



HAL
open science

Corrélation des altérations génétiques à l'agressivité anatomo-pathologique des carcinomes urothéliaux de la vessie : performance du test BCA-1

P. Léon, G. Cancel Tassin, K. Sighar, E. Compérat, C. Gaffory, V. Ondet, S. Hugonin, M. Audouin, S. Doizi, O. Traxer, et al.

► To cite this version:

P. Léon, G. Cancel Tassin, K. Sighar, E. Compérat, C. Gaffory, et al.. Corrélation des altérations génétiques à l'agressivité anatomo-pathologique des carcinomes urothéliaux de la vessie : performance du test BCA-1. *Progrès en Urologie*, 2017, 27 (8-9), pp.451-457. 10.1016/j.purol.2017.05.002 . hal-01540447

HAL Id: hal-01540447

<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-01540447>

Submitted on 21 Jun 2017

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

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

Corrélation des altérations génétiques à l'agressivité anatomo-pathologique des carcinomes urothéliaux de la vessie : performance du test BCA-1

P.Léon, G. Cancel Tassin, K. Sighar, E. Compérat, C. Gaffory, V. Ondet, S. Hugonin, M. Audouin ,
S. Doizi, O. Traxer, C. Ciofu, M. Roupret, R. Lacave, O. Cussenot

Résumé

Introduction : Les carcinomes urothéliaux représentent la quatrième cause de cancer chez l'homme. Leur incidence est en augmentation de plus de 50% depuis 25 ans. Les formes superficielles (70% cas) nécessitent une surveillance active rapprochée afin d'identifier les récurrences fréquentes et l'évolution vers un stade invasif. Notre étude visait à identifier des marqueurs moléculaires pronostiques pour le cancer de la vessie pouvant être utilisés seuls ou en combinaison dans la pratique clinique de routine. Dans ce but, nous avons évalué la capacité de la puce CGH du test BCA-oligo à classer correctement en grade/stade ces tumeurs superficielles.

Méthode : L'ADN de 81 échantillons urinaires de patients atteints d'un cancer de vessie superficiel a été extrait et hybridé sur la puce BCA-oligo. Les résultats de l'analyse moléculaire ont été corrélés au grade et stade tumoraux.

Résultats : Plusieurs altérations chromosomiques étaient significativement plus fréquentes dans les tumeurs de haut grade ou de stade plus avancé. Une association très significative a été observée entre un haut grade tumoral et la présence d'au moins une des altérations suivantes : perte en 6p, gain en 8q ou 13q, perte ou gain en 9q ou 11q, avec un odds ratio de 6,91 (IC = 2,20-21,64 ; p=0,0009). De plus, une corrélation très significative a été trouvée entre le stade plus invasif pT1 et la présence d'au moins une des altérations suivantes : perte en 6p, gain en 8q, perte ou gain en 5p, avec un odds ratio de 15,2 (IC = 3,71-62,58 ; p=0,0002).

Conclusion : Nos résultats montrent que l'analyse moléculaire des tumeurs superficielles de vessie basée sur l'ADN urinaire et le test BCA-oligo pourrait être utilisée comme facteur de

1
2 pronostic pour l'évolution des tumeurs, permettant ainsi une prise en charge clinique mieux
3 adaptée.

4
5
6
7 Mots clés : altérations cytogénétiques, biomarqueurs, cancer de vessie, puce génétique,

8
9 Hybridation Génomique Comparative
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 Correlation of genetic and cytogenetic alterations in pathological aggressiveness urothelial
3
4 carcinoma of the bladder: performance of BCA-1, a mini-array comparative genomic
5
6 hybridisation-based test.
7
8
9

10
11
12 Abstract

13
14 Introduction: Urothelial carcinomas are the fourth leading cause of cancer in humans. Their
15
16 incidence is increasing by more than 50% in 25 years. The superficial forms (70% cases)
17
18 require a close active surveillance to identify frequent recurrences and progression to invasive
19
20 stage. Our main goal was to identify prognostic molecular markers for bladder cancer that
21
22 could be used alone or in combination in routine clinical practice. In this aim, we evaluated
23
24 the capability of the BCA-oligo test based on a CGH array to correctly classify tumoral grade
25
26 / stage.
27
28

29
30
31 Method: Urinary DNA was extracted from 81 patients with superficial bladder cancer and has
32
33 been hybridized on the BCA-oligo array. The results from the molecular analysis were
34
35 correlated with the tumoral grade and stage.
36
37

38
39 Results: Several chromosomal alterations were significantly more frequent in tumors of
40
41 higher grade and more advanced stage. A significant association was observed between a high
42
43 grade and the presence of one of these alterations: loss on 6p, gain on 8q or 13q, loss or gain
44
45 on 9q or 11q, with an odds ratio of 6.91 (95%CI = 2.20-21.64; p=0.0009). Moreover, a
46
47 significant association was found between a more advanced stage (pT1) and the presence of
48
49 one of these alterations: loss on 6p, gain on 8q, loss or gain on 5p, with an odds ratio of 15.2
50
51 (95%CI = 3.71-62.58; p=0.0002).
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Conclusion: Our results showed that molecular analyses of superficial bladder cancers based on urinary DNA and the BCA-oligo test could be used as prognostic factor for the tumor evolution, allowing then a more adapted clinical management.

