 0-64 ans (%) | 0,28 | 0,04 | 0,16 |
| Incidence cumulée 0-74 ans (%) | 0,70 | 0,09 | 0,38 |
| Risque cumulé 0-64 ans (%) | 0,28 | 0,04 | 0,16 |
| Risque cumulé 0-74 ans (%) | 0,70 | 0,09 | 0,38 |

IV. Facteurs de risques du cancer de la vessie

Le développement du cancer de la vessie dépend principalement à des facteurs de risques, qui peuvent être des facteurs génétiques ou environnemental (Tabagisme, Expositions professionnelles, infections...) :

1. Tabagisme

Plusieurs études épidémiologiques ont révélé une association entre la consommation de tabac et le développement des tumeurs de la vessie. Le tabagisme est le facteur le plus répondu dans le cancer de la vessie qui représente chaque année environ 50 à 65 % des nouveaux cas, due à sa composition de tabac qui contient de multiples substances toxiques de type carcinogènes (amines aromatiques(AA), benzopyrène, diméthylbenzanthracène...) [22], ces substances favorisent l'inflammation et leur métabolisme aboutit à des dommages au niveau de l'ADN [23], [24].

2. Expositions professionnelles

De nombreuses professions ont été montrées un lien avec le risque du développement du cancer de la vessie dont certains milieux industriels tels que l'industrie chimique, l'industrie des plastiques, des colorants du caoutchouc et des produits pétroliers qui produisent des agents qui sont fortement carcinogènes tels qu'amines aromatiques (2-naphtylamine, benzidine, amino-4-diphényle) , ainsi que ceux exposés aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)et aux métaux lourds accrus [25].

3. L'infection

L'infection par le parasite *Schistosoma haematobium* (SH) qui vit dans l'eau douce, en particulier dans la vallée du Nil est responsable de la métaplasie épidermoïde de l'urothélium. Les œufs de parasite sécrètent des Ag, des métabolites qui impliquent l'altération des gènes et la production de nombreuses substances cancérigènes (N-nitrosamines et hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)). Le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a considéré que la schistosomiase entraîne le dysfonctionnement de *p53*. Ce qui engendre l'hématurie et l'inflammation de stade chronique [26].

4. Facteurs héréditaires et génétiques :

Des études d'association à l'échelle du génome a découvert la corrélation entre la survenue du cancer de la vessie et les polymorphismes génétiques des gènes de détoxification cancérigène impliquée dans le métabolisme des agents cancérigènes tels que acétylation lente *NAT2* (*N-acétyltransférase 2*) qui fonctionne pour détoxifier les amines aromatiques et entraîne le développement du cancer de la vessie [27], et *GSTM1* considérée une enzyme impliquée dans la détoxification d'autres cancérigènes environnementaux [28].

V. Symptômes et diagnostic du cancer de la vessie

1. Symptômes du cancer de la vessie

a. Hématurie

Le cancer de la vessie dans les premiers stades est asymptomatique, cependant, le principal symptôme couramment observé dans le cancer de la vessie est l'hématurie macroscopique et indolore, souvent terminal et elle peut également être continue ou intermittente, survenant chez 80% des patients présentant une tumeur vésicale, et elle peut notamment être microscopique décelée par un microscope par visualisation de sang au microscope et le comptage des globules rouges dans les urines ou par une bandelette urinaire. L'importance de l'hématurie n'est pas liée à la gravité de la maladie, elle est indépendante du stade et du grade cellulaire [29], [10].

b. Autres signes

D'autres signes cliniques peuvent être mis en considération, notamment des signes d'irritation vésicale détectés dans 20% chez des sujets atteints du cancer de la vessie, qui se manifeste soit par une pollakiurie, des brûlures urinaires, impériosité mictionnelle et la dysurie. Par contre, ces signes sont confirmés en absence d'infection urinaire donc ces signes doivent faire rechercher une tumeur vésicale [29].

2. Diagnostic du cancer de la vessie

2.1. Cytologie urinaire

La cytologie urinaire est l'un des examens non invasifs dans le diagnostic qui permet de suivre des patients atteints de cancer de la vessie en déterminant la présence ou l'absence des cellules malignes de haut grade (84%) et avec une sensibilité de plus de 90 % dans la détection du CIS. En revanche, elle semble avoir une sensibilité faible pour le dépistage des tumeurs de bas grade (16%), une cytologie urinaire positive peut indiquer la présence d'une tumeur n'importe où dans la voie excrétrice urinaire [29], [14].

2.2. Cystoscopie urinaire

La cystoscopie est un examen de référence très efficace pour le diagnostic des tumeurs de la vessie, elle est réalisée par fibroscopie sous anesthésie locale, elle permet d'observer et de préciser les lésions en terme de nombre, de taille, de localisation, et d'aspect de la tumeur, ainsi que des anomalies de la muqueuse (figure 7). Cette endoscopie est indiquée en cas de suspicion de tumeur vésicale, avec échographie négative. Sa sensibilité est alors de 71 % et sa spécificité de 72 % [14].

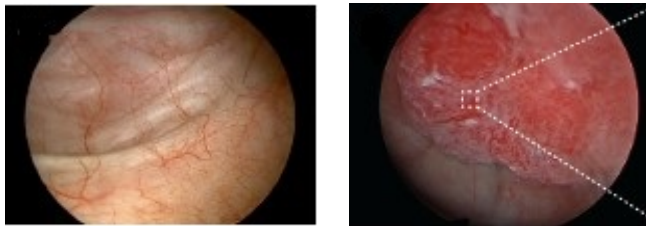


Figure 7: Cystoscopie vésicale dans le cas normal et dans le cas d'une tumeur urothéliale de haut grade [10].

2.3. Résection Trans urétrale de tumeur de la vessie

La résection Transurétrale de tumeur de la vessie (RTUTV) c'est un geste chirurgical qui permet la résection de la masse tumorale de façon complète et profonde, dans le but de réaliser un test anatomopathologique pour préciser et classifier la nature de tumeurs (stade, grade) de patient afin de préciser la stratégie thérapeutique exacte à suivre. Cependant, Il est recommandé de réaliser auparavant un ECBU afin d'éliminer la possibilité de l'infection urinaire. Cet examen clé du diagnostic de tumeur de vessie permet de préciser les tumeurs en termes de nombre, de topographie par rapport à l'urètre prostatique et d'orifices urétéraux [14].

VI. Traitements du cancer de la vessie

1. Stratification du risque

Les Tumeurs Superficielles de la Vessie (TSV) sont associées à des facteurs de risque de récurrence et de progression, comprenant le grade tumoral (haut, bas), le diamètre de la tumeur (>3cm), nombre des tumeurs (unifocale, multifocale), récurrence tumorale et la présence de CIS. Les TSV permettent alors de classer les tumeurs en trois groupes de risque de récurrence et de progression : bas, intermédiaire et haut, une fois le risque est déterminé, on passe à envisager la suite de traitements [14] (tableau IV) :

Tableau IV: Catégories de risque pour les tumeurs de vessie non-invasives [30].

| Risque | Critères |
|------------------|---|
| Faible | Tumeur urothéliale pTa de bas grade, de moins de 3 cm, unifocale, sans antécédent de tumeur de vessie, incluant les tumeurs à faible potentiel de malignité |
| Intermédiaire | Tumeur urothéliale pTa de bas grade qui ne présentent aucun des critères de haut ou très haut risque |
| Haut risque | Tumeur urothéliale présentant au moins un des critères suivants : pT1 Haut grade (G3) Présence de CIS |
| Très haut risque | pT1G3 + CIS ^a pT1G3 multifocal ^a pT1G3 > 3cm ^a |

2. Traitement des tumeurs urothéliales superficielles

2.1. Traitement initial : résection transurétrale de la vessie

La RTUV représente la première étape dans la prise thérapeutique du cancer de la vessie qui est utilisée pour 75% jusqu'à 85% des TVNIM [30]. Elle consiste une résection de tumeur de façon complète et approfondie, dans l'objectif de déterminer les caractères tumoraux superficiels ou profonds via l'analyse anatomopathologique, pour réduire les risques de récurrence et limiter la progression de la maladie [14].

Le taux de récurrence après la RTUV atteint 76%, dont 33–78% chez les patients atteints de tumeurs T1 de haut grade et 27 à 72 % chez les patients atteints de tumeurs Ta, dans ce cadre, il est recommandé de réaliser une deuxième RTUV pour le TVNIM après la RTUV initiale pour rechercher et éliminer les tumeurs initialement ignorées et réduire la récurrence et progression vers TVIM [31].

2.2. Traitement adjuvant : instillations endovésicales

La résection transurétrale des tumeurs superficielles est souvent suivie d'un traitement par des instillations endovésicales afin de diminuer le risque de récurrence des tumeurs superficielles et

de progression vers TVIM, les instillations endovésicales sont de deux types : la chimiothérapie (Mitomycine C (MMC)) et l'immunothérapie (Bacille de Calmette et Guérin (BCG)).

a. La mitomycine C

La MMC est un antibiotique anti-tumoral très utilisé en chimiothérapie intra vésicale, elle est généralement adoptée comme traitement de TVNIM. Le schéma classique de la chimiothérapie intravésicale à base de mitomycine C est de 6 à 8 instillations hebdomadaires de 40mg dans 40mL avec ou sans instillations mensuelles pendant 1 année maximum (traitement d'entretien).

Il est recommandé de réaliser l'instillation à base de mitomycine après la RTUV, idéalement dans les 2 heures premières ou dans les 24 heures qui suivent la première RTUV et en absence des contre-indications (hématurie et perforation vésicale), cela cible les cellules tumorales libérées après RTUV et réduit significativement le risque de récurrence tumorale passant en 35% (1an) à 14% (5ans) à 1 et 5 ans de 35 % et 14 % respectivement [32].

b. Instillation par Bacille Calmette Guérin (BCG)

BCG est une mycobactérie (*Mycobacterium bovis*) sous forme atténuée qui adhère au mucus vésical puis à l'urothélium qui engendre un effet d'activation du système immunitaire dans le but de détruire les cellules tumorales et diminuer le risque de récurrence par effet anti-tumorale de BCG. Le BCG n'est pas toujours bien toléré et le risque de rechute varie entre 30 et 40 % [10].

L'instillation par BCG ne sera programmée qu'après cicatrisation vésicale, généralement 2 à 4 semaines après la résection et avec un délai ne dépasse pas 6 semaines et en l'absence de toute tumeur résiduelle (hématurie macroscopique, infection urinaire). Le traitement d'induction comporte 6 instillations intravésicales hebdomadaires, chacune doit durer idéalement 2 heures. Le traitement d'entretien est recommandé dans tous les cas et comporte 3 instillations hebdomadaires à trois, six et douze mois post-opératoires d'une durée pouvant aller d'un à trois ans [14].

3. Traitement des tumeurs urothéliales infiltrantes

3.1. La cystectomie

La cystectomie est une chirurgie qui se base sur l'ablation définitive de la vessie pour assurer l'absence totale de cellules tumorales. La recommandation de la cystectomie est incluse en cas de TVIM non métastatique et en cas de TVNIM qui ne répondent pas aux traitements non invasifs. La cystectomie chez l'homme comprend généralement la prostatectomie et

l'hystérectomie, cependant chez les femmes comprend résection partielle du vagin et de l'urètre [10].

La réalisation d'une chimiothérapie néoadjuvante (NAC) à base de sels de platine en absence de contre-indication permet de diminuer la taille de la tumeur avant la résection et de prolonger la survie de patient [33] (survie spécifique à 5 et 10 ans de 71 et 65 % respectivement) [14].

3.2. Chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement référentiel utilisé chez les patients présentant des tumeurs très avancées, précisément lorsqu'il s'agit d'une tumeur de stade pT3/pT4, des ganglions lymphatiques ou des métastases à distance.

La chimiothérapie est subdivisée en deux types, selon son l'emploi par rapport à l'intervention chirurgicale :

- ✚ Néoadjuvante (avant la chirurgie) : c'est un traitement dans le cas de TVIM non métastatique utilisé pour réduire la taille de la tumeur pour faciliter le geste chirurgical, éradiquer les micro-métastases et éviter l'installation de cellules tumorales circulant au moment de la chirurgie et d'améliorer (d'environ 5%) la survie globale du patient.

La chimiothérapie repose sur le traitement néoadjuvante poly-chimiothérapies à base de cisplatine MVAC (méthotrexate, vinblastine, doxorubicine, cisplatine) ou CG (Cisplatine et Gemcitabine), qui est utilisée en raison de la moindre toxicité mais d'une efficacité comparable[14],[32] .

- ✚ Adjuvante (après la chirurgie) : chimio thérapeutiques utilisés sont les mêmes que pour la chimiothérapie néoadjuvante adopté en cas de tumeur à haut risque de récurrence notamment stade pT3 et pT4, statut ganglionnaire N+, marges chirurgicales positives (résection incomplète avec tumeur résiduelle microscopique ou macroscopique) dans le but de retarder l'évolution en complétant une chirurgie incomplète et de prolonger la survie[30].

VII. Génétique du cancer de la vessie

Les progrès récents de la biologie moléculaire anticancéreuse a permis l'identification des altérations génétiques et épigénétiques impliquées dans les tumeurs de vessie. La compréhension des mécanismes moléculaires de la carcinogenèse vésicale est considérée une étape essentielle pour comprendre l'hétérogénéité des tumeurs vésicales d'un point de vue moléculaire afin d'identifier des marqueurs potentiellement utiles dans le cadre de la prise en charge du CV [34] .

1. Altérations génétiques

Le projet Cancer Génome Atlas a notifié que les tumeurs urothéliales comportent 302 mutations codantes ; dont 32 gènes incluant des gènes régulateurs du cycle cellulaire, 204 altérations segmentaires de nombre de copies géniques et environ 22 réarrangements. Plusieurs altérations chromosomiques et un large spectre de mutations ont été rapportées tels que les mutations des gènes *CDKN2A*, *RB1*, *E2F3*, *TP53*, *FGFR3* ou *PIK3* [16].

Des études récentes de séquençage du génome ont démontré la présence de multiples sous-groupes du CV qu'ils s'agissent des TVNIM et des TVIM qui sont extrêmement hétérogènes au niveau de leurs profils histologiques.

a. Les voies de la carcinogénèse de cancer de la vessie.

De multiples études basées sur les données génétiques ont identifié l'existence de deux voies carcinogènes des tumeurs vésicales due à l'aberration totale ou partielle de chromosomes 9 (figure 8). La voie papillaire qui favorise une hyperplasie qui donnera la naissance à une TVNIM de bas grade (BG) ou à une TVNIM Ta/T1 de haut grade (HG) qui se caractérise par des mutations activatrices des gènes *FGFR3*, *TERT* et la voie non papillaire qui survient via la dysplasie ou du carcinome in situ (CIS) à partir duquel se développe le carcinome urothéliale (CaU) invasif de haut grade qui se caractérise par les mutations des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *p53*, la surexpression du gène *DMD2* et les mutations ponctuelles touchant le *TSC1*, *PIK3CA* [34],[35].

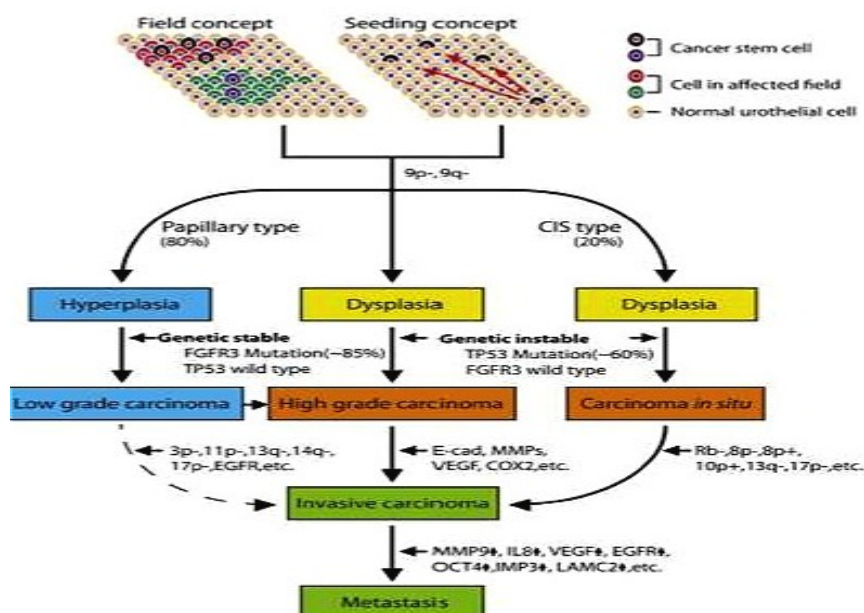


Figure 8: Voies de Carcinogénèse des tumeurs vésicales [36].

1.1. Altérations génétiques dans le cancer de la vessie non-infiltrant le muscle

Les TVNIM représentent 70% des cas diagnostiqués au stade non infiltrant (50 % pTa, 20 % pT1). Ce type se caractérise par la surexpression des oncogènes conduisant à des tumeurs superficielles papillaires non invasives (hyperplasie) du types Ta qui sont considérés comme des tumeurs génétiquement stables qui sont dues fréquemment à la délétion totale ou partielle des chromosomes, l'altération du niveau d'expression des gènes ainsi que les mutations ponctuelles[34].

CDKN2A :

CDKN2A est un gène suppresseur de tumeur qui bloque le cycle cellulaire et qui code pour deux protéines importantes dans la régulation du cycle cellulaire : *p16* et *p14 ARF* qui aboutissent à l'arrêt du cycle cellulaire via l'inhibition de voies de signalisation *p53* et *RBI*. Ce gène *CDKN2A* se caractérise par la perte de l'hétérozygotie (LOH) de 9q et 9p entraînant dans 15% la délétion homozygote de *CDKN2A* [37] avec une petite contribution (10 % à 15 %) aux tumeurs non invasives musculaires de haut grade et de 50-60% de la délétion hétérozygotie de *CDKN2A* (tableau V) [22] .

FGFR3 :

Parmi les principaux oncogènes portant des mutations activatrices dans les tumeurs de la vessie sont les mutations activatrices du gène *FGFR3*, qui est considéré comme un récepteur à activités tyrosine kinase qui déclenche et régule plusieurs voies de signalisation : *RTK/RAS/RAF/MAPK* et *PI3K/Akt/mTOR*. Ces voies sont impliquées dans des différents processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la migration, l'angiogenèse et l'apoptose[35]. L'altération de ce gène entraîne des mutations ponctuelles sur chromosome 4p16 représentant ainsi jusqu'à 60 -70% des tumeurs au stade Ta (tableau V) [35].

