

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 01/D3C/2019

N° de série : 01/BA/2019



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie**
Option : **Génétique Moléculaire**

Présentée et soutenue par : HIRECHE AHMED

Intitulé :

ÉTUDE GÉNÉTIQUE DU CANCER DE LA VESSIE

Membres du jury :

Président :

SATTA Dalila (Prof - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Directeur de thèse:

CHAOUI-KHEROUATOU Naouel (MCA- Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineurs :

ABADI Nouredine (Prof-Université Constantine 3).

SIFI Karima (Prof-Université Constantine 3).

REZGOUNE-CHELLAT Djalila (MCA- Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Année Universitaire 2017-2018

Remerciements

*Je remercie le Bon Dieu, tout puissant, de nous avoir permis de
réaliser ce modeste travail.*

Remerciements

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements et gratitude à ma directrice de thèse **Dr. CHAOUI-KHEROUATOU.N** pour m'avoir suivi, soutenu et orienté, et ce durant plus de six ans qui s'achèvent par la concrétisation de ce mémoire. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a témoignée en acceptant de diriger ce travail et pour avoir mis à ma disposition toute la richesse de son savoir et de son expérience. Je ne sais comment vous remercier et ma reconnaissance ne peut se mesurer à l'aide de quelque mot que ce soit.*

J'adresse mes remerciements les plus respectueux aux membres du jury pour le grand honneur qu'ils me font en acceptant d'examiner cette thèse :

*Tout d'abord j'adresse mes vifs remerciements au **Pr. SATTA. D**, responsable de la filière « Génétique » à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour sa générosité, sa bonté, son suivi, son dévouement et encouragements durant la réalisation de ce travail. Merci pour avoir toujours gardé un œil bienveillant sur l'avancée de mes travaux et avoir cru en moi. Je la remercie également pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.*

*Mes remerciements vont également au **Pr. ABADIN**, Professeur à l'Université Constantine 3, d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de siéger au jury de ma soutenance. Je le remercie vivement pour son accueil au sein de son laboratoire qui m'a ainsi permis de mettre un pied dans le monde de la recherche. Veuillez accepter Monsieur le témoignage de ma reconnaissance et de mon respectueux hommage.*

*Je voudrais aussi remercier **Pr. SIFI.K**, Professeur à l'Université Constantine 3, d'avoir accepté d'évaluer ma thèse et de siéger dans mon jury de soutenance. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance et de ma considération respectueuse.*

*J'adresse mes plus sincères remerciements au **Dr. REZGOUNE-CHELLAT.D**, Maître de conférences A à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail et de l'enrichir de ses éminentes compétences scientifiques.*

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce modeste travail en particulier Mme ARAS-RIBOUH.A, tout le personnel du Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire de l'université Constantine 3 ainsi que tout le personnel du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université Constantine 1.

*Un grand merci également à tout le personnel du Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Faculté des Sciences Boumerdes pour leurs aides dans la réalisation de plusieurs manipulations en particulier Melle **BOUJENET.F**. Je remercie chaleureusement tout le personnel du service d'Urologie du CHU de Tizi -Ouzou en particulier le **Pr. BELASLA.N** pour m'avoir ouvert les portes de son service. Merci aussi à tout le personnel de la clinique Rénal Daksi de Constantine en particulier le **Pr. DJAGHRI.T** et le **Pr. DAHDOUH.A** pour leurs implication très positive.*

*Ce travail est le résultat d'une collaboration avec le laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Institut Curie, Paris (France). Je tiens à remercier vivement mon directeur de stage, **Pr. RADVANYI. F**, pour m'avoir accepté dans son équipe, pour m'avoir accordé sa confiance et pour m'avoir permis de réaliser la majeure partie expérimentale de génotypage dans son laboratoire. Merci encore pour m'avoir guidé avec bienveillance et me faire sentir comme si j'étais chez moi durant toute la période de stage.*

*Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire d'Oncologie Moléculaire de l'institut Curie de Paris. Des gens formidables avec lesquelles j'ai passé six mois inoubliables, j'ai beaucoup appris avec eux sur le plan scientifique. Je remercie tout particulièrement **Ming-Jun** avec qui j'ai passé la plupart de mes journées, **Damien** pour ses précieux conseils en termes de Bio-informatique et Biostatistique, sans oublier **Clémentine**, **Céline** et **Daniella** qui m'ont énormément aidé sur le plan pratique.*

Enfin, à tous les patients et témoins qui ont accepté de participer à notre étude et toutes les personnes qui nous ont aidé et encouragé de près ou de loin, qu'elles trouvent ici l'expression de mes remerciements les plus chaleureux.