Keywords: Cytogenetic alterations; biomarkers; bladder cancer; genetic chip; Comparative genomic hybridization

Résumé

1
2 Introduction : Les carcinomes urothéliaux représentent la quatrième cause de cancer chez
3
4 l'homme. Leur incidence est en augmentation de plus de 50% depuis 25 ans. Les formes
5
6 superficielles (70% cas) nécessitent une surveillance active rapprochée afin d'identifier les
7
8 récurrences fréquentes et l'évolution vers un stade invasif. Notre étude visait à identifier des
9
10 marqueurs moléculaires pronostiques pour le cancer de la vessie pouvant être utilisés seuls ou
11
12 en combinaison dans la pratique clinique de routine. Dans ce but, nous avons évalué la
13
14 capacité de la puce CGH du test BCA-oligo à classer correctement en grade/stade ces tumeurs
15
16 superficielles.

17
18 Méthode : L'ADN de 81 échantillons urinaires de patients atteints d'un cancer de vessie
19
20 superficiel a été extrait et hybridé sur la puce BCA-oligo. Les résultats de l'analyse
21
22 moléculaire ont été corrélés au grade et stade tumoraux.

23
24 Résultats : Plusieurs altérations chromosomiques étaient significativement plus fréquentes
25
26 dans les tumeurs de haut grade ou de stade plus avancé. Une association très significative a
27
28 été observée entre un haut grade tumoral et la présence d'au moins une des altérations
29
30 suivantes : perte en 6p, gain en 8q ou 13q, perte ou gain en 9q ou 11q, avec un odds ratio de
31
32 6,91 (IC = 2,20-21,64 ; $p=0,0009$). De plus, une corrélation très significative a été trouvée
33
34 entre le stade plus invasif pT1 et la présence d'au moins une des altérations suivantes : perte
35
36 en 6p, gain en 8q, perte ou gain en 5p, avec un odds ratio de 15,2 (IC = 3,71-62,58 ;
37
38 $p=0,0002$).

39
40 Conclusion : Nos résultats montrent que l'analyse moléculaire des tumeurs superficielles de
41
42 vessie basée sur l'ADN urinaire et le test BCA-oligo pourrait être utilisée comme facteur de
43
44 pronostic pour l'évolution des tumeurs, permettant ainsi une prise en charge clinique mieux
45
46 adaptée.

Mots clés : altérations cytogénétiques, biomarqueurs, cancer de vessie, puce génétique,

Hybridation Génomique Comparative

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 Abstract
3

4 Introduction: Urothelial carcinomas are the fourth leading cause of cancer in humans. Their
5 incidence is increasing by more than 50% in 25 years. The superficial forms (70% cases)
6
7 require a close active surveillance to identify frequent recurrences and progression to invasive
8
9 stage. Our main goal was to identify prognostic molecular markers for bladder cancer that
10
11 could be used alone or in combination in routine clinical practice. In this aim, we evaluated
12
13 the capability of the BCA-oligo test based on a CGH array to correctly classify tumoral grade
14
15 / stage.
16
17
18
19

20
21 Method: Urinary DNA was extracted from 81 patients with superficial bladder cancer and has
22
23 been hybridized on the BCA-oligo array. The results from the molecular analysis were
24
25 correlated with the tumoral grade and stage.
26
27
28

29 Results: Several chromosomal alterations were significantly more frequent in tumors of
30
31 higher grade and more advanced stage. A significant association was observed between a high
32
33 grade and the presence of one of these alterations: loss on 6p, gain on 8q or 13q, loss or gain
34
35 on 9q or 11q, with an odds ratio of 6.91 (95%CI = 2.20-21.64; p=0.0009). Moreover, a
36
37 significant association was found between a more advanced stage (pT1) and the presence of
38
39 one of these alterations: loss on 6p, gain on 8q, loss or gain on 5p, with an odds ratio of 15.2
40
41 (95%CI = 3.71-62.58; p=0.0002).
42
43
44
45

46 Conclusion: Our results showed that molecular analyses of superficial bladder cancers based
47
48 on urinary DNA and the BCA-oligo test could be used as prognostic factor for the tumor
49
50 evolution, allowing then a more adapted clinical management.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