1.2. Altérations génétiques dans le cancer de la vessie infiltrant le muscle

La voie non papillaire donne la naissance à la majorité des TVIM qui se caractérisent par une hétérogénéité tumorale importante avec une forte instabilité génomique qui sont liées à un stade avancé et à une faible survie, les mutations des gènes suppresseurs de tumeurs sont un point de clé d'apparition de TVIM tels que (tableau V) :

TP53 :

Le gène *p53* c'est le gène le plus fréquemment altéré dans le CV, il code pour la phosphoprotéine *p53* ayant un rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire ,qui se localise au niveau du bras court du chromosome 17 et qui joue un rôle central dans la stabilité génomique en inhibant l'accumulation des mutations au niveau des oncogènes [39], les fréquence des mutations du *p53* sont plus importantes dans les tumeurs de haut grade (plus de 50 % des cas) par rapport aux tumeurs de bas grade (20 % seulement) [34].

MDM2 :

C'est un oncogène situé dans le chromosome 12 [40],ce gène est responsable de la régulation négative de *p53* et qui est détecté dans 4-5 % des cas de TVIM [37] .

RB :

Le gène *RBI* se localise au niveau du chromosome 13 et code pour une phosphoprotéine nucléaire (pRB), il est de poids moléculaire de 110 Kilodaltons et interagi avec des protéines impliquées dans la transition G1-S du cycle. Les mutations du gène *RBI* ont été décrites dans 13 % des cas du CV (tableau V) [34] .L'inactivation des gènes suppresseurs est souvent associée avec la progression tumorale vers les métastases qui sont fréquemment dues à l'aberration des facteurs angiogéniques tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*VEGF*) qui stimule la formation des nouveaux réseaux vasculaires favorisant ainsi la progression métastatique [41].

Tableau V: Les gène les plus fréquemment altérés dans le cancer de la vessie [5].

| Oncogènes altérés dans les carcinomes urothéliaux | | | | | |
|--|------------|--|--------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| Gène | chromosome | Altération dans les TVNIM de bas grade | Fréquence % | Altération dans les TVIM de bas grade | Fréquence % |
| <i>FGFR3</i> | 4p16 | Mutation ponctuelle surexpression | 60-70% 80% (protéine) | Mutation ponctuelle surexpression | 5-20% 40% (protéine) |
| <i>PIK3CA</i> | 3q26 | Mutation ponctuelle | 25% | Mutation ponctuelle | 9-20% |
| <i>EGFR</i> | 7p12 | Surexpression | 20% (protéine) | surexpression | 50% |
| <i>HRAS</i> | 11p15 | Mutation ponctuelle | 5-10% | Mutation ponctuelle | 5-6% |
| <i>KRAS</i> | 12p12 | Mutation ponctuelle | 5% | Mutation ponctuelle | 5% |
| <i>NRAS</i> | 1p13 | Mutation ponctuelle | 1-2% | Mutation ponctuelle | 1-2% |

Gènes suppresseurs altérés dans les carcinomes urothéliaux

| | | | | | |
|---------------|-------|------------------------|--------|------------------------|--------|
| <i>CDKN2A</i> | 9p21 | Délétion hémizygote | 50-60% | Délétion hémizygote | 50-60% |
| | | Délétion homozygote | 15% | Délétion homozygote | 20-30% |
| <i>MDM2</i> | 12q14 | Amplification | 3% | Amplification | 4-5% |
| <i>RBI</i> | 13q14 | Mutation inactivatrice | NI | Mutation inactivatrice | 11-13% |
| <i>TP53</i> | 17p13 | Mutation inactivatrice | 0-14% | Mutation inactivatrice | 24-56% |
| | | Surexpression | <10% | Surexpression | 30-50% |

VIII. Classification moléculaire du cancer de la vessie :

Ces dernières années, quatre profils taxonomiques ont été établis par différents groupes d'étude: étude de l'université de Lund[42] l'étude TCGA[43] ,étude par MD Anderson Cancer Center (MDA) [44] et une étude par University of North Carolina (UNC)[45]. L'analyse comparative de ces études par des approches bio-informatiques a permis de révéler des chevauchements entre les sous-types moléculaires de chaque profil (figure 9).

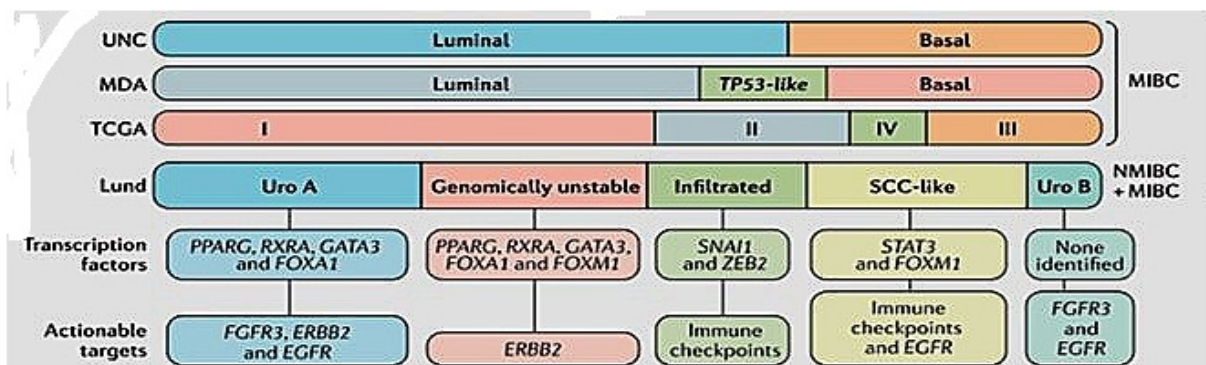


Figure 9: La classification moléculaire du cancer de la vessie [10].

En 2012, l'université de Lund a proposé l'une des meilleures classifications qui inclut des études sur des tumeurs TVNIM et TVIM chez des populations tumorales non sélectionnées, par la technique de NGS, et selon la fonction d'expression des gènes, ils ont déterminé 5 groupes de CaU [42] :

- ✓ **Les tumeurs urobasales A :** est caractérisé par une haute surexpression de *FGFR3*, *PIK3CA*, *p63* et *KRT5*, les tumeurs urobasales A contient une majorité de Ta et T1 de bas grade ,ce sous-type présente ainsi un bon pronostic [35] .
- ✓ **Le sous-type génomiquement instable,** caractérisé par un fort taux de mutations de *p53*, surexpression d'*ERBB2*, E-cadhérine et une faible expression de cytokératine. Il

est fréquent dans les tumeurs de stade supérieur ou égal à pT1 et les tumeurs de haut grade [46], [47].

- ✓ **Le sous-type du type SCC (Squamous Cell Carcinomalike)** : Ce sous-type montre la présence un degré de biomarqueur de différenciation et une surexpression de kératines basales: *KRT5*, *KRT6* *KRT16*, ainsi qu'il est généralement associé à un mauvais pronostic. [47], [48].
- ✓ **Le sous-type infiltrant** : ce sous type présente une fréquence particulière de gènes impliqués dans la réponse immunitaire, notamment ce sous type présente un taux élevé de biomarqueur qui caractérise les cellules immunitaires et stromales [46].
- ✓ **Les tumeurs uro-basales B** : est similaire de point de vue d'expression de certains gènes au sous-type uro-basale A, tels qu'une haute fréquence de mutation de *FGFR3*, *CCND1* et *p63*, mais l'absence de mutation de *PIK3CA*.

Ce sous-type caractérisé par l'expression de plusieurs kératines spécifiques du type SCC et un fort taux de mutation de *p53*, ce qui lui confère un mauvais pronostic [46].

En 2014, **l'équipe de Choi** de l'University of North Carolina (UNC) a mis en place la classification en deux sous-types ; luminal et basal, en indiquant une similitude avec les tumeurs lumineuses et basales du cancer du sein par l'équipe de Perou et al. et MDA a subdivisé le TVIM en 3 sous-types [44] :

- **Sous type luminal** : ce type se caractérise par une expression forte des uroplakines (*UPK2* et *UPK1A*) et des marqueurs de différenciation urothéliale (*FOXA1*, *GATA3*) ainsi que la transcription active de récepteurs de *PPARG* (*peroxisome proliferator-activated receptor*) et récepteur d'œstrogène avec une fréquence élevée des mutations activatrices de *FGFR3*.
- **Sous type p53-like** : se caractérise par une expression élevée de (*CK14* et *CK5*). Ce sous type est résistant aux médicaments de chimiothérapie néoadjuvante base de méthotrexate, vinblastine, doxorubicine et cisplatine (MVAC) [44].
- **Sous-type basal** : ce sous-type est rassemblé avec le sous-type de carcinome épidermoïde de l'équipe de LUND qui s'exprime fortement les marqueurs de différenciation des cellules squameuses et des biomarqueurs « mésenchymateuse » et un niveau élevé d'expression de l'*EGFR* avec une présentation plus agressive de la maladie qui présentent un mauvais pronostic clinique [49].

En 2014, le **groupe TCGA** « The cancer genome Atlas » a identifié quatre sous-type qui ont été nommé Cluster I, Cluster II, Cluster III , et Cluster IV [40],[47] :

- **Cluster I** : représente des tumeurs avec une morphologie papillaire avec une surexpression de gène *EGFR3*, et il présentait des similarités avec sous-type urobasal A de Lund et sous-type luminal de l'UNC et du MDA.
- **Les clusters I et II** : présentent des aspects proches de ceux des formes luminales A des cancers du sein, avec une augmentation de l'expression de *GATA3* et *FOXAI*, *UPK3A* la surexpression de *ERBB2* et du récepteur bêta aux œstrogènes[40], ce cluster correspond au sous-type infiltrant et génomique instable (Lund), luminal (UNC) et luminal-*TP53*-like (MDA).
- **Cluster III** : exprime les tumeurs ayant des caractéristiques des cellules squameuses et qui exprime la lignée épithéliale, notamment *KRT14*, *KRT5*, *KRT6A* et *EGFR*, ce sous-type correspond au sous-type SCC-like urobasal B (Lund) ou basal (UNC et MDA).
- **Cluster IV** : se caractérise par l'absence d'expression de *HER2* et d'expression des marqueurs de différenciation basale des cytokératines 5, 6 et 14 avec une expression normale de l'EGFR et il présentait des similarités avec les sous types infiltrés à faible Claudine décrit par le groupe UNC et basal de MDA.

En 2017, une nouvelle version de classification a réalisé par le groupe de Lund, en identifiant d'autres sous-types à partir de de l'analyse de 412 TVIM, ces sous-types est subdivise en 5 : 3 type luminal (luminal, luminal-infiltré neural et luminal-papillaire), 1 basal (basal-squameux) et 1 neuronal. Les sous-types luminaux ont montré une expression élevée de uroplakine (*UPK2* et *UPK1A*) et de la différenciation urothéliale marqueurs (*FOXAI*, *GATA3*, *PPARG*) dont [43] ,[49]:

- **Le sous-type luminal-infiltré** : était distingué par une forte expression des signatures géniques des muscles lisses, des myofibroblastes et exprime fortement l'ECM (matrice extracellulaire).
- **Le sous-type luminal-papillaire** : était enrichis en tumeurs ayant des caractéristiques papillaires avec des mutations de *EGFR3* et des fusions avec *TACC3*, Ce sous-type présente un faible risque de progression et un bon pronostic et il n'est pas sensible à la chimiothérapie néoadjuvante (NAC) [49] .
- **Le sous-type baso-squameux** : se caractérise par une forte expression de marqueurs basaux (*CD44*, *KRT5*, *KRT6A*, *KRT14*) et des marqueurs de différenciation squameuse (*TGMI*, *DSC3*, *PI3*).

- **Le sous-type neuronal** : était distingué par l'expression de gènes neuroendocriniens et neuronaux, ce sous-type avait un mauvais pronostic et une survie courte [43] .

Partie 2 : Facteur de croissance endothéliaux vasculaires

I. *VEGF* et ses récepteurs Système *VEGF/VEGFR*

1. caractéristiques structurales et biologiques

VEGF est une glycoprotéine dimérique liée par un pont disulfure hautement conservé, qui est constitué de sept protéines, les *VEGFs* A, B, C, D, E, F et le *PlGF* (Placental Growth Factor) qui sont structurellement très apparentés. Chacune de ces protéines à une tâche spécifique et une modalité d'action différente [50].

1.1. Gène *VEGFA*

Le *VEGF A*, décrit pour la première fois par Senger comme un facteur de perméabilité vasculaire (*VPF*) et également appelé *VEGF*, est un des membres de la famille des *VEGFs* les plus étudiés, vue son rôle essentiel dans la vasculogénèse et la néo-angiogénèse, aboutissant à la prolifération cellulaire et à l'augmentation de perméabilité vasculaire . Le protéine *VEGF* est hétéromère de 46 kDa qui se dissocie lors de la réduction en deux chaînes homodimère de 23 kDa qui se situe dans le chromosome 6p21 et qui contient huit exons répartis sur une distance approximative de 14Kb, séparés par sept introns[50] .

Ce gène se caractérise par hétérogénéité moléculaire due à l'épissage alternatif d'exon de *VEGF* qui entraîne selon la structure, le nombre des acides aminés et l'affinité pour l'héparine des différentes isoformes : *VEGF121*, *VEGF165*, *VEGF189* et *VEGF206* (figure 10). Ces isoformes ont un rôle spécifique dans la différenciation et le développement du système vasculaire, y compris dans la vasculogénèse et néo-angiogénèse. Elles ont en commun les exons 1 à 5 qui constitue 115 acides aminés en position N-terminale ainsi que l'exon 8 pour les six résidus en C- terminal qui assure la prolifération des cellules endothéliales (CE). Parmi ces isoformes, le *VEGF 165* qui est la forme la plus dominante et la plus active chez l'homme, ayant une activité modérée pour l'héparine qui se caractérise par l'absence de l'exon 6 qui est responsable de l'affinité de l'héparine. L'absence ou présence d'exons 6 et 7 explique l'affinité à héparine où elle est absente pour *VEGF121* et donc elle entraîne l'absence d'affinité à l'héparine. En revanche, *VEGF189*, *VEGF 206* ayant une forte affinité à héparine due également à la présence exon 6 et 7 [51],[52].

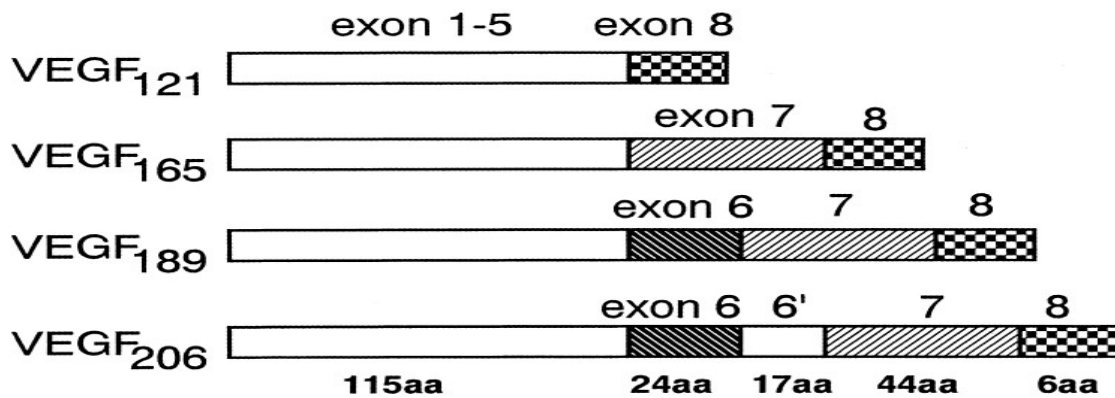


Figure 10: Comparaison entre les quatre isoformes de *VEGF* [51].

2. Le *VEGFR* : caractéristiques structurales et biologiques

2.1. Structure et activation

Le récepteur *VEGFR* fait partie de la famille du récepteur tyrosine kinase (*RTK*), cette famille comprend trois types de récepteurs à activité tyrosine kinase (*VEGFR1*, *VEGFR2* et *VEGFR3*), ainsi que des corécepteurs dépourvus d'activités tyrosine kinase (*NRP1* et *NRP2*). Les membres de la famille des *VEGFs* ayant des affinités différentes sur les trois récepteurs à activité tyrosine kinase entraîne l'activation des voies de signalisation différentes [53].

a. Structure

Les récepteurs du *VEGF* sont classés en des *RTK* de type III, qui sont similaires de point de vue structurelle et qui se constitue de trois régions distinctes. La région extracellulaire est constitué de sept boucles de type immunoglobuline (*Ig*) qui permet la fixation des ligands et la dimérisation de monomère et d'après les études ont montré que seuls les domaines 2 et 3 sont nécessaires pour une liaison étroite du *VEGF* au récepteur *KDR*, ainsi que le domaine d2 du récepteur était suffisant pour fixer le *VEGF* au récepteur *FLT1*. Ainsi, les domaines d1 et d3 peuvent participer à la liaison du ligand et améliorer l'affinité, la région transmembranaire et la région intracellulaire qui contient les domaines à activité tyrosine kinase et *VEGFR-2* ont un rôle dans l'angiogenèse ainsi que *VEGFR-3* la voie de signalisation induit à lymphangiogenèse [53].