Dédicaces

*Je dédie cette thèse à mes très chers parents **Abdelkader et Akila**, pour leur présence en toutes circonstances et pour leurs sacrifices. Je vous offre toutes mes réussites et tous les mérites et je vous serez éternellement dévoué.*

*À la mémoire de mon oncle **Ahcen** qui était un deuxième père pour moi, tu resteras toujours dans mon cœur.*

À mes très chers frères et sœurs et ma belle-sœur, je vous remercie pour votre soutien, que ce travail soit pour vous un témoignage de l'expression de mes sentiments de reconnaissance et de respect.

*À mes grands-parents **Ahmed, Drifa et Aldja** je vous remercie pour vos prières.*

*À mes tantes **Bahia et Farida** merci pour votre soutien et encouragements.*

*À **Imene**, pour ses encouragements, et son soutien. Merci d'avoir été toujours présente.*

*À ma nièce **Kaoutar (Bakhta)** et mes neveux **Abdo et nounou**, Je vous adore.*

À mes très chères amis, merci pour votre soutien et motivations.

Table des matières

Remerciements et dédicaces

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des photographies

Liste des tableaux

Introduction.....1

Etude bibliographique

I. Anatomie de l'appareil urinaire4

I.1. Les reins4

I.2. Les voies urinaires4

I.3. La vessie4

II. Cancer de la vessie.....7

II.1. Epidémiologie du cancer de la vessie7

II.2. Facteurs de risque9

II.2.1. Facteurs de risque environnementaux9

II.2.1.1. Le tabac9

II.2.1.2. Les expositions professionnelles.....10

II.2.1.3. Facteurs alimentaires :.....10

II.2.1.4. Facteurs infectieux : infections chroniques et irritation.....11

II.2.1.5. Conditions médicales11

II.3. Susceptibilité génétique11

II.4. Classification des tumeurs vésicales12

II.4.1. Classification histologique12

II.4.2. Classification anatomopathologique13

II.4.2.1. Stade13

II.4.2.2. Grade15

II.4.3. Les voies de progression.....15

II.5. Signes cliniques, diagnostic et traitement17

II.5.1. Signes cliniques17

II.5.2. Diagnostic...	18
II.5.3. Traitement	19
III. Caractérisation moléculaire des tumeurs vésicales	20
III.1. Aberrations chromosomiques.....	20
III.1.1. Les duplications	20
III.1.2. Les délétions	21
III.2. Mutations ponctuelles	21
III.2.1. Le gène <i>P53</i>	21
III.2.2. Le gène <i>Rb1</i>	22
III.2.3. Les gènes de la famille <i>RAS</i>	22
III.2.4. Le gène <i>FGFR3</i>	22
III.2.5. Le gène <i>TACC3</i>	23
III.3. Les glutathion-S-transférases (<i>GST</i>).....	24
III.3.1. <i>GSTM1</i> , gène et enzyme	25
III.3.1.1. Structure du gène <i>GSTM1</i>	25
III.3.1.2. Polymorphismes	26
III.3.1.3. Fréquence du génotype <i>GSTM1 nul</i>	27
III.3.1.4. Structure et substrats de l'enzyme <i>GSTM1</i>	27
III.3.2. <i>GSTT1</i> , gène et enzyme	28
III.3.2.1. Position et structure du gène <i>GSTT1</i>	28
III.3.2.2. Polymorphismes	29
III.3.2.3. Fréquence du génotype <i>GSTT1 nul</i>	29
III.3.2.4. Structure et substrats de l'enzyme <i>GSTT1</i>	30
III.4. Les facteurs épigénétiques	30

Partie expérimentale : Patients et méthodes

I. Population d'étude.....	31
I.1. Patients	31
I.2. Témoins	31
II. Méthodes	32
II.1. Prélèvement sanguin	32
II.2. Extraction de l'ADN génomique	32
II.2.1.Principe	32

II.2.2. Estimation de la concentration de l'ADN et contrôle de sa qualité	32
II.2.3. Estimation qualitative et semi-quantitative de l'ADN extrait par électrophorèse sur gel d'agarose	33
II.2.4. Dilution de la concentration d'ADN extrait	34
II.3. Analyse génétique	34
II.3.1. Recherche des délétions des gènes glutathion-S-transférases (<i>GSTM1</i> et <i>GSTT1</i>) par PCR multiplex	34
II.3.1.1. Principe de l'amplification par PCR Multiplexe.....	34
II.3.1.2. Amorces utilisées	35
II.3.1.3. Conditions pratiques de l'amplification.....	35
II.3.1.4. Révélation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose	36
II.4. Etude du polymorphisme rs798766 du gène <i>TACC3</i> par séquençage et QPCR.....	36
II.4.1. Séquençage	36
II.4.1.1. Principe	36
II.4.1.2. Mode opératoire	37
II.4.2. Méthode de génotypage par discrimination allélique TaqMan (QPCR).....	40
II.4.2.1. Principe	40
II.4.2.2. Mode opératoire	41
II.5. Analyse statistique	42
II.5.1. Calcul de l'Odds Ratio	43
II.5.2. La valeur p (<i>p-value</i>).....	43