1
2
3 A l'heure actuelle, près de 10 000 nouveaux cas de cancer de la vessie sont
4 diagnostiqués par an en France et 350 000 dans le monde. Les tumeurs de vessie représentent
5 3% des décès par cancer en France [1], majoritairement des hommes qui totalisent 75% des
6 décès [2], du fait d'un tabagisme et d'une exposition plus élevée aux carcinogènes
7 environnementaux (tabac, les amines aromatiques et les hydrocarbures aromatiques
8 polycycliques, [3-4]). La consommation d'alcool, les facteurs alimentaires et l'utilisation de
9 teintures capillaires ont également été suggérés comme facteurs de risque de cancer de la
10 vessie [5-6]. Au moment du diagnostic, environ 70% des tumeurs de vessie (TV) sont à un
11 stade non infiltrant le muscle vésical (TVNIM), contrairement aux 30% restantes qui sont
12 invasives. Les lésions superficielles de stade pTa sont de bon pronostic, mais ont tendance à
13 récidiver sur le même mode (taux de récurrence proche de 70% [1]). Ainsi, ces tumeurs
14 superficielles de vessie nécessitent une surveillance particulièrement rapprochée. Cette
15 surveillance, essentiellement fondée sur le couple cystoscopie-cytologie, est le plus souvent
16 négative, imposant une morbidité inutile au patient. La cystoscopie est dépendante du
17 chirurgien qui la pratique et possède quelques limites techniques et d'interprétation (mauvaise
18 vision liée à une hypertrophie bénigne de prostate ou à un saignement, carcinome in situ
19 difficile à visualiser). Cet examen, performant mais invasif, est parfois mal toléré, peut donc
20 être source de complications (sténoses de l'urètre, infections urinaires), et possède un coût
21 propre. Le cytodiagnostics urinaire est un complément utile à la cystoscopie mais sa sensibilité
22 pour les tumeurs de faible grade est médiocre et dépendante de l'anatomopathologiste
23 effectuant l'examen [2]. En effet, même si la cytologie des urines est un examen très
24 spécifique et peu onéreux (niveau de preuve III-2) [3], sa sensibilité est très variable, de 35 à
25 45 %, et son interprétation est clairement dépendante de l'expérience du cytologiste pour en
26 déjouer les pièges : atypies réactionnelles, viroses, atypies post thérapeutiques [4]. Sa
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

sensibilité pour les tumeurs de bas grade, où elle est le plus souvent négative, est faible, de l'ordre de 4-29%. Dans les tumeurs de haut grade, la cytologie a une sensibilité plus acceptable de 69-92%, mais n'en fait pas un bon test de surveillance [5].

Dans l'absolu, un test urinaire très spécifique, très sensible et peu onéreux pourrait idéalement se substituer au couple cystoscopie et cytologie des urines. Des tests urinaires ont précédemment été développés, basés sur les anomalies découvertes au niveau des tumeurs mais ces tests commercialisés (*BTA Trak*, *NMP 22*, *Accu-Dx*, *uCyt+*, *Urovysion*) ne sont pas utilisés en pratique clinique de routine. Une caractéristique commune à de nombreuses tumeurs est de présenter des anomalies chromosomiques (déséquilibres alléliques) qui peuvent être révélées par l'étude de marqueurs de l'ADN. Cette particularité du génome tumoral a d'abord été mise à profit dans les cancers de vessie pour détecter des cellules tumorales en étudiant l'ADN extrait des urines de patients à l'aide de marqueurs microsatellites [7]. Depuis, plusieurs équipes ont rapporté des résultats utilisant cette technique pour le diagnostic ou le suivi de ces tumeurs [8]. Ces études montrent que l'examen de l'ADN urinaire présente un intérêt majeur pour le suivi des patients au décours d'une résection trans-urétrale d'un carcinome superficiel de la vessie. La sensibilité et la spécificité de ce test apparaissent meilleures que celles de la cystoscopie urinaire et du BTA TRAK test [9]. L'objectif est de dépister une lésion urothéliale asymptomatique dans une population cible d'une part, et de simplifier les modalités de surveillance des patients porteurs de tumeurs de vessie déjà connues et traitées en réduisant les indications de l'endoscopie d'autre part [2,6,10]. Il serait donc souhaitable de pouvoir détecter un cancer urothélial à partir des urines d'un patient avec une grande sensibilité, puis éventuellement, d'apporter des informations complémentaires sur la nature du cancer et son agressivité. L'identification de lésions cytogénétiques au sein d'un urothélium optiquement normal, après exérèse de la tumeur

1 primitive pourrait être un critère intéressant de sélection des patients qui pourraient bénéficier
2 d'instillations vésicales.
3

4
5
6
7 Dans cette optique, notre équipe a développé une puce à ADN d'hybridation
8 génomique comparative (CGH), nommée BCA-1, et comprenant 341 clones (BAC) répartis
9 sur des régions chromosomiques d'intérêts [11]. L'ADN extrait d'urine de 22 patients atteints
10 de cancer de vessie et de 22 témoins a montré que cette puce CGH avait une excellente
11 performance diagnostique avec une sensibilité de 95% et une spécificité de 86% [11]. Ce test
12 urinaire a également permis d'identifier un panel d'aberrations génomiques permettant
13 d'identifier le grade de la tumeur avec une sensibilité et une spécificité de 86 et 88%,
14 respectivement [12]. Depuis une nouvelle puce BCA-oligo couvrant les mêmes régions
15 chromosomiques mais constituées d'oligonucléotides a été créée (60000 sondes de 50-60
16 paires de base). Nous avons montré que l'utilisation de cette puce avec l'ADN extrait d'urine
17 ne montrait aucun faux positif dans une population de patients avec une cytoscopie normale,
18 une cytologie normale et sans antécédent de cancer de vessie, et avait une sensibilité de 95 %
19 pour détecter les cystoscopies positives chez les patients suivis pour un cancer de vessie [13].
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 Nous avons maintenant étendu notre étude à l'analyse prospective de patients atteints
39 de cancer superficiel de vessie afin d'identifier des marqueurs pronostiques qui ont la capacité
40 de classer correctement en grade/stade les tumeurs. Les profils d'altérations chromosomiques
41 pronostiques ainsi identifiées devraient permettre de moduler la surveillance et les traitements
42 des tumeurs de vessie.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Méthodes