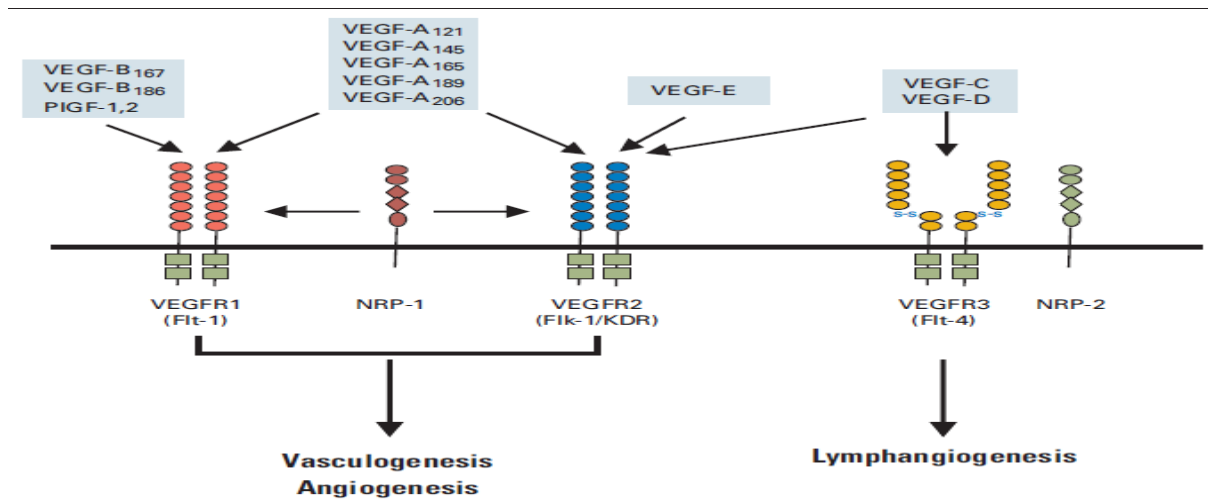


Figure 11: Représentation schématique des ligands de la famille *VEGF* et de leurs récepteurs[54].

🚦 *VEGFR-1* et voie d'activation

VEGFR-1 (*Flt-1*) est une protéine transmembranaire de 180-kDa qui est stimulé lors de la fixation de *VEGFA*, *VEGFB* et *PIGF*. Il est également exprimé dans les cellules endothéliales vasculaires, les monocytes, les macrophages, les trophoblastes, les cellules mésangiales rénales, les cellules dendritiques et ce dernier se trouvent sous deux formes : forme trans-membranaire et forme soluble. Bien que l'affinité de *VEGFR1* pour le *VEGFA* sont dix fois supérieure à celle du *VEGFR2* mais la transduction de signal est faible.

Le mécanisme d'activation de récepteur est semblable à celui observé dans l'ensemble des récepteurs à activité tyrosine kinase. Le *VEGFR-1* se trouve monomère hors de la fixation des ligands *VEGFs*. Lors de liaison du ligand et du récepteur *VEGF* on a la dimérisation de récepteur en maintenant la forme dimérique suivie de l'autophosphorylation de résidus tyrosine kinase situé dans le domaine intracellulaire (*TYRs1169, 1213, 1242, 1327, 1333*), la phosphorylation de *TYR1169* induit la liaison et l'activation de la *phospholipase C(PLC)* qui est à son tour responsable de l'activation des *mitogen-activated protein kinases (MAPK)* permettant ainsi de réguler la prolifération des cellules endothélium. Le *Tyr 1213* induit l'activation de *Ras-dépendante* en se liant à de différentes protéines contenant *SH2*, y compris *PLCγ*, *GRB 2* (protéine liée au facteur de croissance), *Nck* (la région non catalytique de la protéine adaptatrice de la tyrosine kinase) et *SHP-2* (protéine tyrosine phosphatase contenant le domaine *SH2*), d'autre part, le remodelage d'actine au niveau CE et la migration cellulaire dépendent de l'activation de *RACK1* médiée par *VEGFR* qui va activer une cascade de signalisation en stimulant l'activation de la voie *PI3K/AKT* qui va ensuite stimuler le *RACK1*

[55]. Le *VEGFR1* soluble épissé alternativement de *VEGFR-1 (sFlt-1)* qui induit une régulation négative de la signalisation en inhibant l'activité du *VEGF* [56].

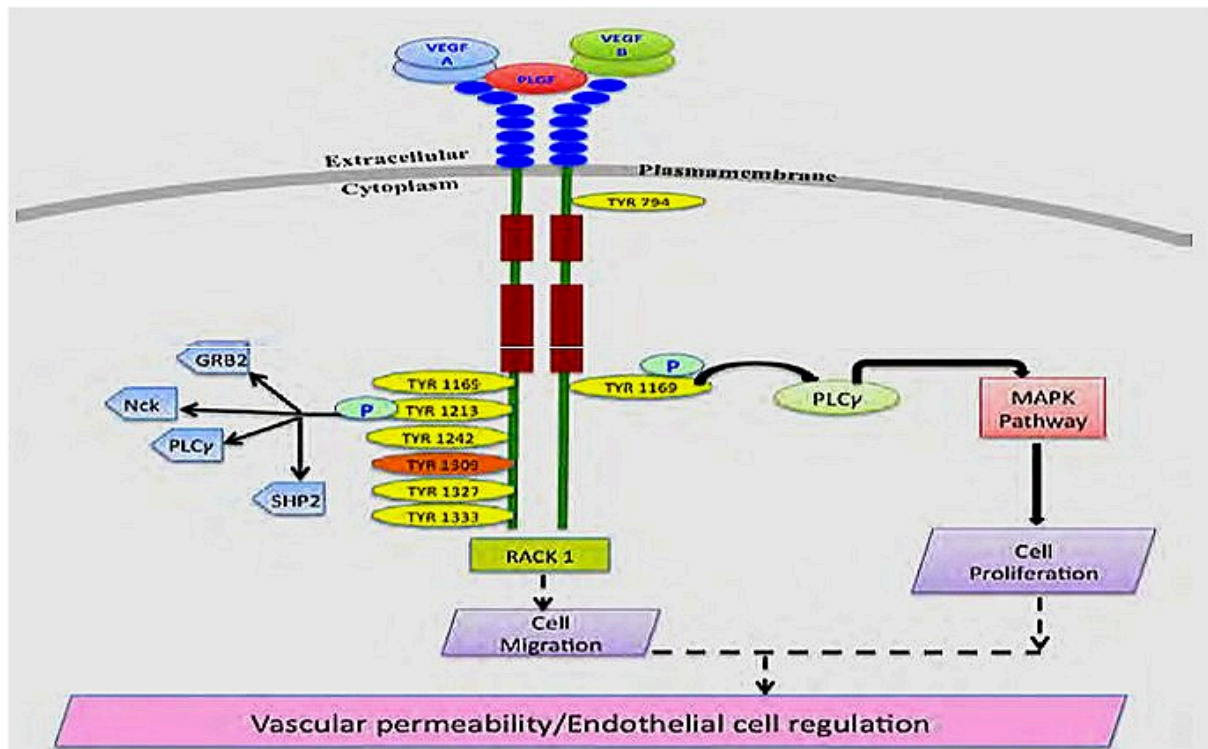


Figure 12: Voie de signalisation de récepteurs VEGFR1 [55].

✚ *VEGFR-2* et voie d'activation

VEGFR2 est une glycoprotéine de poids moléculaire de 210–230 kDa qui se lie au *VEGF-A*, -*C*, -*D*. Il est exprimé au niveau des CE des systèmes sanguin et lymphatique et d'autres types de cellules tels que les mégacaryocytes et les cellules souches hématopoïétiques [57].

D'un point de vue biochimique, la liaison du *VEGF* induit l'autophosphorylation de plusieurs résidus tyrosines et l'activation de différentes voies de signalisations conduisant notamment à des réponses biologiques spécifiques ; parmi lesquelles, la *TYR 1175* qui joue un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire. La phosphorylation de la tyrosine 1175 donne lieu à l'activation des voies de signalisation de la *phospholipase C gamma-protéine (PLC-g)* qui mène à une cascade de signalisation qui permet l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire et l'activation de la *protéine kinase C (PKC)*, à son tour va provoquer l'activation de *protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK)*, alors la survie et la migration implique la liaison de *TYR1175* phosphorylé à la protéine adaptatrice B (*SHB*) contenant le domaine *SH2*, à son tour va se lier à la kinase d'adhérence focale phosphorylée (*FAK*) [58].

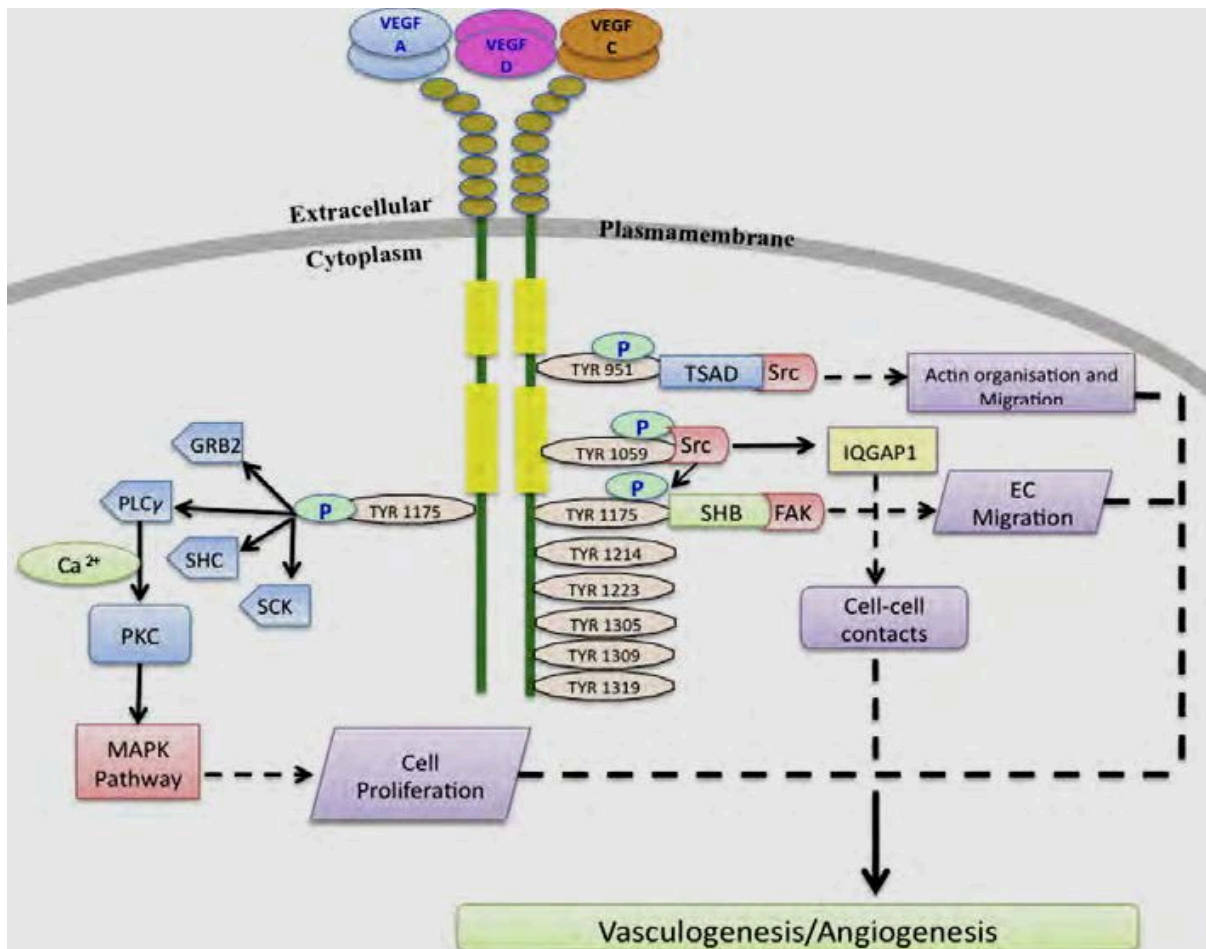


Figure 13: Voie de signalisation de récepteurs *VEGF2*[55].

✚ *VEGFR-3* et voie d'activation

VEGFR3 est une protéine d'un poids moléculaire d'environ 195 kDa, qui joue un rôle important dans la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques, il est activé par la liaison des ligands *VEGF-C* et *VEGF-D* [57]. *VEGFR-3* joue un rôle dans la formation des réseaux lymphatiques et favorise la migration cellulaire et la prolifération cellulaire par l'activation de la voie *PI3K–Akt/PKB* via la phosphorylation de tyrosine, notamment *TYR 1230*, *TRR1236*, *1337* à son tour va fixer *Src* et *SHC* ainsi favorise la signalisation par les voies *ERK1/2* et la phosphorylation de *TYR1063* va entraîner l'interaction avec la protéine adaptatrice *C10*, régulateur de la kinase (*CRK I/II*), ce dernier active la voie tyrosine kinase c-Jun N-terminale (*JNK*) afin de favoriser la survie dans l'endothélium lymphatique [59].

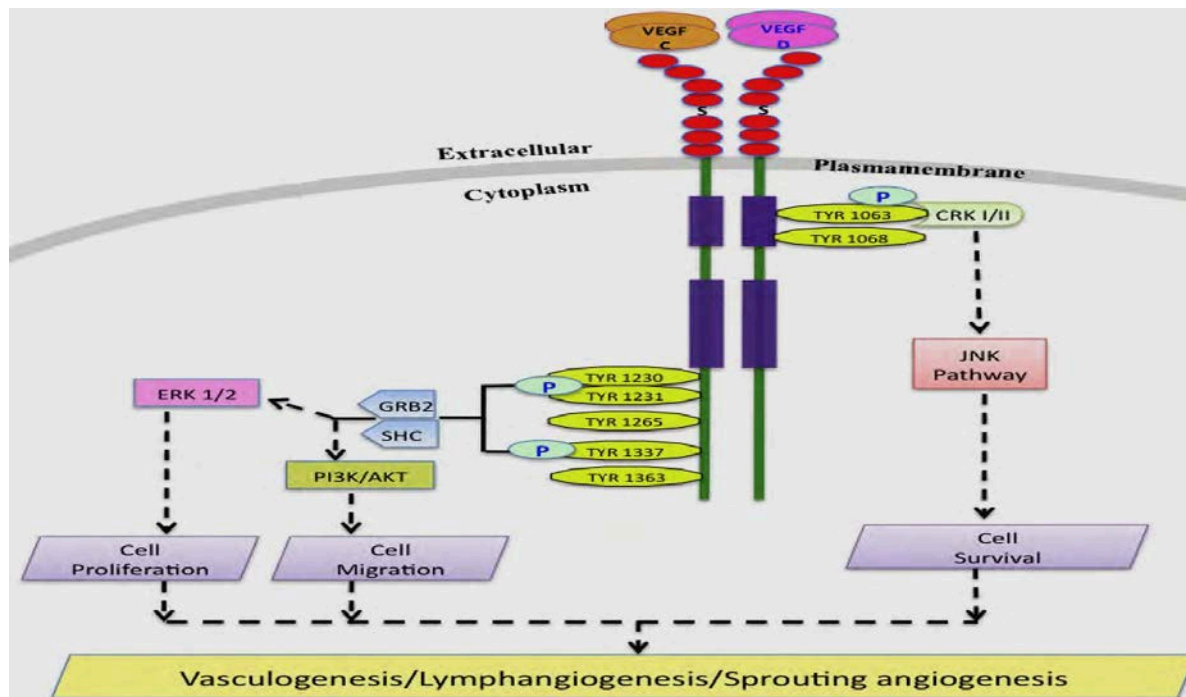


Figure 14: Voie de signalisation de récepteurs VEGFR3[55] .

✚ Neuropilin

Neuropilin, *NRP-1* et *NRP-2* sont des récepteurs transmembranaires de *VEGFRs* situés sur les cellules endothéliales avec un poids moléculaire faible de 120 à 135 kDa, son activité est notamment médiée en tant que corécepteur pour *VEGFR-1* et *VEGFR-2* en améliorant l'affinité de liaison des ligands aux récepteurs et de moduler l'activité des *RTK*. Les neuropilines se lient sélectivement à certaines isoformes de *VEGF*, dont *NRP-1* qui est codée par 10p12 se lie à des isoformes portant l'exon 7 ou 6 et 7[58], telles que *VEGF-A165*, *VEGF-A183*, et *VEGF-A203* et avec l'héparine sulfate. L'interaction du *VEGF165* à *NRP1* conduit à la formation d'un complexe avec *VEGFR2* permet d'améliorer l'efficacité de la transduction du signal en augmentant la perméabilité vasculaire et la migration des cellules endothéliales. Le *NRP-2* est codée par 2p34 et exprimé sur les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques et des veines, renforçant l'affinité des ligands *VEGF-C* dans *VEGFR-3* [60,61] .

II. Rôle du *VEGF* et de ses récepteurs dans l'angiogenèse physiologique

L'importance de *VEGF* est un stimulateur régulateur principal de l'angiogenèse et de la vasculogenèse. L'angiogenèse est l'étape qui suit la vasculogenèse qui correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir d'une vascularisation préexistante, débutant par la sélection et la stimulation des cellules endothéliales qui reposent sur la surface luminale des vaisseaux sanguins via la fixation des acteurs de l'angiogenèse tels que la fixation du *VEGF* sur

son récepteur induisant la dégradation de la matrice extracellulaire, la migration et la prolifération des cellules, ensuite la fusion et la formation d'une lumière et enfin le dépôt d'une nouvelle matrice extracellulaire à la surface des vaisseaux en assurant également la maturation finale de CE d'un vaisseau sanguin fonctionnel [62].

III. *VEGF* dans le cancer de la vessie

Le ligand *VEGF* et son récepteur *VEGFR* semblent être un évènement puissant dans l'angiogenèse physiologique ainsi que l'angiogenèse tumorale qui induit principalement des pathologies, y compris le cancer, où le processus de l'angiogenèse tumorale s'initie par la présence des cellules cancéreuses, qui à son tour sécrètent des facteurs pro-angiogénique qui stimule la croissance tumorale et la progression métastatique en fournissant leur besoin en nutriment et en oxygène aux cellules cancéreux. Parmi les facteurs pro-angiogénique les plus répondues dans l'angiogenèse tumorale c'est le facteur de croissance *VEGF* qui est un régulateur clé de l'angiogenèse via l'activation des cascades de voie de signalisation conduisant à la prolifération, la migration et la survie cellulaire [63].

Les altérations du gène *VEGF*, font partie des altérations génétiques observés dans le cancer de la vessie. Parmi ces altérations, ils existent les polymorphismes mononucléotidiques (*SNP*) situés principalement dans la région promotrice du gène *VEGF*. Les polymorphismes les plus fréquents du gène *VEGF* sont : le polymorphisme -2578C/A (rs699947) situé en amont par rapport au site d'initiation de la transcription, le polymorphisme -2549I/D (rs35569394) caractérisé par une délétion/insertion de 18 pb connu par la génération d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle, en augmentant l'expression du *VEGF* [64], ainsi que le polymorphisme -460C/T (rs833061) qui s'accompagne à la surexpression du *VEGF* et qui est connu par sa corrélation avec la récurrence et progression du CV [63] (Figure 15).