Résultats et discussions

I. Caractéristiques générales de la population d'étude	45
I.1. Age et sexe	45
I.2. Statut tabagique	48
I.3. Données cliniques	51
II. Analyse des polymorphismes des gènes <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> par PCR multiplex et leurs interactions avec la consommation de tabac et les paramètres clinicopathologiques..	53
II.1. Fréquences des <i>GST</i> et association avec le cancer de la vessie	53

II.2. Distribution des génotypes <i>GSTM1 0/0</i> et <i>GSTT1 0/0</i> selon l'âge.....	56
II.3. Combinaison <i>GST</i> -tabac et association au risque du cancer de la vessie	57
II.3.1. Cigarette	57
II.3.2. Tabac à priser.....	59
II.4. Interaction des polymorphismes des gènes <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> avec les paramètres clinico-pathologiques	61
II.5. Association des délétions des gènes <i>GST</i> -cigarette-récidive des tumeurs	61
III. Etude du polymorphisme rs798766 sur le gène <i>TACC3</i>	63
III.1. Génotypage par séquençage	63
III.1.1. Amplification de la région du gène <i>TACC3</i> portant le polymorphisme rs798766 ..	63
III.1.2. Séquençage	64
III.2. Génotypage par la QPCR	65
III.3. Les ADN non déterminés par le logiciel LightCycler 480	66
III.4. Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme rs798766 et association avec le cancer de la vessie	67
III.5. Distribution des génotypes rs798766 selon l'âge.....	69
III.6. Combinaison rs798766-tabac et leurs associations avec le risque du cancer vésical	70
III.6.1. Cigarette	70
III.6.2. Tabac à priser	71
III.7. Interaction entre le polymorphisme rs798766 et les paramètres clinico-pathologiques	72
III.8. Association entre le polymorphisme rs798766 et la récurrence des tumeurs	73
IV. L'effet combiné des trois polymorphismes étudiés (allèle T du polymorphisme rs798766, <i>GSTM1 0/0</i> et <i>GSTT10/0</i>).....	74
Conclusion et perspectives.....	75
Références bibliographiques.....	78
Annexes	
Publications	
Résumés	

Liste des abréviations

AR : Androgènes Receptor : récepteur aux androgènes.

BET : Bromure d'ETHidium.

BRCA1 : Breast Cancer 1.

CCND1 : Cycline D1.

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer.

ddNTP : di-désoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphates.

dNTP : désoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphates.

DO : Densité Optique.

ECBU : Examen Cytobactériologique d'Urine.

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor.

ERBB2 : Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase.

ERCC1 : Excision Repair Cross Complementation group 1.

EDTA : Ethylène Diamine Tetra-Acetic.

FGFR3 : Fibroblast Growth Factor Receptor-3.

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer.

GSTM1 : Glutathion S-Transférase mu 1.

GSTT1 : Glutathion S-Transférase theta 1.

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique.

M1- : Glutathion S-Transférase mu 1 délété.

M1+ : Glutathion S-Transférase mu 1 positive.

MTHFR : Méthylène Tetra-Hydro-Folate Reductase.

MS : Methionine Synthase.

NaCl : Chlorure de Sodium.

NAT : N- Acétyltransférases.

NAT2 : N-Acétyltransférase 2.

NCBI : National Center for Biotechnology Information.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

OR : Odds Ratio.

PCR : Polymerase Chain Reaction : amplification en chaîne par polymérase.

QPCR : PCR Quantitative.

RARB : Retinoic Acid Receptor Beta.

SNP : Single Nucleotide Polymorphism.

T1- : Glutathion S-Transférase theta 1 délété.

T1+ : Glutathion S-Transférase theta 1 positive.

TACC3 : Transforming Acidic Coiled-coil-Containing protein 3.

TNM : (classification) Tumor, Node, Metastasis : tumeur, ganglion, métastases.

TVIM : Tumeur Vésicale Infiltrant le Muscle.

TVNIM : Tumeur Vésicale Non Infiltrant le Muscle.

UICC : l'Union Internationale Contre le Cancer.

UV : Ultra-Violet.

WHO : World Health Organisation.

WT1 : Wilms Tumor 1.

XPC : Xeroderma Pigmentosum group C.

XRCC1 : X-Ray Repair Cross Complementing 1.