Population étudiée

Une cohorte prospective de patients avec une tumeur de vessie a été constituée. Les critères d'inclusion étaient une indication de résection endoscopique de vessie dans le cadre d'une surveillance de tumeur vésicale ou de récurrence. Tous les patients ont signé un consentement éclairé.

Le recueil des données cliniques comprenait : l'âge, le sexe, l'âge au diagnostic, les antécédents de tumeur de vessie, le statut fumeur (actif, sevré ou non fumeur), et le risque d'exposition professionnelle à des toxiques. Les données anatomo-pathologiques suivantes concernant la tumeur de vessie ont également été recueillies: le stade et le grade; ainsi que le statut mutationnel du gène FGFR3 (S249C; Y375C; G372C).

Recueil des échantillons urinaires

Les urines étaient recueillies avant chaque intervention (50ml), le matin entre 6h et 9h. Il s'agissait d'urine fraîchement émise, en évitant la première miction matinale, si possible après un léger exercice physique (montée de quelques marches d'escalier si le patient était capable physiquement de l'effectuer) propice à un mini barbotage intra-vésical. Après centrifugation de l'urine, l'ADN urinaire était extrait du culot obtenu à l'aide du kit QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur.

Hybridation de la puce CGH

Après vérification des quantité et qualité, l'ADN était marqué puis hybridé sur la puce BCA-oligo selon le protocole décrit dans Larré et al. [12]. Brièvement, un marquage de

1 l'ADN testé (à la Cyanine 5) et de l'ADN de référence (à la Cyanine 3) était réalisé à l'aide
2 du kit BioPrime (Life technologies Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur.
3
4 Après une double purification, la première avec le kit Nucleospin Extract II (Macherey-
5 Nagel), et la deuxième avec le kit Purelink® (Life technologies), les deux ADN étaient
6
7 mélangés en égale quantité. Ce mélange était ensuite incubé 3 minutes à 95°C, puis 30
8
9 minutes à 37°C en présence d'ADN répété Cot-1 (1mg/ml), du tampon d'hybridation Agilent
10
11 2X Hybridation Buffer (Agilent Technologies) et de l'agent bloquant Agilent 10X Blocking
12
13 Agent (Agilent Technologies). Le mélange était ensuite déposé sur la puce BCA-oligo pour
14
15 une hybridation de 16 heures à 65°C. Après lavage avec la solution de lavage Wash Buffer
16
17 (Agilent Technologies), la puce était scannée en utilisant l'appareil Hi-scanner Agilent
18
19 (Agilent Technologies). Les résultats étaient analysés à l'aide du logiciel WorkBench (Agilent
20
21 Technologies).
22
23

24
25
26 Pour l'interprétation du résultat du test BCA-oligo, la médiane log₂ valeur normalisée de
27
28 fluorescence était calculée pour chaque oligonucléotide. Un oligonucléotide était considéré
29
30 comme délété ou amplifié si son ratio moyen Log₂ normalisé était inférieur ou supérieur à -
31
32 0,2 ou 0,2, respectivement. Une région chromosomique était considérée comme amplifiée ou
33
34 délétée si au moins 6 oligonucléotides successifs de cette région étaient interprétés comme
35
36 gagnés ou perdus. Si au moins une région chromosomique était amplifiée ou délétée, le test
37
38 était considéré positif pour le patient.
39
40
41
42
43
44
45

46 47 Statistiques

48
49
50
51 Le test exact de Fischer a été utilisé pour comparer les fréquences des altérations
52
53 chromosomiques selon le stade et le grade tumoraux. Pour cette analyse, deux groupes ont été
54
55 considérés pour le stade tumoral : pTa (non invasive) et pT1 (envahissant le chorion). Deux
56
57 classes ont été considérées pour le grade tumoral : bas grade et haut grade. Les associations
58
59
60
61
62
63
64
65