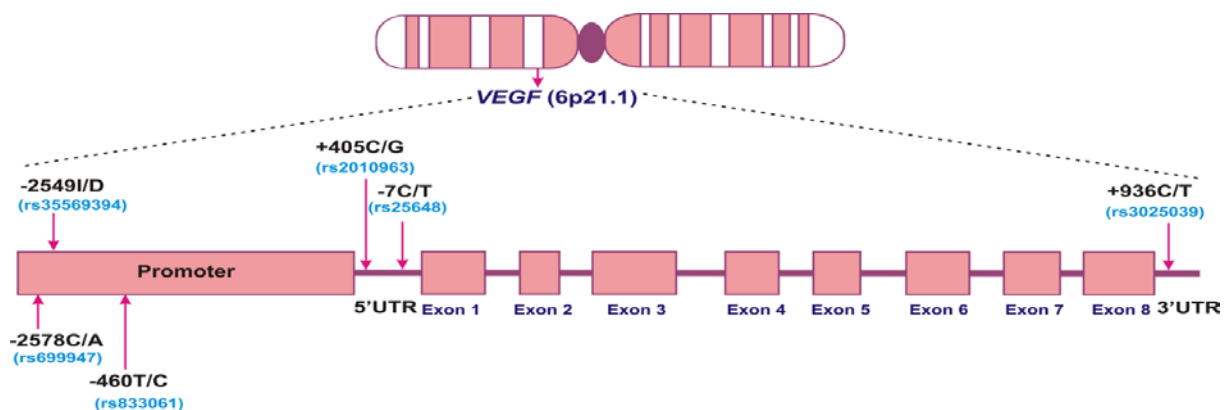


Figure 15: la position chromosomique du *VEGF* et les emplacements des polymorphismes analysés [65].

D'après l'étude de O'RBIEN qui a démontré que l'expression de *VEGF* est dépendante du stade du cancer : une expression élevée dans le stade de cancer superficiel par rapport au cancer au stade avancé, ce qui explique que l'angiogenèse tumorale s'initie dans les stades primaires de cancer et qui se récidive et se propager vers un stade avancé via la croissance tumorale et propagation métastatique .De point de vue moléculaire , O'RBIEN a confirmé que le développement de cancer de la vessie se fait dans deux voies génétiques différentes qui sont associées à des morphologies tumorales et de stades différentes(figure 16). Dans les tumeurs superficielles, l'expression plus élevée de VEGF semble être associée à un risque plus élevé de récurrence des tumeurs pT1G1/G2 et progresse vers les tumeurs invasives[66] .

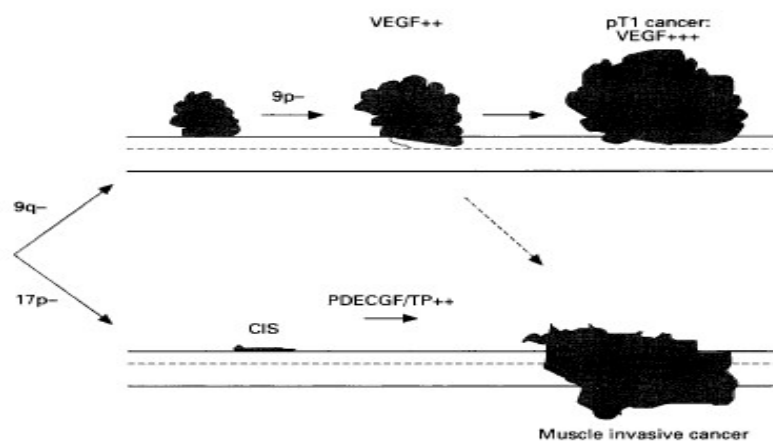
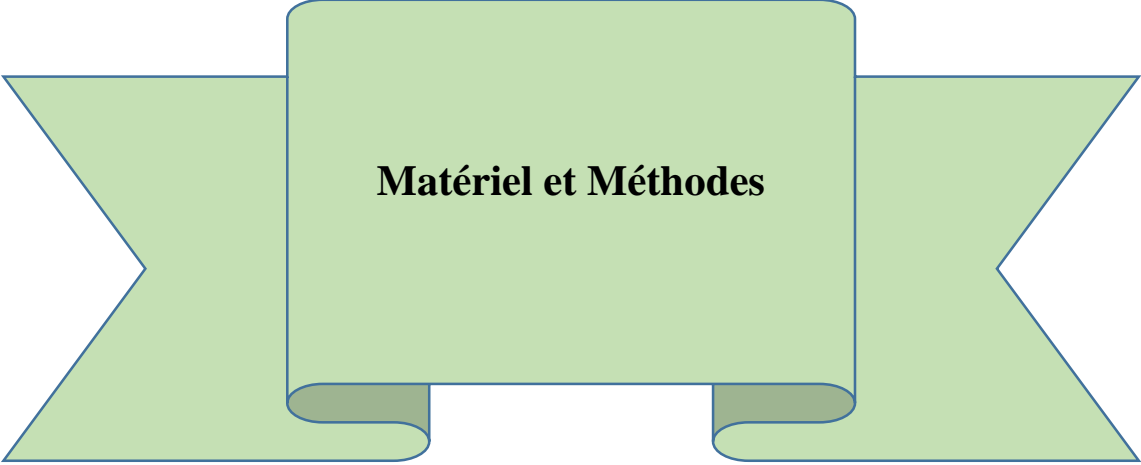


Figure 16: Altérations de VEGF et progression tumorale dans les cancers de la vessie [66].



Matériel et Méthodes

A. Matériel :

I. Phase pré-analytique :

1. Modalité de la collecte :

Notre étude prospective a été réalisée sur des biopsies fraîches de 70 patients atteints du cancer de la vessie comprenant 2 femmes (2,85%) et 68 (97,15%) hommes provenant du Service d'Urologie de l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V (HMIMV) à Rabat -Maroc, depuis l'année 2017 jusqu'à 2018, sous l'accord du comité d'éthique, cette cohorte présente une âge médiane de 67.5 ans, dont 63% des patients sont âgés entre 50 et 70 ans, 36% sont âgés plus de 70 ans et 1% sont âgés moins de 50 ans. 40% (28/70) des patients sont des fumeurs et 60% (42/70) non-fumeurs.

2. Mode de prélèvement

Le prélèvement de notre matériel biologique a été fait par la réalisation de cystoscopie ou de RTUV des patients de notre cohorte.

Les biopsies prélevées ont été divisées en deux parties : une partie a été visée à notre étude dans le but d'effectuer une analyse moléculaire, et l'autre partie a été utilisée dans l'étude anatomopathologique en fonction du stade (TNM) et du grade (OMS) de la tumeur qui s'effectue au sein du Service d'Anatomie Pathologique de HMIMV.

En plus des biopsies, le recrutement a inclus aussi deux prélèvements sanguins (un tube NFS et un tube sec) et un prélèvement des urines du même patient.

Juste après ces échantillons ont été transportés immédiatement dans la glace au laboratoire de l'Unité de Biologie et Recherche Médicale (UBRM) au Centre National de l'Energie, Des Sciences Et Techniques Nucléaires (CNESTEN).

3. Traitement et stockage des échantillons

Les biopsies fraîches ont été subdivisées en deux parties : une partie dédiée à l'extraction de l'ADN qui a été conservée à -80 et une autre partie de la biopsie a été conservée à -80 C° dans des tubes contenant de RNAlater pour protéger l'ARN et empêcher sa dégradation par l'enzyme « RNAase » qui sera utilisée pour l'extraction de l'ARN.

II. Phase analytique :

1. Extraction de l'ADN :

Pour l'extraction de l'ADN génomique totale, nous avons réalisé la méthode classique

« Phénol-chloroforme », c'est une technique d'extraction de type liquide-liquide, qui permet de dénaturer, et d'éliminer les protéines et les lipides en formant deux phases (phase aqueuse

contenant des acides nucléiques et phase organique contenant des protéines et des lipides). Cette méthode permet l'obtention d'un bon rendement d'ADN avec une meilleure qualité et quantité (annexe 1).

2. Dosage de l'ADN :

Le contrôle quantitatif et qualitatif de l'ADN extrait permet d'évaluer la pureté de l'ADN, se fait par la lecture de la DO à l'aide de Nano Drop 2000 spectrophotomètre UV-Visible de la compagnie Thermo-Scientific.

Cet appareil permet de calculer les deux ratios suivants :

- **Ratio 260/280** : est calculé pour évaluer la pureté de l'ADN extrait. La valeur de référence de l'ADN pur est entre 1,8 et 2,0. Si la valeur de ratio est inférieure à 1,8 ; ceci indique que l'ADN extrait est contaminé par des protéines, par le phénol ou d'autres contaminants qui absorbent fortement à (ou près de) 280 nm.
- **Ratio 260/230** : est mesuré pour déterminer la pureté secondaire de l'ADN. La valeur de référence de l'ADN pur est entre 2,0 à 2,2. Si ce ratio est inférieur à 2 ; ça indique la présence de contaminants qui absorbent à 230 nm.

3. Contrôle de la qualité d'ADN extrait par amplification du gène GAPDH :

GAPDH ou *D-glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase* est une enzyme ubiquitaire qui s'exprime dans tous les types cellulaires chez les êtres vivants et dont les produits assurent les fonctions indispensables à la survie des cellules. Par conséquent, les gènes de ménage, tels que *β-globine*, *β-actine*... sont largement utilisés comme référence permettant le contrôle qualité de l'ADN extrait. Les amorces utilisées ainsi que la taille du produit PCR sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau VI) [67].

a. Amorces utilisées et leurs propriétés :

Tableau VI: Les caractéristiques des amorces du gène *GAPDH*.

| | Amorces (5' → 3') | Tm | Taille du produit |
|------------------|----------------------|-------|-------------------|
| <i>GAPDH</i> (F) | GAAGGTGAAGGTCGGAGTC | 60 °C | 226 pb |
| <i>GAPDH</i> (R) | GAAGATGGTGATGGGATTTC | | |

b. Protocole de PCR :

Le milieu réactionnel de la PCR est fixé à 20 µl préparé sous une hotte stérilisée par les Ultraviolet (UV), ensuite sera l'ajout de 2 µl de l'ADN (conserver à -20°C) sous une autre hotte pour éviter une contamination des produits. La PCR est réalisée dans un volume réactionnel final de 22 µl, dont les différents composants sont présentés dans la partie annexe

(annexe 2). Pour chaque PCR, un contrôle négatif est inclus, il contient de l'eau DNAae, RNAase free.

L'étape suivante consiste sur la mise des tubes dans un thermocycleur Gene Amp PCR System 9700 de la compagnie Applied Biosystems. L'amplification des amorces se réalise dans un température d'hybridation spécifique à chaque couple d'amorces, selon le programme suivant (Tableau VII) :

Tableau VII: le programme du thermocycleur pour l'amplification du gène *GAPDH*.

| Cycle / Etapes | | Températures (°C) |
|-----------------------------------|----------------------------|-------------------|
| Dénaturation initiale (2 minutes) | | 95 |
| 40 Cycles | Dénaturation (30 secondes) | 94 |
| | Hybridation (30 secondes) | 60 |
| | Elongation (30 secondes) | 72 |
| Elongation finale (7 minutes) | | 72 |
| Conservation (∞) | | +4 |

3. Migration sur gel d'électrophorèse :

L'électrophorèse est une étape essentielle pour visualiser les résultats de la PCR et pour vérifier la qualité du produit de PCR obtenu. Il s'agit de migrer les produits PCR sur gel d'agarose de 2% (2g/100 ml de Tris-Borate-EDTA (TBE) 0,5X),(annexe 3).

4. L'analyse mutationnel du promoteur du gène *VEGF*

a. Amplification par PCR

Pour étudier le statut mutationnel du promoteur du gène *VEGF*, on a procédé à une amplification par PCR avec des amorces spécifiques, suivie du séquençage sanger et de l'analyse bio-informatique pour tous les 70 patients inclus dans notre étude.

Les séquences nucléotidiques des amorces utilisées ainsi que la taille des amplicons (en pb) sont présentées dans le tableau suivant (tableau VII) :

Tableau VII : Les séquences nucléotidiques des amorces de *VEGF* et les tailles des amplicons.

| <i>VEGF</i> | Orientation | Séquence (5' → 3') | Tm | Taille de l'amplicon (pb) |
|-----------------|--------------|----------------------------|-------------|---------------------------|
| -2578C/A | Sens(F) | ATAAGGGCCTTAGGACACC | 60°C | 459 |
| | Anti-Sens(R) | GCTACTTCTCCAGGCTCAC | | |
| -460C/T | Sens(F) | TGTGCAGACGGCAGTCACT | 60°C | 588 |
| | Anti-Sens(R) | CCCGCTACCAGCCGACTTT | | |

L'amplification par PCR est réalisée par la préparation d'un mélange réactionnel dont les différentes compositions sont les mêmes décrites auparavant sur l'annexe 2. Après la préparation du mix réactionnel et l'ajout de l'ADN, on procède à une courte centrifugation des tubes. L'étape suivante consiste à placer les tubes au thermocycleur « Gene Amp PCR System 9700 » de la compagnie « Applied Biosystems », L'amplification de la région promotrice du gène *VEGF* s'effectue selon le programme illustré sur le tableau VIII. Après l'amplification, une migration des produits PCR sur gel d'agarose de 2% est réalisée selon les étapes décrites précédemment.

Tableau VIII : Le programme du thermocycleur avec les différentes températures.

| Cycle / Etapes | | Température(°C) | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------|----------------|
| | | -2578C/A | -460C/T |
| 40 cycles | Dénaturation (30 secondes) | 94 °C | |
| | Hybridation (30 secondes) | 60 °C | 60 °C |
| | Elongation (30 secondes) | 72 °C | |
| Elongation finale (7 minutes) | | 72 °C | |
| Conservation (∞) | | +4 °C | |

b. Migration sur gel

La migration d'ADN est réalisée sur un gel d'agarose de 2%, selon le protocole décrit auparavant.

c. Purification des produits PCR

Les produits PCR positifs dont les bandes ont été révélés lors de la visualisation sous UV ; vont être dirigés vers l'étape de la purification pour éliminer l'excès d'amorces et des dNTPs non

utilisés durant l'amplification par PCR. La purification se réalise en utilisant un kit de purification « ExoSAP-IT » contenant l'enzyme exonucléase qui dégrade les nucléotides libres et une phosphatase alcaline (SAP). 1 µL de l'ExoSAP-IT est ajouté dans un tube contenant 6 µL de produits PCR positif, le mélange sera incubé dans un thermocycleur en deux temps :

- ❖ **37°C pendant 4 minutes** : la première incubation pour l'activation de l'enzyme qui dégrade les amorces et les nucléotides libres.
- ❖ **80°C pendant une minute** : la deuxième incubation permet d'inactiver l'enzyme l'EXOSAP-IT.

Les produits purifiés sont prêts d'entamer la réaction de séquence.

d. Réaction de séquence par le Kit BigDye Terminator® v3.1

La réaction de séquence utilisée se base sur le principe de la méthode de SANGER adaptée à la fluorescence. Cette séquence permet d'amplifier un seul brin en utilisant une seule amorce, soit sens ou anti-sens. Cette technique est caractérisée par l'émission de fluorescence après chaque incorporation de ddNTP (didésoxynucléotides triphosphates), afin d'arrêter l'allongement du brin d'ADN néosynthétisé. Les 4 ddNTPs étant marquées différemment par des fluorochromes (**T**=rouge ; **G**=noir ; **A**=vert ; **C**=bleu), les brins synthétisés porteront différentes tailles de produits de séquences marquées.

Le kit « BigDye Terminator® v3.1 cycle sequencing » fournit les composants réactifs nécessaires pour la réaction de séquence dans un mélange prêt. Pour cette réaction, un mélange réactionnel d'un volume final de 10 µL est préparé contenant les réactifs présentés sur le tableau IX.

Tableau IVIII: Les réactifs utilisés dans la réaction de séquence.

| Produits de la réaction de séquence | Volumes(Vf=10 µl) |
|--|--------------------------|
| Eau distillée stérile | 6.5 µl |
| Amorce(sens ou anti-sens) | 0.5 µl |
| Marqueur BigDye 3.1 | 1 µl |
| Produit PCR purifié | 2 µl |

Par la suite, ce mélange est dispatché dans des tubes PCR qui seront incubé au thermocycleur programmé selon le programme illustré dans le tableau X :

Tableau IX: Le programme du thermocycleur adopté lors de la réaction de séquençage.

| Cycle / Etapes | | Températures (°C) |
|-----------------------------------|----------------------------|-------------------|
| Dénaturation initiale (1 minutes) | | 96 |
| 25 Cycles | Dénaturation (10 secondes) | 96 |
| | Hybridation (5 secondes) | 50 |
| | Elongation (4 minutes) | 60 |
| Elongation finale (5 minutes) | | 60 |
| Conservation (∞) | | +4 |

e. Purification de la réaction de séquence par méthode éthanol-EDTA

Une fois la réaction de séquençage du cycle est terminée, on procède à l'étape de purification des produits de séquence purifiés en utilisant la méthode d'éthanol-EDTA qui sert à éliminer les amorces en excès et les ddNTPs non incorporés (annexe 4).

f. Séquençage

Le séquençage des échantillons est effectué par l'Analyseur Génétique 3130XL (à 16 capillaires), à la Plateforme de Biologie Moléculaire et de Génomique Fonctionnelle au CNRST. Au cours de cette électrophorèse capillaire, la migration des fragments d'ADN purifiés va migrer selon leurs tailles. Au cours de cette migration un système de détection émettant un faisceau de laser, ce passage provoque une libération des photons en se traduisant par la fluorescence des fluorophores fixés aux dNTPs. Cette fluorescence va être transmise à une cellule photoélectrique et se transforme en données informatiques visualisées sous-forme d'électrophorégramme à l'aide du logiciel (Sequencing analysis version 5.4).

g. Analyse bio-informatique et interprétation des résultats

Les séquences de région promotrice du gène *VEGF* sont obtenue sous forme FASTA à partir du logiciel Sequencing Analysis, seront comparées aux séquences de référence existant dans la base de données de la banque des gènes (Human RefSeq-Gene) à NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), l'alignement des séquences est réalisé en utilisant le programme Clustal W (Clustal W multiple alignment) intégré dans le logiciel BioEdit séquence Alignment Editor. Ce logiciel facilite l'analyse des séquences et permet de détecter les mutations ponctuelles possibles ainsi que leur position dans la région promotrice étudiée.