1 entre le stade ou le grade tumoral et les altérations chromosomiques ou les paramètres
2 cliniques ont été évaluée à l'aide des odds ratio (OR), en tant que mesure du risque, et les
3 intervalles de confiance à 95% (IC à 95%) estimés à partir de modèles de régression
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

entre le stade ou le grade tumoral et les altérations chromosomiques ou les paramètres cliniques ont été évaluée à l'aide des odds ratio (OR), en tant que mesure du risque, et les intervalles de confiance à 95% (IC à 95%) estimés à partir de modèles de régression logistique. Tous les tests statistiques ont été réalisés avec StatView version 5.0 (SAS Institut Inc, Cary, NC). Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Résultats

Notre étude a porté sur 81 patients ayant une tumeur de vessie superficielle (Table 1), avec un âge médian au diagnostic de 70,0 ans. Au moment de l'analyse moléculaire, 57% des patients avaient une tumeur de bas grade et pour 75%, leur tumeur était non invasive (stade pTa). Des mutations du gène FGFR3 (S249C, Y375C ou G372C) ont été retrouvées pour 24% des tumeurs : 31% (14/45) des bas grades et 15% (5/33) des hauts grades ($p=0,17$).

Les résultats globaux de la puce CGH BCA-oligo sont présentés dans le Tableau 2. Aucune altération n'a été retrouvée sur les bras chromosomiques: 13p, 14p et 21p. Seuls des gains ont été observés en 1q, 6q, 8q, 12q, 15p, 18p et 20p. A l'inverse, seules des délétions ont été identifiées en 22p. Les altérations les plus fréquentes dans l'ensemble des échantillons tumoraux étaient : les gains en 16p (31%), 15q (25%), 17q (24%) et Xp (21%), ainsi que les pertes en 14q (36%) et 15q (30%).

La répartition des fréquences d'altérations de chaque bras chromosomique a ensuite été analysée en fonction du stade et du grade. Les bras chromosomiques dont la fréquence des altérations était significativement différente entre bas et haut grades, et stades pTa et pT1 sont présentés dans les Tableaux 3 et 4, respectivement. Les pertes en 6p et les gains en 8q et 13q étaient significativement plus fréquents dans les tumeurs de haut grade ($p=0,03$, $p=0,02$, et

1 p=0,03, respectivement) (Tableau 3). Le nombre des altérations totales (perte + gain) en 9q et
2 11q (p=0,04 et p=0,02, respectivement) est également significativement plus élevé dans les
3 tumeurs de haut grade (Tableau 3). Par ailleurs, en combinant ces 5 altérations, une
4 association très significative entre la présence d'au moins une des ces altérations et un haut
5 grade tumoral a été retrouvée avec un odds ratio de 6,91 (IC = 2,20-21,64 ; p=0,0009).
6
7
8
9

10
11 Pour la comparaison des stades, la fréquence des pertes en 6p et 8p, ainsi que les gains
12 en 3p, 5q, 8q, 10p, 11q et 21q était significativement plus élevée dans les tumeurs de stade
13 pT1 (p=0,006, .p=0,05, p=0,02, p=0,02, p=0,007, p=0,02, p=0,05 et p=0,02, respectivement)
14 (Tableau 4). Le nombre des altérations totales en 5p, 5q, et 9q (p=0,04, p=0,03, et p=0,02,
15 respectivement) était également significativement plus élevé dans les tumeurs de stade plus
16 avancé (Tableau 4). De plus, une corrélation très significative a été observée entre le stade
17 plus invasive pT1 et la présence d'au moins une des altérations suivantes : perte en 6p, gain en
18 8q, perte ou gain en 5p, avec un odds ratio de 15,2 (IC = 3,71-62,58 ; p=0,0002).
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 Aucune corrélation entre le stade, le grade tumoral ou le statut mutationnel FGFR3 et
32 l'exposition professionnelle ou le statut fumeur n'a été observée.
33
34
35
36
37
38
39
40

41 **Discussion**

42
43
44
45

46 L'une des problématiques du cancer de la vessie est d'être capable d'identifier un ou
47 des marqueur(s) capable(s) de prédire l'évolution des lésions tumorales (récidive ou
48 progression) afin de proposer une chirurgie de façon précoce en cas de lésion potentiellement
49 agressive. Dans ce cadre, l'identification d'altérations génétiques associées à un haut grade ou
50 à un stade invasif est une étape essentielle. Notre étude, réalisée à partir de l'ADN extrait
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 d'urine de patients, nous a permis d'identifier de telles altérations chromosomiques spécifiques
2 d'un haut grade ou d'un stade plus avancé dans les tumeurs superficielles.
3

4 Deux altérations chromosomiques, perte en 6p et gain en 13q, n'ont été retrouvées que
5 dans les tumeurs superficielles de haut grade. De plus, une fréquence plus élevée de gain en
6 8q et du nombre d'altérations totales en 9q et 11q dans ces tumeurs a également été observée.
7 De façon intéressante, l'association entre gain en 8q et haut grade, qui est la plus significative
8 dans notre étude a été rapportée dans une étude, précédente pourtant sur une large série de 958
9 échantillons tumoraux de vessie. En effet, Zaharieva et al. [14] ont montré que la fréquence
10 des gains du gène cMYC situé en 8q24 augmentait significativement avec le grade ($p <$
11 0,0001), avec une fréquence de 5,7% pour le grade G1, 11,9% pour G2 et 19,7% pour G3.
12