Après l'alignement, nous avons procédé par un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) qui est un outil bio-informatique qui aide de trouver les régions similaires entre notre séquence et les séquences existantes dans la base de données de la banque des gènes (RefSeq-Gene) à NCBI.

h. Analyse statistique

L'analyse statistique de notre étude a été réalisée par logiciel « SPSS v.23 », les résultats sont considérés significatifs lorsque la valeur de la probabilité p (valeur- p) est inférieure ou égale à 0.05 ($p \leq 0.05$) selon le test de Khi-deux, en utilisant pour étudier l'association de prévalence des mutations avec les données cliniques des patients.



Résultats et Discussion

B. Résultats et Discussion

I. Résultats

1. Résultats anatomopathologiques.

Selon les critères recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour l'évaluation du grade tumoral, les 70 tumeurs de notre cohorte sont classées comme suite (figure 17) :

- ❖ 27(39%) tumeurs sont de bas grade.
- ❖ 43 (61%) tumeurs sont de haut grade.

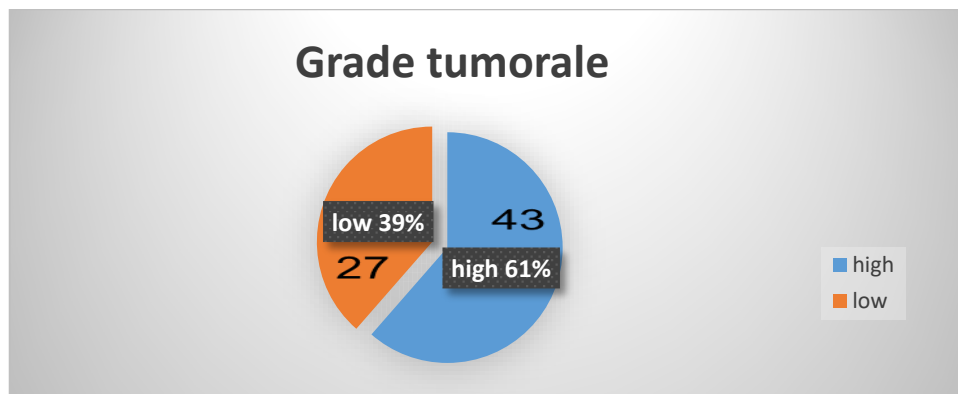


Figure 17: Distribution des patients selon le grade tumoral

L'évaluation du stade des tumeurs ont été réalisé en adoptant les orientation TNM (graphique 18) :

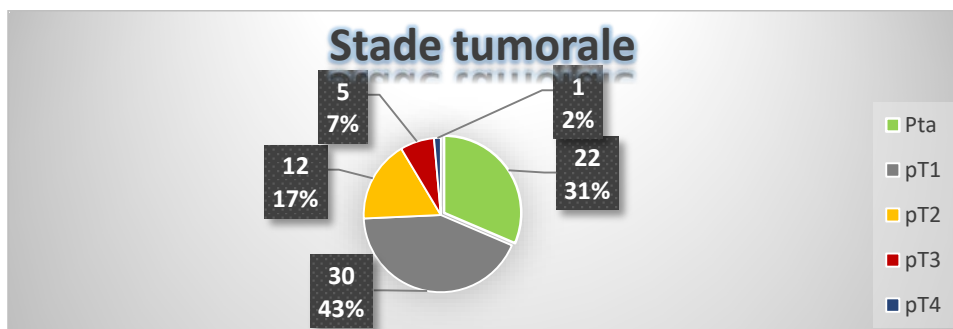
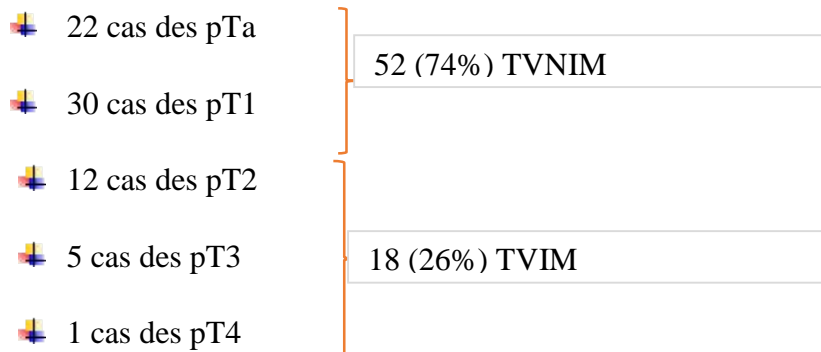


Figure 18: Distribution des patients selon le stade tumoral

2. Résultats du suivi des patients

Le récidive et la progression concernent uniquement les TVNIM, dans notre cohorte, 12/52 des cas (23%) ont récidivé et 5/52 (9.61%) ont progressé vers les tumeurs infiltrant de muscle (figure 19 et 20).

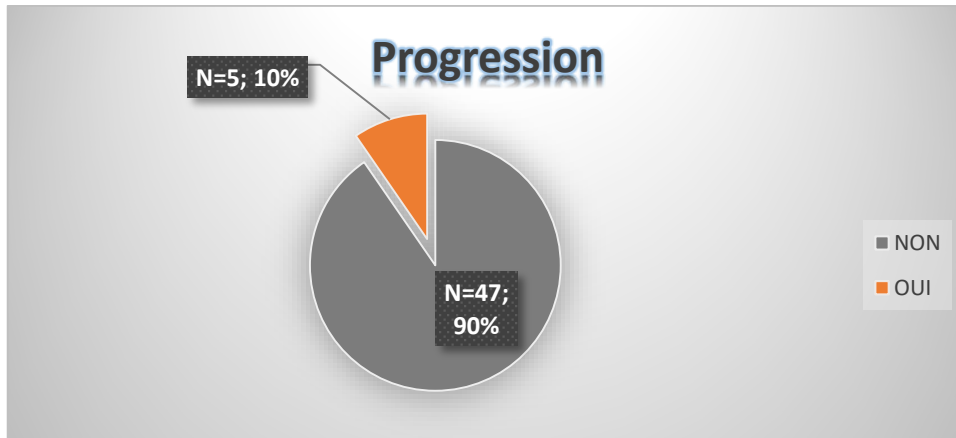


Figure 19: Résultats du suivi des patients pour la progression.

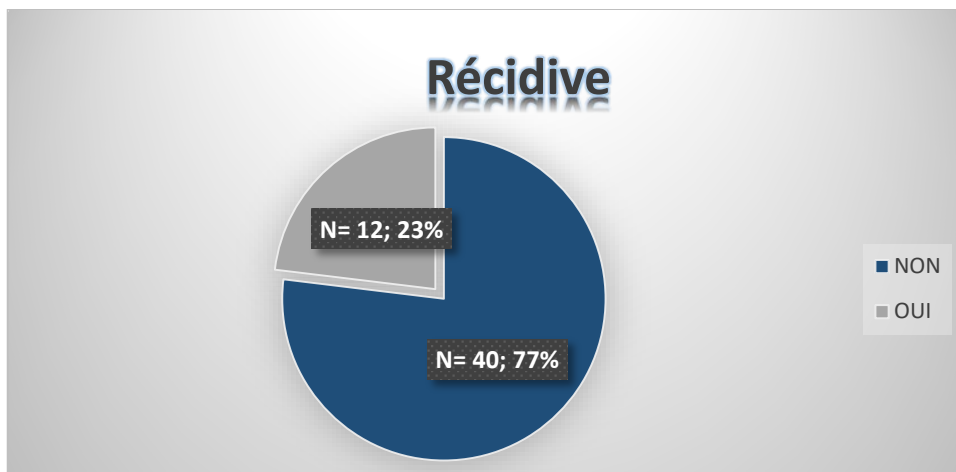


Figure 20: Résultats du suivi des patients pour la récidive.

3. Dosage d'ADN extrait

L'extraction de l'ADN total à apporter des concentrations qui varient de 100 à 3265 ng/ μ l avec prise en considération des ratios de l'absorbance 260/280 et 260/230, la qualité de l'ADN de nos études est de bonne qualité et absolument acceptable pour la réalisation de la PCR (figure 21).

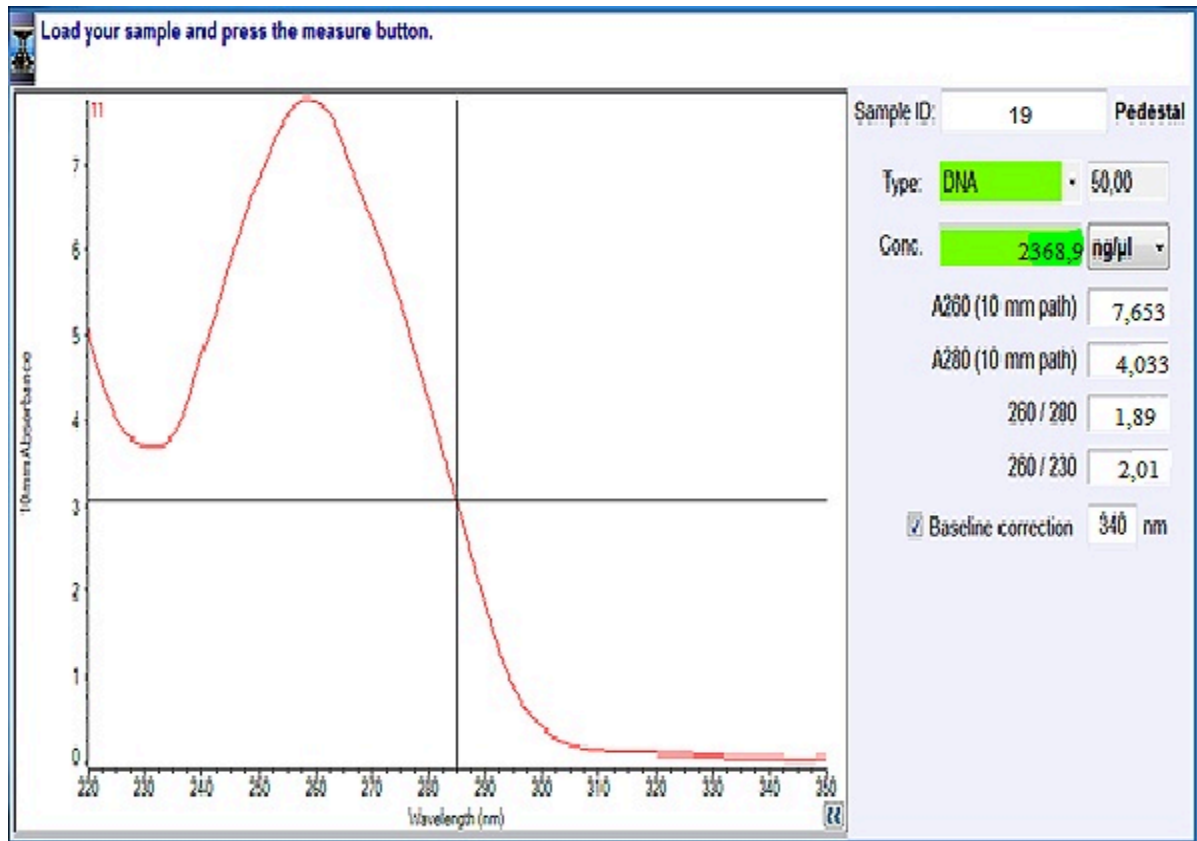


Figure 21: Exemple d'un résultat de dosage d'ADNg dans un échantillon.

4. Résultats du test de qualité d'ADN par amplification du gène *GAPDH*

Résultats de l'amplification du gène *GAPDH* dans l'un des échantillons de 70 patients a montré une bande de 226pb sur le gel d'électrophorèse avec poids moléculaire de 1000pb. Ce qui montre la bonne qualité de l'ADN et la validité pour les manipulations. Un exemple de résultat de l'électrophorèse de PCR *GAPDH* est sur la figure 22 :



Figure 22: Exemple de Résultat d'électrophorèse pour amplification du gène *GAPDH* (CN : contrôle négatif, MT : marqueur de taille 100 pb).

5. Résultats de l'étude des mutations du gène *VEGF* (-460 C/T, -2578 C/A)

a) Résultat d'amplification par PCR de l'exon -460 C/T, -2578 C/A du gène *VEGF*

L'amplification de l'ADN des 70 cas de notre cohorte a généré des amplicants de bonne qualité de deux tailles différents ; 459 pb et 588 pb au niveau de deux différentes positions du promoteur du gène *VEGF*. Un exemple de résultat d'électrophorèse des produits PCR de la région promotrice du gène *VEGF* présentés sur la figure 23.

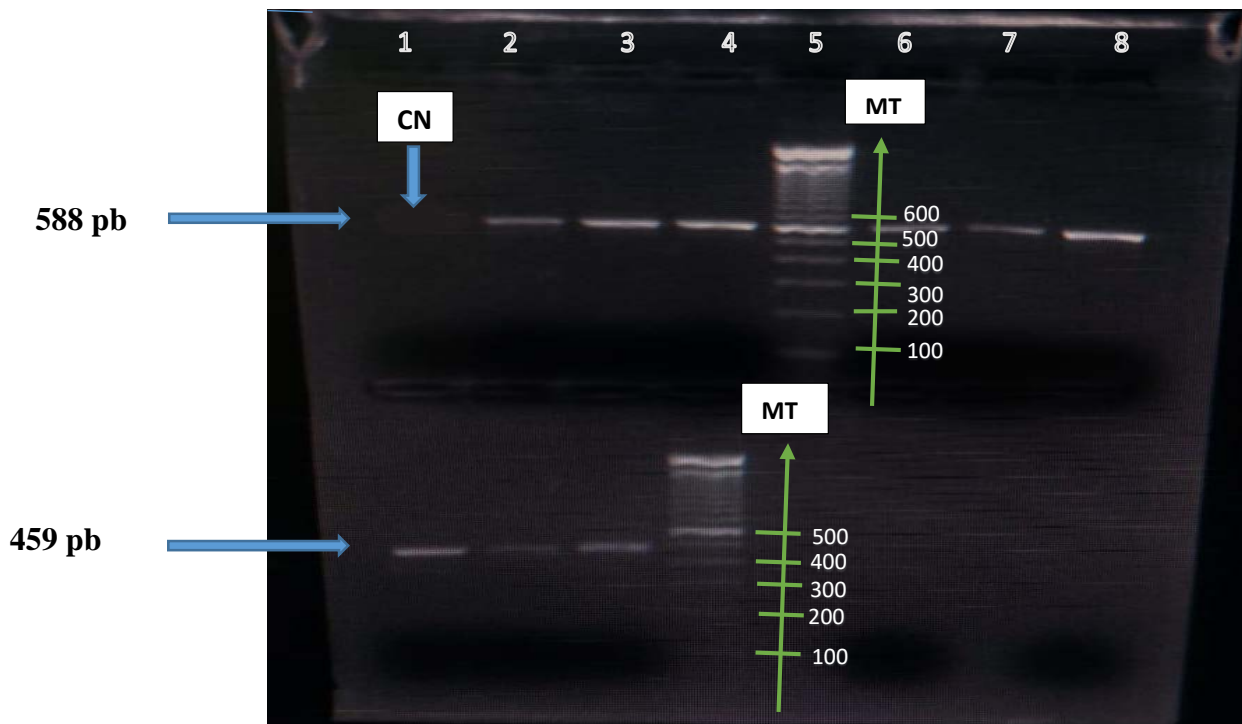


Figure 23: Exemple de Résultat d'électrophorèse pour amplification du gène *VEGF* (CN : contrôle négatif, MT : marqueur de taille 100 pb).

b) Résultats de séquençage

Les séquences obtenues sont visualisées par le logiciel Sequencing Analysis version 5.4 sous forme des pics d'électrophorégrammes (figure 20). Au totale, Des séquences de bonne qualité de toute notre cohorte ont été générée et soumis à l'analyse du statut mutationnel. Un exemple d'électrophorégramme du gène *VEGF* présenté sur la figure ci-dessous (figure 20).

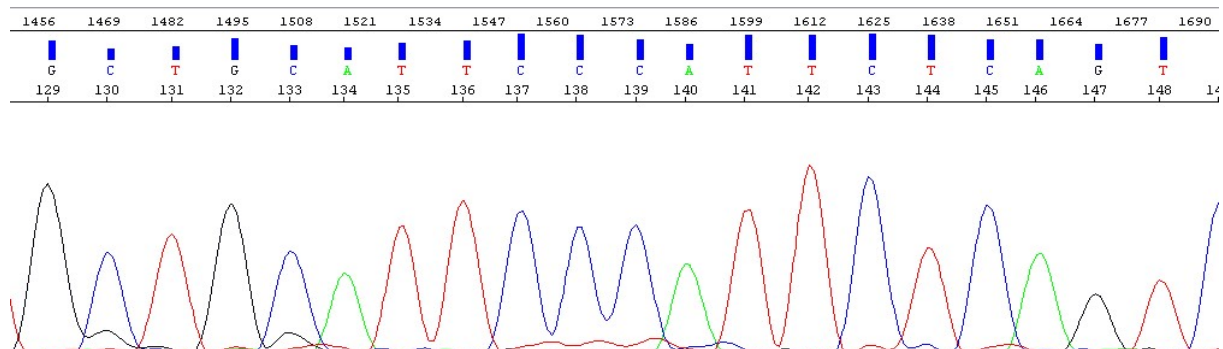


Figure 24: Exemple d'un électrophorégramme du *VEGF* du patient 9.