13 Pour l'analyse par stade, cinq altérations chromosomiques ont été spécifiquement observées
14 chez les patients avec une tumeur urothéliale de stade pT1 : les gains en 3p, 5q, 10p, 21q et
15 les pertes en 6p. De plus, la fréquence des gains en 8q, 10p, 11q, des pertes en 8p et du
16 nombre d'altérations totales en 5p et 9q était plus élevée pour le stade invasive pT1 que pour
17 le stade pTa. De même que pour le grade, certaines des associations que nous avons
18 identifiées dans l'ADN extrait d'urine avaient été précédemment décrites dans des études
19 portant sur le tissu tumoral. Ainsi, dans une étude portant sur 28 tumeurs pTa et 28 pT1,
20 Richter et al. [15] ont montré que la fréquence des pertes en 8p et des gains en 3p, 8q, et 10p
21 était significativement plus élevée dans les tumeurs pT1. Dans une autre étude portant sur 64
22 tumeurs de vessie de patients chinois, les gains en 8q et 11q, et les pertes en 8p étaient plus
23 fréquentes dans les tumeurs pT1 que celles pTa [16]. Comme pour le grade, Zaharieva et al.
24 [14] ont observé que la fréquence des gains du gène cMYC situé en 8q24 augmentait avec le
25 stade tumoral, passant de 10,5% pour le pTa à 15,8% pour le stade pT1. Enfin, une étude
26 portant sur 46 tumeurs superficielles a montré que les pertes en 8p et les amplifications en 8q,
27 5q, 10p étaient plus fréquentes au stade pT1 [17]. Nos résultats montrent donc que des
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 associations entre des altérations chromosomiques et le grade ou le stade tumoral observées
2 dans les tissus tumoraux sont retrouvées dans les urines de patients atteints de cancer de
3 vessie. Notre étude, basée sur une puce contenant des régions chromosomiques ciblées et non
4 pan génomique, n'est pas exhaustive quant aux altérations chromosomiques associées au stade
5 et au grade et peut expliquer que nous n'ayons pas retrouvée l'ensemble des régions
6 précédemment décrites pour avoir de telles associations dans les tissus tumoraux [15-17].
7 Malgré cette non exhaustivité, nos résultats ont permis d'identifier des altérations
8 chromosomiques spécifiques de stade et grade plus avancés de cette maladie. De plus,
9 l'utilisation d'une telle puce ciblée permet de diminuer le coût du test moléculaire en réalisant
10 l'analyse de l'ADN de plusieurs patients sur une même puce et de faciliter l'interprétation des
11 résultats.

12 Une fréquence plus élevée de trois des altérations chromosomiques identifiées : perte en 6p,
13 gain en 8q et nombre d'altérations totales en 9q est commune à un haut grade et à un stade
14 pT1. Parmi ces altérations, le gain en 8q a précédemment été associée au stade T3 où la
15 tumeur envahie la graisse péri-vésicale [18] et était présent dans plus de 40% des tumeurs de
16 patients métastatiques [19], suggérant que cette altération est bien associée l'agressivité
17 tumorale.

18 De plus, notre étude a permis de montrer que l'utilisation de l'ADN extrait d'urine pour
19 hybrider la puce BCA-oligo permet de mettre en évidence des combinaisons d'altérations
20 chromosomiques qui sont fortement associés au risque d'un haut grade tumoral ou d'un stade
21 plus avancé. Ainsi, en combinant les cinq altérations, perte en 6p, gain en 8q et 13q, nombre
22 des altérations totales en 9q et 11q, une association très significative à un haut grade tumoral a
23 été retrouvée avec un odds ratio de 6,91 ($p=0,0009$). D'autre part, une corrélation très
24 significative a été également observée entre le stade plus invasive pT1 et la présence d'au
25 moins une des altérations suivantes : perte en 6p, gain en 8q, perte ou gain en 5p, avec un

1 odds ratio de 15,2 (p=0,0002). Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de
2 combinaisons d'altérations génétiques pour prédire le risque d'agressivité ou d'évolution des
3 tumeurs de vessie superficielle à partir d'ADN extrait de prélèvement urinaire, mais
4 nécessitent auparavant d'être confirmé sur une plus large cohorte de patients.
5
6
7
8
9

10 11 12 13 **Conclusions**

14
15
16 En complément de l'examen anatomopathologique, la mise en évidence de marqueurs
17 d'agressivité ou de progression chez un patient peut aider le clinicien à décider plus
18 facilement d'un traitement adjuvant après la résection de la tumeur ou à élaborer une stratégie
19 thérapeutique personnalisée. L'établissement de profils génétiques distincts chez ces patients
20 atteints de cancers urothéliaux à cellules transitionnelles pourrait permettre d'améliorer la
21 prise en charge tant en terme de diagnostic de la maladie elle-même ou pour la prévision du
22 pronostic de celle-ci. La recherche d'altérations génétiques, dès le diagnostic, à partir de
23 simples prélèvements d'urines avec un test moléculaire relativement peu couteux et non
24 invasif devrait permettre d'orienter le traitement du patient vers une attitude chirurgicale
25 conservatrice et moins agressive que celle préconisée actuellement, et un suivi plus adéquat.
26 L'utilisation de tels tests moléculaires non invasifs pour établir les profils génétiques des
27 tumeurs et leurs corrélations aux phénotypes des patients devrait ouvrir une nouvelle ère vers
28 une prise en charge personnalisée de ces tumeurs en fonction de leur agressivité et potentielle
29 évolutivité.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