Il permet ce logiciel d'obtenir la Séquence Nucléotidique en Format Texte FASTA, qui sera utiliser dans alignement avec la séquence de référence (Human RefSeq-gene) par l'outil BLAST présenter dans la base de donnée NCBI.

c)Analyse du statut mutationnel du promoteur du gène *VEGF*

1. Polymorphisme -460C/T :

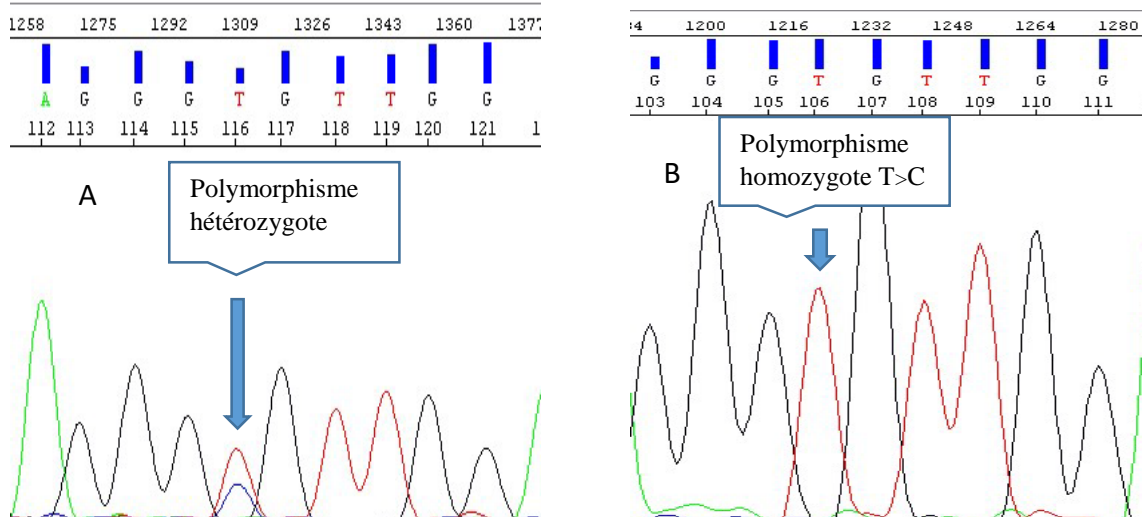


Figure 25 : exemple d'un électrophorégramme obtenu par séquençage de la région promotrice du gène *VEGF* du patient 35(A) et 34(B) , montrant le polymorphisme hétérozygote.

Concernant polymorphisme -460C/T, on distingue deux profils dans l'ensemble de notre cohorte, polymorphisme hétérozygote qui correspond à superposition de deux pics et polymorphisme homozygote correspond à polymorphisme homozygote (figure 25).

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--|--------------|------------|-----------|
| 883 bits(478) | 0.0 | 509/522(98%) | 10/522(1%) | Plus/Plus |
| Query 18 | AGCTGGGTG-ATGGAGCGAGCAGCGTCTTCGAGAGTGAGGACgtgtgtgtctgtgtgggt | 76 | | |
| Sbjct 4445 | AGCTGGGTGAATGGAGCGAGCAGCGTCTTCGAGAGTGAGGACGTGTGTGTCTGTGTGGGT | 4504 | | |
| Query 77 | gagtgagtgtgtgctgtgtggggtgagggtgtTGGAGCGGGGAGAAGGCCAGGGGTCACT | 136 | | |
| Sbjct 4505 | GAGTGAGTGTGTGCGTGTGGGTTGAGGCGTTGGAGCGGGGAGAAGGCCAGGGGTCACT | 4564 | | |

Figure 26: résultat du BLAST de la séquence d'échantillon 34, montrant le polymorphisme homozygote (C en T) sur la région promotrice du gène *VEGF*

Selon BLAST, on a révélé une substitution de A en C qui correspond aux polymorphisme -2578C/A et une délétion de 18 pb qui correspond au polymorphisme -2549I/DI(figure 30).

2. Polymorphisme -2578C/A

Concernant polymorphisme -2578C/A, on distingue deux profils dans l'ensemble de notre cohorte, polymorphisme hétérozygote qui correspond à superposition de deux pics et polymorphisme homozygote correspond à polymorphisme homozygote (figure 27).

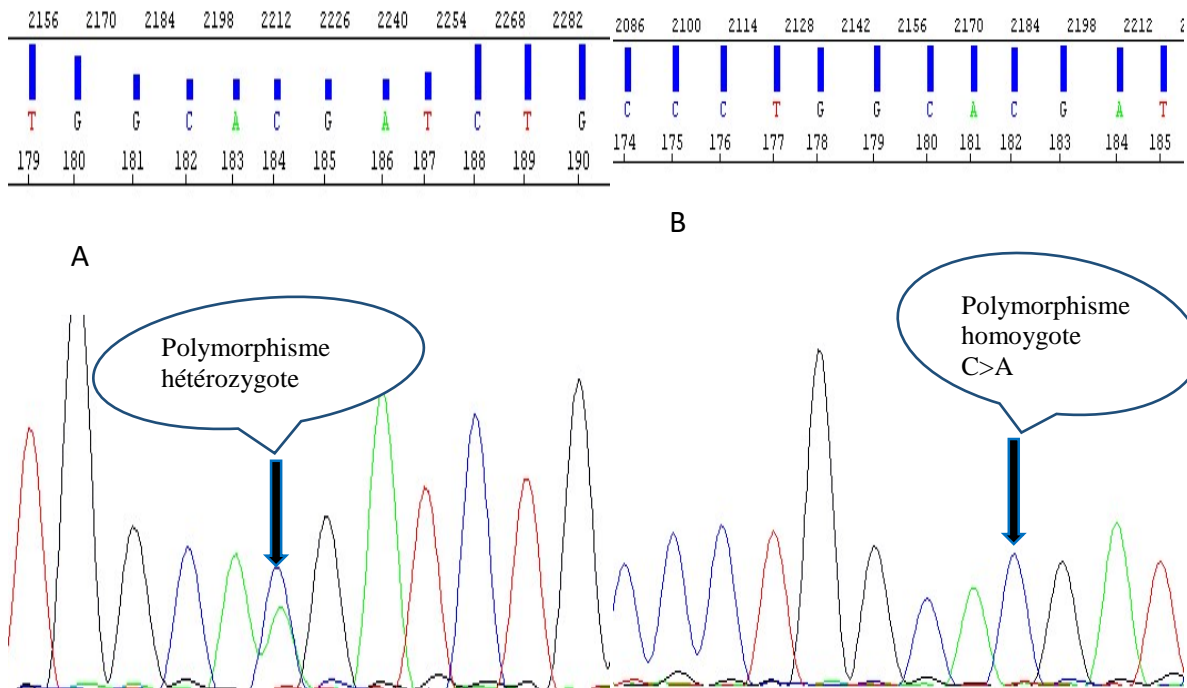


Figure 27: exemple d'un électrophorégramme obtenu par séquençage de la région promotrice du gène VEGF du patient 1(A) et patients 50(B).

Selon BLAST, on a révélé une substitution de A en C qui correspond aux polymorphisme -2578C/A et une délétion de 18 pb qui correspond au polymorphisme -2549I/DI(figure 28).

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|---|--------------|------------|-----------|
| 658 bits(356) | 0.0 | 415/439(95%) | 22/439(5%) | Plus/Plus |
| Query 3 | CTGGGGCGTA-TGGGGAGGT-ACCTAGCACCTCCACCAAACCACAGCAACATGTGCTGAG | 60 | | |
| Sbjct 3257 | CTGGGG-GTACTGGGGAGGTAACCTAGCACCTCCACCAAACCACAGCAACATGTGCTGAG | 3315 | | |
| Query 61 | GATGGGGCTGACTAGGTAAGCTCCCTGGAGCGTTTTGGTTAAATTGAGGGAAATTGCTGC | 120 | | |
| Sbjct 3316 | GATGGGGCTGACTAGGTAAGCTCCCTGGAGCGTTTTGGTTAAATTGAGGGAAATTGCTGC | 3375 | | |
| Query 121 | ATTCCCATTTCTCAGTCCATGCCTCCACAGAGGCTAGGCTAGGCCAGACCCCTGGC | 180 | | |
| Sbjct 3376 | ATTCCCATTTCTCAGTCCATGCCTCCACAGAGGCTAGGCTAGGCCAGACCCCTGGC | 3435 | | |
| Query 181 | ACGATCTGGGTGGATAAATCAGACTGACTGGCCTCAGAGCCCC | 222 | | |
| Sbjct 3436 | AAAGATCTGGGTGGATAAATCAGACTGACTGGTCCCCTCTTCCCACAGGCCTCAGAGCCCC | 3495 | | |
| Query 223 | AACTTTGTTCCCTGGGGCAGCCTGGAAATAGCCAGGTGAGAAACCAGCCAGGAATTTTTC | 282 | | |
| Sbjct 3496 | AACTTTGTTCCCTGGGGCAGCCTGGAAATAGCCAGGTGAGAAACCAGCTAGGAATTTTTC | 3555 | | |

Figure 28 : Résultat du BLAST de la séquence d'échantillon 50, montrant le changement du A en C et la délétion de 18pb sur la région promotrice du gène VEGF.

6. Résultats d'analyse des séquences du gène *VEGF* :

Le polymorphisme -460C/T est composé de trois génotypes : Sauvage (CC), hétérozygote (CT) et homozygote (TT), parmi ces trois génotypes, le sauvage est le plus fréquent dans notre cohorte, avec une fréquence de 52% (36/70) suivi des génotypes homozygotes (TT) et hétérozygotes (CT) avec des fréquences de 27% (19/70) et 21% (15/70) respectivement. Concernant, le génotype le plus fréquent du polymorphisme C2578A est hétérozygotes (CA) avec une fréquence de 41.5% (29/70) suivi des génotypes homozygotes (CC) et sauvage (AA) avec des fréquences de 28.5% (20/70) et 30% (21/70) respectivement. Par rapport au polymorphisme -2549 I/D, il représente des fréquences presque similaires des génotypes I/I, D/D (32.9%), (31.5%) respectivement et le génotype I/D présente chez 25/70 cas avec une fréquence de (35.7%) (Tableau XI).

Tableau X: Distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme VEGF 460C/ T , 2578A/C et 2549 I/D dans la population étudié.

| Genotypes | VEGF -460C/T | | Genotypes | VEGF -2578A/C | | Genotypes | VEGF -2549 I/D | |
|------------|--------------|----|------------|---------------|------|------------|----------------|------|
| | N=70 | % | | N | % | | N=70 | % |
| T/T | 19 | 27 | C/C | 20 | 28.5 | I/I | 23 | 32.9 |
| T/C | 15 | 21 | C/A | 29 | 41.5 | I/D | 25 | 35.7 |
| C/C | 36 | 52 | A/A | 21 | 30 | D/D | 22 | 31.4 |

7. Association entre le statut mutationnel du promoteur du gène *VEGF* et les données cliniques des patients :

Les résultats d'association entre les paramètres cliniques des patients contenant l'âge, le sexe, le tabagisme, le stade, le grade et les polymorphismes -460 C/T, -2578 A/C et -2549 I/D sont résumé dans les trois tableaux ci-dessous.

Le polymorphisme -460T/C (les génotypes TT et TC) a été observé plus chez les patients non fumeurs (57.1% ; 24/42) par rapport aux patients fumeurs (35.7 % 10;/28). Une association significative a été trouvé entre le tabagisme et le polymorphisme -460T/C du gène *VEGF* (p value=0.02<0.05). Pour la distribution de fréquence selon le grade, le polymorphisme -460T/C a été trouvé dans 38.57% (27/70) des tumeurs de bas grade et 61.42% (43/70) des tumeurs à haut grade. Concernant le stade tumoral, la distribution du polymorphisme T460C (les génotypes TT et TC) était presque similaire entre les TVNIM (48% ; 25/52) et les TVIM (50% ; 9/18). Par contre, concernant le grade tumoral, le polymorphisme T460C a été plus

détecté au niveau des tumeurs de vessie de bas grade (70% ; 19/27) par rapport aux tumeurs de haut grade (50% ; 22/43). L'analyse statistique n'a révélé aucune corrélation entre la présence du polymorphisme 460C/T et le stade/ grade tumoraux ($p=0.885 >0.05$ et $p=0.584 >0.05$; respectivement) (Tableau XII).

Tableau XII: Association entre le polymorphisme -460C/T et les données des patients.

| | N | Genotype | | | | Allele | | |
|------------------|----|--------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|--------------|
| | | VEGF -460C/T | | | | | | |
| | | TT(%) | TC (%) | CC (%) | <i>p</i> | T (%) | C (%) | <i>p</i> |
| Genre | | | | | | | | |
| Femme | 2 | 1(50) | 1(50) | 0(0) | 0.140 | 3(2.14) | 1(0.71) | 0.120 |
| Homme | 68 | 41 (64) | 16 (25) | 7 (11) | | 53(37.85) | 83(59.28) | |
| Age | | | | | | | | |
| ≤ 50 | 1 | 0 | 0 (0) | 1(100) | 0.949 | 2(1.42) | 0 | 0.517 |
| 50-70 | 44 | 12(27.2) | 9(20.45) | 23(52.27) | | 33(23.57) | 55(39.28) | |
| >70 | 25 | 8(32) | 7(28) | 10(40) | | 19(13.57) | 31(22.14) | |
| Tabagisme | | | | | | | | |
| Oui | 28 | 2(7.14) | 8(28.57) | 18(64.28) | 0.02 | 12(8.57) | 44(31.41) | 0.01 |
| Non | 42 | 17(40.47) | 7(16.66) | 18(42.85) | | 41(29.28) | 43(30.71) | |
| Stade | | | | | | | | |
| ≤ Pt1 | 52 | 16(30.76) | 9(17.30) | 27(51.92) | 0.888 | 41(29.28) | 63(45) | 0.516 |
| > Pt1 | 18 | 5(27.77) | 4(22.22) | 9(50) | | 12(8.57) | 24(17.14) | |
| Grade | | | | | | | | |
| Bas | 27 | 15(55.55) | 4(14.81) | 7(25.92) | 0.584 | 19(13.57) | 35(25) | 0.606 |
| Haut | 43 | 12(27.9) | 10(23.25) | 21(48.83) | | 34(24.28) | 52(37.14) | |

La distribution des polymorphismes -2578 C/A et -2549 I/D était plus fréquente chez les TVNIMs avec des fréquences de (71% ; 37/52) et (71.1% ; 37/52) respectivement par rapport aux TVIMs avec des fréquences de (61% ; 11/18) et (55.5% ; 10/18) respectivement.

Concernant le grade tumoral, les polymorphismes -2578 C/A et -2549 I/D ont été détecté avec de haute fréquence au niveau des tumeurs de bas grade (77% ; 21/27 et 77% ; 21/27 respectivement) par rapport aux tumeurs de haut grade (62.8% ; 27/43 et 60% ; 26/43 respectivement).

L'analyse statistique n'a révélé aucune corrélation significative entre les deux polymorphismes (C2578A, -2549I/D) et les données cliniques des patients : l'âge, sexe, tabagisme, grade et stade tumoral. (Tableau XIII, XIV).

Tableau XIII: Tableau d'association entre le polymorphisme -2578C/A et les données des patients.

| | N | Genotype | | | | Allele | | |
|------------------|----|---------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|--------------|
| | | VEGF -2578C/A | | | | | | |
| | | CC (%) | CA (%) | AA (%) | <i>p</i> | C (%) | A (%) | <i>p</i> |
| Genre | | | | | | | | |
| Femme | 2 | 0 (0) | 1 (50) | 1(50) | 0.606 | 1(0.71) | 3(2.14) | 0.339 |
| Homme | 68 | 20 (29.41) | 27(39.7) | 21 (30.8) | | 66(47.14) | 70(50) | |
| Age | | | | | | | | |
| ≤ 50 | 1 | 0 (0) | 0 (0) | 1(100) | 0.456 | 0(0) | 2(1.42) | 0.73 |
| 50-70 | 44 | 11(27.2) | 21(20.45) | 12(52.27) | | 22(16) | 34(24.28) | |
| >70 | 25 | 9(36) | 7(28) | 9(36) | | 1(0.71) | 3(2.14) | |
| Tabagisme | | | | | | | | |
| Oui | 28 | 5(17.85) | 12(42.85) | 11(39.28) | 0.527 | 22(16) | 34(24.28) | 0.73 |
| Non | 42 | 15(35.71) | 16(38) | 11(26.2) | | 46(32.85) | 38(27.14) | |
| Stade | | | | | | | | |
| ≤ Pt1 | 52 | 17(32.69) | 20(38.46) | 15(28.84) | 0.527 | 54(38.57) | 51(36.42) | 0.177 |
| > Pt1 | 18 | 3(16.66) | 8(44.44) | 7(38.88) | | 54(38.57) | 51(36.42) | |
| Grade | | | | | | | | |
| Bas | 27 | 9(33.33) | 12(44.44) | 6(22.22) | 0.328 | 30(21.42) | 24(17.14) | 0.190 |
| Haut | 43 | 11(25.58) | 16(37.2) | 16(37.2) | | 38(27.14) | 48(34.18) | |

Tableau XIII : Association entre le polymorphisme VEGF -2549 I/D et les données démographiques et anatomopathologique

| | N | Genotype | | | | Allele | | |
|------------------|----|----------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|--------------|
| | | VEGF -2549 I/D | | | | | | |
| | | II (%) | ID (%) | DD (%) | <i>p</i> | I (%) | D (%) | <i>p</i> |
| Genre | | | | | | | | |
| Femme | 2 | 1(50) | 1(50) | 0(0) | 0.600 | 4(2.85) | 0(0) | 0.170 |
| Homme | 68 | 22(32.35) | 24(35.29) | 22(32.35) | | 92(65.71) | 44(30.98) | |
| Age | | | | | | | | |
| ≤ 50 | 1 | 1(100) | 0(0) | 0(0) | 0.648 | 2(1.42) | 0(0) | 0.172 |
| 50-70 | 44 | 12(27.27) | 19(43.18) | 13(29.54) | | 61(43.57) | 28(20) | |
| >70 | 25 | 10(40) | 6(24) | 9(36) | | 31(22.14) | 18(12.85) | |
| Tabagisme | | | | | | | | |
| Oui | 28 | 11(39.28) | 11(39.28) | 6(21.42) | 0.350 | 45(32.14) | 12(8.57) | 0.37 |
| Non | 42 | 12(28.57) | 14(33.33) | 16(38.09) | | 51(36.42) | 32(22.85) | |
| Stade | | | | | | | | |
| ≤ Pt1 | 52 | 15(28.84) | 18(34.61) | 19(36.53) | 0.225 | 66(47.14) | 38(27.14) | 0.60 |
| > Pt1 | 18 | 8(44.44) | 7(38.88) | 3(16.66) | | 30(21.42) | 6(4.28) | |
| Grade | | | | | | | | |
| Bas | 27 | 6(22.22) | 10(37.03) | 11(40.74) | 0.492 | 32(22.85) | 22(15.71) | 0.27 |
| Haut | 43 | 17(39.53) | 15(34.88) | 11(25.58) | | 65(46.42) | 21(15) | |

La récurrence et la progression tumorale ont été étudiées chez les cas ayant des tumeurs non infiltrant le muscle (52/70). 23% (12/52) des cas ont récuré et uniquement 9.6% (5/52) ont progressé vers des tumeurs de stade avancé. Les polymorphismes -460 C/T, -2578 C/A et -2549 I/D ont été plus chez les patients qui n'ont pas récidivé (52% ; 21/40, 72.5% ; 29/40 et 72.5% ; 29/40 respectivement) par rapport aux patients qui ont récidivé (33% ; 4/12, 66% ; 8/12 et 66% ; 8/12 respectivement). Selon l'analyse statistique, il n'existe aucune association significative entre la récurrence/progression et les trois polymorphismes détectés au niveau du promoteur du gène *VEGF* (-2578C/A, -460C/T et -2579I/D) (Tableau XV-XVII).