- 1
2
3
4
5 [1] Irani J. Prise en charge des tumeurs de vessie n'infiltrant pas le muscle (TVNIM). Prog
6
7 Urol. 2009; 19:248-53
8
9
10
11
12 [2] Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse JA, et al. Comparison of screening methods in the
13
14 detection of bladder cancer. J Urol. 1999;161:388-94
15
16
17
18
19 [3] Miyoshi Y, Matsuzaki J, Miura T. Evaluation of usefulness of urinary nuclear matrix
20
21 protein 22 (NMP22) in the detection of urothelial transitional cell carcinoma. Hinyokika
22
23 Kyo. 2001; 47:379-83
24
25
26
27
28
29 [4] Kannan V, Bvose S. Low grade transitional cell carcinoma and instrument artifact. A
30
31 challenge in urinary cytology. Acta Cytol. 1993; 37: 899-902
32
33
34
35
36 [5] Leyh H, Marberger M, Conort P, et al. Comparison of the BTA stat test with voided urine
37
38 cytology and bladder wash cytology in the diagnosis and monitoring of bladder cancer. Eur
39
40 Urol. 1999; 35: 52-6
41
42
43
44
45
46 [6] Mao L, Lee DJ, Tockman MS, et al. Microsatellite alterations as clonal markers for the
47
48 detection of human cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:9871-5
49
50
51
52
53 [7] Mao, L., Lee, D. J., Tockman, M. S., Erozan, Y. S., Askin, F., and Sidransky, D. (1994).
54
55 Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. Proc Natl Acad
56
57 Sci U S A 91:9871-9875.
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 [8] Steiner, G., Schoenberg, M. P., Linn, J. F., Mao, L., and Sidransky, D. (1997). Detection
6
7 of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine. *Nat Med* 3:621-624.
8
9

10
11
12
13
14 [9] Van Rhijn BW, Lurkin I, Kirkels WJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. (2001)
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Microsatellite analysis--DNA test in urine competes with cystoscopy in follow-up of superficial bladder carcinoma: a phase II trial. *Cancer* 92:768-75.

[10] Van Rhijn BW, Lurkin I, Kirkels WJ, et al. Microsatellite analysis--DNA test in urine competes with cystoscopy in follow-up of superficial bladder carcinoma: a phase II trial. *Cancer*. 2001;92:768-75

[11] Catto JW, Miah S, Owen HC, et al. Distinct MicroRNA Alterations Characterize High- and Low-Grade Bladder Cancer. *Cancer Res* 2009; 69:8472-81

[12] Larré S, Camparo P, Comperat E, et al. Diagnostic, staging and grading of urothelial carcinomas from urine: performance of BCA-1, a mini array comparative genomic hybridization based test. *Eur Urol*. 2011;59:250-7.

[13] Cussenot O, Sighar K, Mohammed M, et al. Detection of specific chromosomal aberrations in urine using BCA-1 (oligo-CGH-array) enhances diagnostic sensitivity and

1 predicts the aggressiveness of non-muscle-invasive bladder transitional cell carcinoma. World
2 J Urol. 2014;32:551-557.
3

4
5
6
7 [14] Zaharieva B1, Simon R, Ruiz C, Oeggerli M, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G,
8
9
10 Toncheva D. High-throughput tissue microarray analysis of CMYC amplification in urinary
11
12 bladder cancer. Int J Cancer. 2005 Dec 20;117(6):952-6.
13

14
15
16
17 [15] Richter J, Jiang F, Görög JP, Sartorius G, Egenter C, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ,
18
19
20 Sauter G. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder
21
22 cancer detected by comparative genomic hybridization. Cancer Res. 1997 Jul 15;57(14):2860-
23
24
25 4.
26

27
28
29
30 [16] Qin SL1, Chen XJ, Xu X, Shou JZ, Bi XG, Ji L, Han YL, Cai Y, Wei F, Ma JH, Wu M,
31
32
33 Zhan QM, Wang MR. Detection of chromosomal alterations in bladder transitional cell
34
35 carcinomas from Northern China by comparative genomic hybridization. Cancer Lett. 2006
36
37 Jul 18;238(2):230-9.
38

39
40
41
42 [17] Simon R, Burger H, Brinkschmidt C, et al. Chromosomal aberrations associated with
43
44
45 invasion in papillary superficial bladder cancer. J Pathol. 1998; 185: 345-51
46
47

48
49
50 [18] Hoglund M, Sall T, Heim S, et al. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic
51
52
53 pathways in transitional cell carcinoma. Cancer Res. 2001; 61: 8241-6.
54
55
56

[19] Hovey RM, Chu L, Balazs M, DeVries S, Moore D, Sauter G, Carroll PR, Waldman FM.
Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1998 Aug
15;58(16):3555-60.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Légendes

Tableau 1. Caractéristiques de la population étudiée

Tableau 2. Résultats globaux de la puce CGH BCA-oligo.