Tableau XIV: Corrélation du polymorphisme -460 C /T avec la récurrence et la progression.

| | N=52 | Genotype | | | Allele | | | |
|-------------------|------|-------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|--------------|
| | | VEGF 460C/T | | | | | | |
| | | TT(%) | TC(%) | CC(%) | <i>p</i> | C (%) | T (%) | <i>p</i> |
| Recidive | | | | | | | | |
| OUI | 12 | 3 (25) | 1 (8.3) | 8(66.66) | 0.244 | 17(16.34) | 7(6.7) | 0.241 |
| NON | 40 | 13 (32.5) | 8 (20) | 19(47.5) | | 46(47.14) | 34(50) | |
| Regression | | | | | | | | |
| OUI | 5 | 1 (20) | 2 (40) | 2(40) | 0.575 | 6(5.76) | 4(3.84) | 0.969 |
| NON | 47 | 7(17.89) | 15(31.91) | 25(53.19) | | 58(55.7) | 36 (34.6) | |

Tableau XV: Corrélation du polymorphisme -2578C/A avec la récurrence et la progression

| | N=52 | Genotype | | | Allele | | | |
|--------------------|------|---------------|-----------|------------|--------------|-----------|-----------|--------------|
| | | VEGF -2578C/A | | | | | | |
| | | CC(%) | CA(%) | AA(%) | <i>p</i> | C (%) | A (%) | <i>p</i> |
| Recidive | | | | | | | | |
| OUI | 12 | 4 (33.33) | 4 (33.33) | 4(33.33) | 0.189 | 12(11.53) | 12(11.53) | 0.830 |
| NON | 40 | 13 (32.5) | 16(40) | 11 (27.5) | | 42(40.38) | 38(36.53) | |
| Progression | | | | | | | | |
| OUI | 5 | 1 (20) | 3 (60) | 1(20) | 0.714 | 5(4.8) | 5(4.8) | 0.898 |
| NON | 47 | 16(34) | 17(36.17) | 14 (29.78) | | 49(47.11) | 45 (43.2) | |

Tableau XVIVII: Corrélation du polymorphisme -2549 I/D avec la récurrence et la progression.

| | N=52 | Genotype | | | Allele | | | |
|--------------------|------|----------------|-----------|-----------|--------------|-----------|------------|--------------|
| | | VEGF -2549 I/D | | | | | | |
| | | II(%) | ID(%) | DD(%) | <i>p</i> | I (%) | D (%) | <i>p</i> |
| Recidive | | | | | | | | |
| OUI | 12 | 4 (33.33) | 3 (25) | 5(41.66) | 0.733 | 14(13.46) | 10(9.61) | 0.631 |
| NON | 40 | 11 (27.5) | 15 (37.5) | 14(35) | | 52(50) | 28(26.92) | |
| Progression | | | | | | | | |
| OUI | 5 | 1 (20) | 1 (20) | 3(60) | 0.627 | 7(6.73) | 3(2.88) | 0.606 |
| NON | 47 | 14(29.78) | 15(31.91) | 18(38.29) | | 58(55.76) | 36 (34.61) | |

II. Discussion

Le CV est le 2^{ème} cancer génito-urinaire le plus fréquent dans le monde après le cancer de prostate[68]. Le CV est biologiquement très hétérogène en englobant des profils génétiques très variables qui se caractérisent par plusieurs sous-types moléculaires.

Actuellement, le diagnostic du CV repose principalement sur deux tests de référence qui sont la cytologie urinaire et la cystoscopie, qui se caractérisent malheureusement par un manque de la sensibilité dans certaines tumeurs vésicales.

C'est dans cette esprit de classification moléculaire s'installe la mise en point d'un alternatif plus efficace tels que les biomarqueurs tumoraux qui permettront d'améliorer de façon ciblée, spécifique et non invasive la détection et le suivi des patients atteint de cancers de la vessie.

L'objectif de notre étude est d'identifier des biomarqueurs moléculaires impliqués dans la prise en charge du cancer de la vessie au Maroc.

Il est bien connu que les tumeurs libèrent des facteurs pro-angiogénique pour la croissance tumorale en fournissant leur besoin de nutriment et de l'oxygène afin de développer des métastases au niveau des organes voisins de la tumeur primaire. Ceci est réalisé par l'implication d'une cascade de signalisation et par l'activation de différent gènes responsables de différentes fonctions. Dans cet esprit que s'inscrit notre étude menée sur 70 patients Marocains atteints de cancer de la vessie afin d'évaluer le statut mutationnel du gène *VEGF* impliqué dans l'angiogenèse tumorale et d'identifier la corrélation entre les polymorphismes détectés au niveau de sa région promotrice avec les données anatomopathologiques des tumeurs vésicales au Maroc.

L'évaluation du statut mutationnel du promoteur du gène *VEGF* a révélé la présence de trois types de polymorphismes *-460 C/T*, *-2578 C/A* et *-2549 I/D* avec de différentes fréquences 48%, 70% et 67.1% respectivement. Ces résultats reflètent l'implication des polymorphismes du gène *VEGF* dans le cancer de la vessie chez la population Marocaine. Ces derniers sont en concordance avec d'autres études qui ont détecté la présence de différents polymorphismes du gène *VEGF* (parmi eux *-460 C/T* et *-2578 C/A*) dans le cancer de la vessie chez de différente populations.

Concernant le polymorphisme *-460 C/T*, les analyses statistiques ont révélé une corrélation significative entre ce dernier et le tabagisme ($p=0.02 < 0.05$). Ceci a été détecté également dans d'autres types de cancer tel que : l'adénocarcinome œsophagien [69] et le cancer de prostate [70].

Le polymorphisme -460 C/T a été équitablement distribué au niveau des TVNIM et les TVIM dans notre cohorte et donc aucune corrélation significative entre ce dernier et le stade tumoral n'a été détecté.

Le polymorphisme -2578C/A était plus fréquent au niveau à des tumeurs de haut grade et non infiltrantes le muscle, par contre aucune corrélation significative entre le polymorphisme -2578C/A et le grade/stade tumoraux n'a été détecté. Ces résultats sont en concordance avec l'étude de Ben Wafi et al. réalisée sur la population tunisienne[71]. Cependant, dans une étude ultérieure de Kim et al. une corrélation significative entre le polymorphisme -2578C/A et le grade histologique a été trouvé ($p=0.015<0.05$) [72]. De plus, un méta analyse a déterminé une corrélation significative entre le polymorphisme -2578C/A et le stade tumoral ($p=0.021<0.05$)[73]. Concernant la récurrence et la progression tumorale, nos résultats sont en accord avec l'étude de Kim et al. , qui n'a montré aucune corrélation significative entre le polymorphisme -2578C/A et la récurrence ainsi que la progression tumorale ($p= 0.830$ et 0.898 respectivement)[72] .

Le polymorphisme -2549I/D a été détecté plus fréquemment au niveau des TVNIMs par rapport aux TVIMs, par contre sa distribution était presque similaire entre les tumeurs de bas et de haut grade. Selon l'étude statistique, aucune corrélation significative n'a été détecté entre le polymorphisme -2549 I/D et les données démographiques et clinicopathologiques, Ces résultats sont est en concordance avec les résultats portés dans une étude ultérieure sur des patients atteints de cancers de la vessie chez la population de nord indien[68], qui n'ont identifié aucune corrélation significative entre le polymorphisme (2549I/D) et le stade, le grade ainsi que la progression tumorale.

Le lien d'un déséquilibre de liaison entre les polymorphismes -2549 I/D (rs35569394) et -2578 A/C (rs699947) a été révélé dans une étude ultérieure sur la maladie d'Alzheimer, où ils ont constaté que les individus avec l'allèle rs699947-A présentent une insertion de 18 pb (rs35569394-I), tandis que ceux avec l'allèle rs699947-C présentent une délétion (rs35569394-D). Ceci est corrélative avec nos résultats sur les patients atteints du cancer de la vessie ; le génotype homozygote CC du polymorphisme rs699947 a été détecté en parallèle avec une délétion au niveau du polymorphisme rs35569394 chez les mêmes patients, ainsi que le génotype hétérozygote CA du polymorphisme rs699947, a été détecté chez les patients ayant une insertion du polymorphisme rs35569394. Notre étude indique que le polymorphisme

rs35569394 est associé à la présence du polymorphisme -2578 C/A et au risque du cancer de la vessie [74] .

Le statut mutationnel du gène *VEGF* pourrait être un biomarqueur important dans le cancer de la vessie et pourrait avoir un intérêt dans le traitement et la prise en charge thérapeutique. Des études ultérieures sur des cohortes plus larges sont nécessaires pour confirmer ces résultats et développer des alternatives majeurs servant dans l'amélioration de la prise en charge du cancer de la vessie.

Conclusion et perspectives

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet global visant à approvisionner au patient Marocain atteint du cancer de la vessie, des outils de diagnostics et thérapeutiques plus efficace et non invasifs. A travers cette étude, nous avons identifié l'implication de différents polymorphismes (-460 C/T, -2578 C/A et -2549 I/D) du promoteur du gène *VEGF* dans le cancer de la vessie. Une corrélation significative a été détecté entre le polymorphisme -460 C/T et le tabagisme. Cependant aucune corrélation significative entre les polymorphismes identifiés dans notre cohorte (*rs833061*; *rs699947* et *rs35569394*) et les données clinico-pathologiques n'a été révélée. Les résultats de cette étude ne constituent qu'un des premiers objectifs d'un projet plus global qui a comme but principal l'amélioration de la prise en charge du CV. Dans cet esprit, un second objectif s'installe afin d'étudier l'expression de l'ARNm du gène *VEGF* au niveau de notre cohorte et de corréler entre les polymorphismes détectés au niveau du promoteur du gène *VEGF* et la transcription de son ARNm ; ceci pour déterminer l'implication du marqueur angiogénique (*VEGF*) dans la progression du CV. Tous ces objectifs envisagent le développement des approches thérapeutiques plus efficace, basées sur l'identification des biomarqueurs de pronostic et/ou thérapeutique dans le cadre du développement de la thérapie ciblée et la médecine personnalisée.

Références

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [2] Registre_des_Cancers_de_la_Region_du_Grand_Casablanca_2013-2017. https://www.contrelecancer.ma/site_media/uploaded_files/registre_des_cancers_de_la_region_du_grand_casablanca_2013-2017.pdf: n.d.
- [3] Registre des cancers de la région de Rabat (2012). "CANCER INCIDENCE RATE IN RABAT". https://www.irc.ma/images/registre_cancer_rabat_2009-2012.pdf: n.d.
- [4] Bouzouita A, Saadi A, Kerkeni W, Chakroun M, Cherif M, Ayed H, et al. Profil évolutif et pronostic des tumeurs urothéliales de la vessie chez le sujet jeune. *Can Urol Assoc J* 2016;10:E110–3. <https://doi.org/10.5489/cuaj.3298>.
- [5] Rouprêt M, Neuzillet Y, Pignot G, Compérat E, Audenet F, Houédé N, et al. Recommandations françaises du Comité de Cancérologie de l'AFU – Actualisation 2018–2020 : tumeurs de la vessie. *Prog En Urol* 2018;28:R48–80. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2019.01.006>.
- [6] Weledji EP, Eyongeta D, Ngounou E. The anatomy of urination: What every physician should know: Urinary Control. *Clin Anat* 2019;32:60–7. <https://doi.org/10.1002/ca.23296>.
- [7] L'incontinence urinaire féminine - SantéConnexion.com n.d. <https://santeconnexion.com/content/25-l-incontinence-urinaire-feminine> (consulté le 18 mai 2022).
- [8] Bolla SR, Odeluga N, Jetli R. *Histology, Bladder*. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
- [9] Varinot J, Colin P, Rouprêt M, Leroy X, Comperat E. Anatomopathologie des tumeurs de la voie excrétrice urinaire supérieure : état de l'art pour le rapport annuel de l'Association française d'urologie. *Prog En Urol* 2014;24:954–65. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2014.07.003>.
- [10] Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, et al. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primer* 2017;3:17022. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.22>.
- [11] Quarles J, Richmond J, Swamy V, Pandey J. Educational Case: Bladder Urothelial Cell Carcinoma TNM Stage, Prognosis and Management. *Acad Pathol* 2021;8:23742895211022256. <https://doi.org/10.1177/23742895211022256>.
- [12] Rouprêt M, Neuzillet Y, Pignot G, Compérat E, Audenet F, Houédé N, et al. RETRACTED: Recommandations françaises du Comité de Cancérologie de l'AFU — Actualisation 2018–2020 : tumeurs de la vessie. *Prog En Urol* 2018;28:S46–78. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2018.07.283>.
- [13] Compérat E, Furudoï A, Varinot J, Rioux-Leclercq N. Carcinome urothélial : des classifications histologiques et moléculaires vers un traitement adéquat. *Ann Pathol* 2016;36:275–8. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2016.06.001>.
- [14] Rouprêt M, Pignot G, Masson-Lecomte A, Compérat E, Audenet F, Roumiguié M, et al. Recommandations françaises du Comité de cancérologie de l'AFU – actualisation 2020–2022 : tumeurs de la vessie. *Prog En Urol* 2020;30:S78–135. [https://doi.org/10.1016/S1166-7087\(20\)30751-X](https://doi.org/10.1016/S1166-7087(20)30751-X).
- [15] Grobet-Jeandin E. Implication pronostique d'une sous-classification histopathologique du carcinome urothélial de la vessie envahissant la sous-muqueuse 2021. <https://doi.org/10.13097/ARCHIVE-OUVERTE/UNIGE:157691>.
- [16] Grobet-Jeandin E. Le carcinome urothélial de la vessie micro-invasif. *Urol Prax* 2019;21:103–8. <https://doi.org/10.1007/s41973-019-00065-y>.
- [17] Mhawech P, Iselin C, Pelte M-F. Value of Immunohistochemistry in Staging T1 Urothelial Bladder Carcinoma. *Eur Urol* 2002;42:459–63. [https://doi.org/10.1016/S0302-2838\(02\)00368-8](https://doi.org/10.1016/S0302-2838(02)00368-8).
- [18] Cours n.d. http://campus.cerimes.fr/urologie/enseignement/urologie_12/site/html/5.html (consulté le 20 avril 2022).

- [19] Lopez-Beltran A. Bladder cancer: Clinical and pathological profile. *Scand J Urol Nephrol* 2008;42:95–109. <https://doi.org/10.1080/03008880802325226>.
- [20] Kadouri Y, Hachem F, Lakssir J, Sayegh H, Benslimane L, Nouini Y. Adénocarcinome primitif de la vessie: à propos de 6 cas. *Pan Afr Med J* 2020;36:61. <https://doi.org/10.11604/pamj.2020.36.61.20176>.
- [21] Cancer today n.d. <http://gco.iarc.fr/today/home> (consulté le 3 mai 2022).
- [22] Mori K, Mostafaei H, Abufaraj M, Yang L, Egawa S, Shariat SF. Smoking and bladder cancer: review of the recent literature. *Curr Opin Urol* 2020; Publish Ahead of Print. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000804>.
- [23] Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Padala SA, Barsouk A. Epidemiology of Bladder Cancer. *Med Sci* 2020;8:15. <https://doi.org/10.3390/medsci8010015>.
- [24] Cumberbatch MGK, Jubber I, Black PC, Esperto F, Figueroa JD, Kamat AM, et al. Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018. *Eur Urol* 2018;74:784–95. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.09.001>.
- [25] Cumberbatch MGK, Cox A, Teare D, Catto JWF. Contemporary Occupational Carcinogen Exposure and Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol* 2015;1:1282. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.3209>.
- [26] Zaghoul MS, Zaghoul TM, Bishr MK, Baumann BC. Urinary schistosomiasis and the associated bladder cancer: update. *J Egypt Natl Cancer Inst* 2020;32:44. <https://doi.org/10.1186/s43046-020-00055-z>.
- [27] Marcus PM, Vineis P, Rothman N. NAT2 slow acetylation and bladder cancer risk: a meta-analysis of 22 case-control studies conducted in the general population. *Pharmacogenetics* 2000;10:115–22. <https://doi.org/10.1097/00008571-200003000-00003>.
- [28] García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, et al. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *The Lancet* 2005;366:649–59. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67137-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67137-1).
- [29] Farling KB. Bladder cancer: Risk factors, diagnosis, and management. *Nurse Pract* 2017;42:26–33. <https://doi.org/10.1097/01.NPR.0000512251.61454.5c>.
- [30] Fiard G, Pavillet J. Rôle de la chimiothérapie dans le cancer de la vessie. *Prog En Urol* 2015;25:907–11. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2015.06.011>.
- [31] Babjuk M. Second Resection for Non-Muscle-Invasive Bladder Carcinoma: Current Role and Future Perspectives. *Eur Urol* 2010;58:191–2. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.04.019>.
- [32] Jacques IRANI, Stéphane BERNARDINI, Jean-Louis BONNAL, Bruno CHAUVET, Marc COLOMBEL, Jean-Louis DAVIN, Guy LAURENT, Thierry LEBRET, Marc MAIDENBERG, Catherine MAZEROLLES, Christian PFISTER, Morgan ROUPRET, Catherine ROY, François ROZET, Fabien SAINT, Christine THEODORE. Tumeurs Urothéliales. *Prog. En Urol.*, vol. 7, 2007, p. 1065–98.
- [33] J. Alfred Witjes, Thierry Lebret, Eva M. Compérat, Antoine G. van der Heijden, Georgios Gakis, Maria J. Ribal. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer - European Urology n.d. [https://www.europeanurology.com/article/S0302-2838\(16\)30290-1/pdf/updated-2016-eau-guidelines-on-muscle-invasive-and-metastatic-bladder-cancer](https://www.europeanurology.com/article/S0302-2838(16)30290-1/pdf/updated-2016-eau-guidelines-on-muscle-invasive-and-metastatic-bladder-cancer) (consulté le 10 mai 2022).
- [34] Pignot G, le Goux C, Bieche I. Altérations moléculaires au cours de la carcinogenèse urothéliale vésicale. *Bull Cancer (Paris)* 2015;102:1020–35. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2015.10.004>.
- [35] Varinot J, Furudoï A, Roupert M, Compérat E. Mise au point sur les classifications moléculaires et la nouvelle classification histologique du cancer de la vessie. *Prog En Urol* 2016;26:600–7. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2016.08.020>.
- [36] Netto GJ. Molecular Pathology of Bladder Cancer. *Surg Pathol Clin* 2012;5:843–58. <https://doi.org/10.1016/j.path.2012.08.003>.
- [37] Minoli M, Kiener M, Thalmann GN, Julio MK, Seiler R. Evolution of Urothelial Bladder Cancer in the Context of Molecular Classifications. *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21165670>.