Tableau 3. Altérations chromosomiques avec une fréquence significativement différente entre bas et haut grades

Tableau 4. Altérations chromosomiques avec une fréquence significativement différente entre stades tumoraux pTa et pT1.

Table 1. Characteristics of the study population

Table 2. Overall results of the BCA-1.

Table 3. Chromosomal alterations with a significantly different frequency between low and high grades

Table 4. Chromosomal alterations with a significantly different frequency between tumor stages pTa and pT1.

Tableau 1. Caractéristiques de la population étudiée

	Nombre (%)
Homme	66 (81,5%)
Femme	15 (19,5%)
Total	81 (100%)
Age au diagnostic médian	70,0 [33,0-90,3]
Non fumeur	17 (21,0%)
Tabac sevré	45 (55,6%)
Tabac actif	14 (17,3%)
Non renseigné	5 (6,2%)
Toxiques professionnels*	15 (19,5%)
pTa	57 (70,4%)
pT1	24 (29,6%)
Bas Grade	46 (56,8%)
Haut Grade	35 (43,2%)
Mutation FGFR3 (S249C, Y375C, ou G372C)	19 (24%)

*Activités professionnelles dans les secteurs suivants : production de colorants, de pigments, de caoutchouc, de plastiques, de câbles, d'encres, d'explosifs, d'aluminium, de médicaments, d'engrais ou de pesticides ; laboratoires d'analyse médicales, de sidérurgie, cokerie, fonderie, industrie textile ou du verre ; travaux de ramonage, manipulation d'huiles usagées ou de solvants.

Tableau 2

	1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	10p	10q	11p	11q	12p	12q	13p	13q	14p	14q	15p	15q	16p	16q	17p	17q	18p	18q	19p	19q	20p	20q	21p	21q	22p	22q	Xp	Xq
Gain	7,4	11,1	4,9	4,9	3,7	2,5	2,5	3,7	4,9	3,7	9,9	4,9	4,9	19,7	8,6	9,9	6,2	7,4	3,7	7,4	4,9	9,9	2,5	9,9	0,0	4,9	0,0	18,5	2,5	24,7	30,9	2,5	7,4	23,5	1,2	1,2	3,7	4,9	6,2	3,7	0,0	3,7	0,0	8,6	21,0	18,5
Délétion	4,9	0,0	8,6	3,7	3,7	1,2	1,2	1,2	1,2	4,9	4,9	0,0	1,2	4,9	9,9	0,0	19,8	9,9	1,2	4,9	6,2	4,9	1,2	0,0	0,0	3,7	0,0	35,8	0,0	29,6	16,0	2,5	4,9	6,2	0,0	1,2	6,2	3,7	0,0	1,2	0,0	1,2	1,2	3,7	2,5	1,2
Altération totale	12,3	11,1	22,2	8,6	7,4	3,7	3,7	4,9	6,2	6,2	12,3	4,9	6,2	22,2	14,8	9,9	24,7	17,3	4,9	12,3	11,1	12,3	3,7	9,9	0,0	8,6	0,0	45,7	2,5	51,9	45,7	4,9	11,1	29,6	1,2	2,5	9,9	8,6	6,2	4,9	0,0	4,9	1,2	11,1	23,5	19,8

Tableau 3. Altérations chromosomiques avec une fréquence significativement différente entre bas et haut grades

Bras chromosomique	Type altération	Bas grade (%)	Haut grade (%)	p=
6p	Perte	0,0	11,4	0,032
8q	Gain	2,2	20,0	0,019
9q	Alt tot	8,7	28,6	0,035
11q	Alt tot	4,3	22,9	0,017
13q	Gain	0,0	11,4	0,032

Alt tot: Gain + Perte

Tableau 4. Altérations chromosomiques avec une fréquence significativement différente entre stades tumoraux pTa et pT1.

Bras chromosomique	Type altération	pTa (%)	pT1 (%)	p=
3p	Gain	0,0	12,5	0,024
5p	Alt tot	1,8	16,7	0,041
5q	Gain	0,0	12,5	0,024
5q	Alt tot	1,8	16,7	0,025
6p	Perte	0,0	16,7	0,006
8p	Perte	5,3	20,8	0,046
8q	Gain	3,5	25,0	0,007
9q	Alt tot	10,5	33,3	0,022
10p	Gain	0,0	12,5	0,024
11q	Gain	5,3	20,8	0,046
21q	Gain	0,0	12,5	0,024

Alt tot: Gain + Perte