- [38] Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* 2015;15:25–41. <https://doi.org/10.1038/nrc3817>.
- [39] Kasthuber E, Lowe S. Putting p53 in context. *Cell* 2017;170:1062–78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>.
- [40] The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014;507:315–22. <https://doi.org/10.1038/nature12965>.
- [41] Siregar GP. Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphism in Bladder Cancer: A Review. *Open Access Maced J Med Sci* 2020;8:31–6. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2020.3280>.
- [42] Sjö Dahl G, Lauss M, Lövgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, et al. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2012;18:3377–86. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0077-T>.
- [43] Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell* 2017;171:540–556.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.007>.
- [44] Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 2014;25:152–65. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.009>.
- [45] Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, et al. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:3110–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318376111>.
- [46] Choi W, Ochoa A, McConkey DJ, Aine M, Höglund M, Kim WY, et al. Genetic Alterations in the Molecular Subtypes of Bladder Cancer: Illustration in the Cancer Genome Atlas Dataset. *Eur Urol* 2017;72:354–65. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.03.010>.
- [47] Camparo P. Taxonomie des carcinomes de la vessie : le tout moléculaire et le clinicopathologique 2016:8.
- [48] McConkey DJ, Choi W. Molecular Subtypes of Bladder Cancer. *Curr Oncol Rep* 2018;20:77. <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0727-5>.
- [49] Zhu S, Yu W, Yang X, Wu C, Cheng F. Traditional Classification and Novel Subtyping Systems for Bladder Cancer. *Front Oncol* 2020;10.
- [50] Plouët J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* 1989;8:3801–6. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08557.x>.
- [51] Shibuya M. Structure and Function of VEGF/VEGF-receptor System Involved in Angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001;26:25–35. <https://doi.org/10.1247/csf.26.25>.
- [52] Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947–54. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99049-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99049-6).
- [53] Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:601–15. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5426-3>.
- [54] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011–27. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.081>.
- [55] Tiwari A, Jung J-J, M. S, Choudhury A. Membrane Trafficking and Endothelial-Cell Dynamics During Angiogenesis. In: Lawrie C, editor. *Hematol. - Sci. Pract., InTech*; 2012. <https://doi.org/10.5772/34226>.
- [56] Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:10705–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10705>.

- [57] Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci Lond Engl* 1979 2005;109:227–41. <https://doi.org/10.1042/CS20040370>.
- [58] Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* 2011;437:169–83. <https://doi.org/10.1042/BJ20110301>.
- [59] Salameh A, Galvagni F, Bardelli M, Bussolino F, Oliviero S. Direct recruitment of CRK and GRB2 to VEGFR-3 induces proliferation, migration, and survival of endothelial cells through the activation of ERK, AKT, and JNK pathways. *Blood* 2005;106:3423–31. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1388>.
- [60] Dumond A, Demange L, Pagès G. Les neuropilines - Des cibles pertinentes pour améliorer le traitement des cancers. *médecine/sciences* 2020;36:487–96. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020080>.
- [61] Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian J Morphol Embryol Rev Roum Morphol Embryol* 2018;59:455–67.
- [62] Treps L, Gavard J. L'angiogenèse tumorale: Quand l'arbre de vie tourne mal. *Médecine/Sciences* 2015;31:989–95. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153111013>.
- [63] Chen C-H, Ho C-H, Kuan-Hua Huang S, Shen C-H, Wu C-C, Wang Y-H. Association between VEGF gene promoter polymorphisms and bladder cancer: An updated meta-analysis. *Cytokine* 2020;131:155112. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155112>.
- [64] Fernandes SS, Marqui ABT de, Teles DRF, Resende EAMR, Lima MFP, Gomes MKO, et al. VEGF gene rs35569394 polymorphism in patients with Polycystic Ovary Syndrome. *Rev Assoc Medica Bras* 1992 2020;66:1396–401. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.66.10.1396>.
- [65] Sambyal V, Guleria K, Kapahi R, Manjari M, Sudan M, Uppal MS, et al. Association of VEGF haplotypes with breast cancer risk in North-West Indians. *BMC Med Genomics* 2021;14:209. <https://doi.org/10.1186/s12920-021-01060-4>.
- [66] O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res* 1995;55:510–3.
- [67] Gène de ménage : définition et explications n.d. <https://www.aquaportail.com/definition-10230-gene-de-menage.html> (consulté le 20 juin 2022).
- [68] Jaiswal PK, Tripathi N, Shukla A, Mittal RD. Association of single nucleotide polymorphisms in vascular endothelial growth factor gene with bladder cancer risk. *Med Oncol* 2013;30:509. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0509-8>.
- [69] Zhai R, Liu G, Asomaning K, Su L, Kulke MH, Heist RS, et al. Genetic polymorphisms of VEGF, interactions with cigarette smoking exposure and esophageal adenocarcinoma risk. *Carcinogenesis* 2008;29:2330–4. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn210>.
- [70] Fukuda H, Tsuchiya N, Narita S, Kumazawa T, Horikawa Y, Inoue T, et al. Clinical implication of vascular endothelial growth factor T-460C polymorphism in the risk and progression of prostate cancer. *Oncol Rep* 2007;18:1155–63.
- [71] Ben Wafi S, Kallel A, Ben Fradj MK, Sallemi A, Ben Rhouma S, Ben Halima M, et al. Haplotype-based association of Vascular Endothelial Growth Factor gene polymorphisms with urothelial bladder cancer risk in Tunisian population. *J Clin Lab Anal* 2018;32:e22610. <https://doi.org/10.1002/jcla.22610>.
- [72] Kim E-J, Jeong P, Quan C, Kim J, Bae S-C, Yoon SJ, et al. Genotypes of TNF-alpha, VEGF, hOGG1, GSTM1, and GSTT1: useful determinants for clinical outcome of bladder cancer. *Urology* 2005;65:70–5. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2004.08.005>.
- [73] Song Y, Yang Y, Liu L, Liu X. Association between five polymorphisms in vascular endothelial growth factor gene and urinary bladder cancer risk: A systematic review and meta-analysis involving 6671 subjects. *Gene* 2019;698:186–97. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.02.070>.
- [74] Yuan Q, Zuo X, Jia J. Association between promoter polymorphisms of vascular endothelial growth factor gene and sporadic Alzheimer's disease among Northern Chinese Han. *Neurosci Lett* 2009;457:133–6. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.03.078>.

Annexes :

Annexe 1 : Protocole d'extraction d'ADN génomique par la méthode Phénol/Chloroforme

| La lyse cellulaire |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Découper un morceau de biopsie fraîche de 3 mm³ en petits fragments avec une lame stérile.• Broyer dans un mortier jusqu'à homogénéisation.• Ajouter à l'homogénat un volume de 300 µl de tampon d'extraction. |
| La digestion des protéines |
| <ul style="list-style-type: none">• Addition 30 µl de Protéinase K (PK) (200µg/ml).• Incuber l'ensemble avec la PK, 3H à 50 °C ou toute la nuit à 42 °C, dans un four.• Si la digestion des protéines n'est pas suffisante, après 24H à 42 °C, rajouter la protéinase K (10 à 20 µl) ou diluer par addition de tampon d'extraction. |
| L'élimination des protéines |
| <ul style="list-style-type: none">• Ajouter un volume de 300µl de Phénol chloroforme /Tris au produit de l'incubation.• Agiter l'ensemble doucement jusqu'à homogénéisation de la solution.• Incuber 15 min à 50C°.• Centrifuger à 13000 à rpm pendant 15 min.• Récupérer la phase supérieure. |
| La précipitation de l'ADN |
| <ul style="list-style-type: none">• Ajouter 2/5ème de volume d'acétate d'ammonium plus un volume d'isopropanol ;• Incuber 24 h à -20 C°• Centrifuger 15 min à 13000 rpm et rejeter le surnageant• Ajouter à cette phase supérieure 400 µl de l'éthanol de 70% ;• Centrifuger à 13000 rpm.15 min à température ambiante ;• Sécher le culot ;• Reconstituer dans 50 µl d'eau distillé ;• Conserver l'ADN extrait à 4 C°. |

Réactifs utilisés

- **Tampon de lyse ou d'extraction** : (1 ml Tris 1M pH, 8,20 ml EDTA 0,5 M pH 8, 2,5 ml SDS 20%-H₂O qsp 100 ml)
- **Protéinase K (200 µg/ml) dans H₂O (Dnase free)**, aliquotée et conservée à -20C°.
- **NH₄ Acétate 5M** (38, 54 g/100ml, H₂O, PM 77,08).
- **Phénol /Chloroforme**
- **Isopropanol**
- **Ethanol**
- **Eau distillée**

Annexe 2 : Les volumes et les concentrations de chaque composant de la PCR.

| Les composants de la PCR | Les volumes pour un échantillon | Concentration des produits |
|---|---------------------------------|----------------------------|
| Eau pour PCR | 14.7 μ l | ----- |
| Tampon de PCR (DreamTaq Reaction Buffer) | 2 μ l | 5X |
| dNTPs | 2 μ l | 10 mM |
| Amorce sens | 0,6 μ l | 10 μ M |
| Amorce anti- sens | 0,6 μ l | 10 μ M |
| DreamTaq polymérase | 0,1 μ l | 5 U/ μ l |
| ADN | 2 μ l | 50 ng / μ l |
| Total | 22 μ l | |

Annexe 3 : Préparation du gel d'agarose :

▪ Préparation du gel d'agarose :

Dans une erlenmeyer, on ajoute 100 ml du TBE (0,5X) à 2g d'agarose, le mélange est porté à ébullition à l'aide d'une plaque chauffante, puis il est laissé refroidir, 7 μ l du Bromure Ethidium (BET) sont ajoutés et le mélange est coulé dans une cuve et laissé refroidir jusqu'à la solidification.

▪ Migration d'ADN :

Pour la migration, Le gel est placé dans la cuve à électrophorèse après sa solidification, 7 μ l de produit PCR et 3 μ l du bleu de bromophénol sont mélangés et déposés sur les puits du gel. Ensuite, 3 μ l du marqueur de poids moléculaire de 100pb sont également déposés dans un puits. La migration des produits de PCR est réalisée à un voltage constant de 100V, ampérage de 100mA et à 80W pendant 40 min. Le gel est visualisé sous lumière UV à l'aide de l'appareil Vilber Lourmat puis analysé et photographié à l'aide du logiciel GelSmart.

Annexe 4 : Purification de la réaction de séquence par méthode de séquence par méthode éthanol EDTA

Purification de la réaction de séquence par méthode éthanol EDTA

- Ajouter à chaque puit de réaction de séquence : 5µl EDTA 125 Mm + 60 µL EtOH 100%
- Bien sceller la plaque avec un film adhésif (ou aluminium)
- Inverser la plaque 4 fois
- Incube 15 min au minimum à température ambiante
- Centrifuger à 2000 x g pendant 45 min
- Prépare de l'EtOH 70% et le stocker -20°C
- Enlever le film adhésif
- Recouvrir la plaque avec du papier essuie-tout et l'inverser pour éliminer le maximum de volume possible.
- Poser la plaque à l'envers dans une mini-centrifugeuse avec du papier essuie-tout puis centrifuger très brièvement (spin-down).
- Vérifier que les puits ne contiennent plus de surnageant
- Ajouter 60 µL. D'EtOH 70% à puit.
- Sceller la plaque avec du film adhésif (ou aluminium)
- Centrifuger à 1650 x g pendant 15 min.
- Enlever le film adhésif
- Recouvrir la plaque avec du papier essuie-tout et l'inverser pour éliminer le maximum de volume possible.
- Poser la plaque à l'envers dans une mini-centrifugeuse avec du papier essuie-tout et centrifuger très brièvement (spin-down).
- Vérifier que les puits ne contiennent plus de surnageant.
- Ajouter 10ul de formamide dans chaque puit.
- Dénaturer à 96°C pendant 5min.
- Mettre la plaque á -20°C pendant quelques minutes.
- La plaque est prête pour être analysée dans un séquenceur.

Annexe 5 : Données démographiques et cliniques des patients

| ID | Age | Sexe | Stade | Grade | Tabagisme |
|----|-----|------|-------|-------|-----------|
| 1 | 61 | M | pT1 | Bas | Non |
| 2 | 56 | M | pT2 | Haut | Oui |
| 3 | 71 | M | pTa | Haut | Non |
| 4 | 69 | F | pT1 | Bas | Non |
| 5 | 77 | M | pT3 | Haut | Oui |
| 6 | 61 | M | pT2 | Haut | Oui |
| 7 | 84 | M | pT1 | Haut | Oui |
| 8 | 61 | M | pT1 | Haut | Oui |
| 9 | 56 | M | PT2 | Haut | Oui |
| 10 | 68 | M | pT2 | Haut | Oui |
| 11 | 73 | M | PT1 | Haut | non |
| 12 | 67 | M | pT3 | Haut | Oui |
| 13 | 53 | M | pTa | Bas | Oui |
| 14 | 74 | M | pT1a | Bas | non |
| 15 | 72 | M | pT1b | Haut | Oui |
| 16 | 67 | M | pTa | Bas | Oui |
| 17 | 53 | F | pTa | Bas | non |
| 18 | 80 | M | pT1 | Bas | Oui |
| 19 | 47 | M | pT1 | Haut | Oui |
| 20 | 66 | M | pT2 | Haut | non |
| 21 | 68 | M | pTa | Bas | Oui |
| 22 | 57 | M | pT1 | Haut | Oui |
| 23 | 67 | M | pTa | Bas | Oui |
| 24 | 59 | M | pTa | Bas | Oui |
| 25 | 67 | M | pTa | Bas | Oui |
| 26 | 78 | M | pT1 | Bas | non |
| 27 | 60 | M | pTa | Bas | Oui |
| 28 | 69 | M | pT1 | Haut | non |
| 29 | 71 | M | pT1 | Haut | non |
| 30 | 72 | M | pTa | Haut | Oui |
| 31 | 72 | M | pT1 | Bas | non |
| 32 | 67 | M | pT1 | Bas | Oui |
| 33 | 73 | M | pTa | Haut | non |
| 34 | 68 | M | pT1 | Haut | non |
| 35 | 63 | M | pT1a | Bas | Oui |
| 36 | 70 | M | pTa | Haut | non |
| 37 | 70 | M | pT2 | Haut | non |
| 38 | 75 | M | pT1b | Haut | non |

| | | | | | |
|----|----|---|------|------|-----|
| 39 | 72 | M | pT2 | Haut | Oui |
| 40 | 74 | M | pT2 | Haut | non |
| 41 | 59 | M | pT1 | Haut | non |
| 42 | 74 | M | pT1 | Bas | Oui |
| 43 | 63 | M | pT1 | Haut | non |
| 44 | 67 | M | pT1 | Bas | non |
| 45 | 76 | M | pT1 | Haut | non |
| 46 | 77 | M | pT2 | Haut | non |
| 47 | 71 | M | pT1 | Haut | non |
| 48 | 71 | M | pT1 | Haut | Oui |
| 49 | 64 | M | pT1 | Haut | non |
| 50 | 82 | M | pT1 | Haut | non |
| 51 | 70 | M | pT1a | Bas | non |
| 52 | 59 | M | pTa | Haut | non |
| 53 | 64 | M | pTa | Bas | non |
| 54 | 59 | M | pTa | Bas | non |
| 55 | 61 | M | pTa | Haut | non |
| 56 | 56 | M | pTa | Haut | non |
| 57 | 62 | M | pT1 | Haut | non |
| 58 | 62 | M | pTa | Bas | non |
| 59 | 53 | M | pT2 | Haut | non |
| 60 | 68 | M | pT1 | Bas | non |
| 61 | 70 | M | pTa | Bas | non |
| 62 | 67 | M | pT2 | Haut | non |
| 63 | 72 | M | pTa | Bas | non |
| 64 | 57 | M | pT3 | Haut | Oui |
| 65 | 81 | M | pTa | Bas | non |
| 66 | 85 | M | pT2 | Haut | Oui |
| 67 | 67 | M | pT3 | Haut | Oui |
| 68 | 57 | M | pTa | Bas | non |
| 69 | 76 | M | pT3 | Haut | non |
| 70 | 62 | M | pT4a | Haut | non |

Annexe 6 : Les données de récidives et progressions des patients

| ID | Récidive | Progression |
|----|----------|-------------|
| 1 | Récidive | - |
| 3 | Récidive | - |
| 4 | | - |
| 7 | - | - |
| 8 | - | - |
| 11 | - | - |
| 13 | - | - |
| 14 | Récidive | - |
| 15 | - | - |
| 16 | Récidive | - |
| 17 | - | - |
| 18 | - | - |
| 19 | Récidive | - |
| 21 | - | - |
| 22 | - | - |
| 23 | Récidive | - |
| 24 | Récidive | - |
| 25 | - | Progression |
| 26 | | - |
| 27 | Récidive | - |
| 28 | - | - |
| 29 | - | - |
| 30 | - | - |
| 31 | - | - |
| 32 | - | - |
| 33 | - | - |
| 34 | - | - |
| 35 | - | - |
| 36 | - | Progression |
| 38 | - | - |
| 41 | - | - |
| 42 | - | Progression |

| | | |
|----|----------|-------------|
| 43 | - | - |
| 44 | Récidive | - |
| 45 | - | - |
| 47 | - | - |
| 48 | Récidive | - |
| 49 | - | - |
| 50 | - | - |
| 51 | - | - |
| 52 | Récidive | - |
| 53 | - | - |
| 54 | - | - |
| 55 | - | - |
| 56 | Récidive | - |
| 57 | - | - |
| 58 | - | - |
| 60 | - | Progression |
| 61 | - | - |
| 63 | - | - |
| 65 | - | - |
| 68 | | Progression |