XRCC3 : X-Ray Repair Cross Complementing 3.

Liste des figures

Figure 1 :	Schéma montrant l'anatomie de l'appareil uro-génital chez l'homme et la localisation de la vessie chez les deux sexes.	5
Figure 2 :	Schéma montrant les différentes couches de la paroi vésicale.....	6
Figure 3 :	Taux d'incidence du cancer de la vessie dans le monde répartie par sexe et localisation géographique.....	8
Figure 4 :	Classification des stades des tumeurs de la vessie.....	15
Figure 5 :	Types histologiques et voies de progression des tumeurs vésicales.....	17
Figure 6 :	Fréquences des mutations des gènes <i>FGFR3</i> et <i>TP53</i> dans les deux voies de progression des tumeurs vésicales.....	23
Figure 7 :	Position et structure du gène <i>TACC3</i>	24
Figure 8 :	Position et structure du gène <i>GSTM1</i>	26
Figure 9 :	Mécanisme d'apparition de la délétion <i>GSTM1</i>	27
Figure 10 :	Structure de l'enzyme GSTM1.....	28
Figure 11 :	Position et structure du gène <i>GSTT1</i>	29
Figure 12 :	Principes de génotypage par discrimination allélique TaqMan.....	41
Figure 13 :	Répartition des patients selon l'âge du diagnostic.....	48
Figure 14 :	Répartition des tumeurs étudiées selon le grade et le stade tumoral.....	51
Figure 15 :	Répartition des récurrences des tumeurs vésicales.....	52
Figure 16 :	Profil des génotypes possibles du polymorphisme rs798766 obtenus par séquençage d'un fragment de l'intron 5 du gène <i>TACC3</i>	64
Figure 17 :	Profil d'amplification par QPCR analysé par le logiciel LightCycler 480 obtenu après amplification de la région de gène <i>TACC3</i> contenant le polymorphisme rs798766 de 3 échantillons.....	65
Figure 18 :	Profils d'amplifications par QPCR des ADN des deux groupes patients et témoins.....	66
Figure 19 :	Comparaison entre les profils obtenus par QPCR et séquençage des échantillons P1 et T1.. ..	67

Liste des photographies

- Photographie 1 :** Exemple d'estimation qualitative et semi-quantitative de quelques ADN génomiques des patients..... .33
- Photographie 2 :** Electrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR des gènes *GSTM1* (230 pb), *GSTT1* (480 pb) et de la β globuline (110 pb).....36
- Photographie 3 :** Analyses des délétions *GSTM1*, *GSTT1* par PCR multiplex..... .54

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Classification TNM 2010 du cancer de la vessie.....	14
Tableau 2 :	Tumeurs superficielles classées selon leur risque évolutif.....	16
Tableau 3 :	Séquences des oligonucléotides des amorces utilisées pour l'amplification des gènes <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> et β globuline par PCR multiplex.....	35
Tableau 4 :	Séquences des oligonucléotides utilisées pour l'amplification du gène <i>TAAC3</i> par PCR classique.....	37
Tableau 5 :	Protocole de purification du fragment amplifié.....	38
Tableau 6 :	Les compositions d'un mix réactionnel d'un volume final du 10 μ l et le programme de l'amplification de la PCR séquence.....	39
Tableau 7 :	Mix de la QPCR réalisé dans un volume final de 10 μ l.....	41
Tableau 8 :	Tableau de contingence croisé.....	43
Tableau 9 :	Caractéristiques générales de la population d'étude.....	46
Tableau 10 :	Informations générales du statut tabagique de la population d'étude.....	49
Tableau 11 :	Statut tabagique (consommation du tabac à priser).....	50
Tableau 12 :	Fréquences génotypiques des gènes <i>GSTM1</i> et <i>GSTT1</i> dans la population d'étude.....	55
Tableau 13 :	Association du génotype <i>GSTM1</i> et/ou <i>GSTT1</i> avec l'âge.....	57
Tableau 14 :	Stratification des patients et des témoins selon les génotypes <i>GST</i> et le statut tabagique (cigarettes).....	58
Tableau 15 :	Stratification des patients et des témoins selon les génotypes <i>GST</i> et le statut tabagique (tabac à priser).....	60
Tableau 16 :	Distributions des délétions des gènes <i>GSTM1</i> et <i>GSTT1</i> selon les stades et grades des tumeurs	61
Tableau 17 :	Associations des génotypes des gènes <i>GSTM1</i> et <i>GSTT1</i> au risque de récurrence : combinaisons gène-gène et gènes-cigarettes	62
Tableau 18 :	Résultat du génotypage du polymorphisme rs798766 par séquençage.....	65
Tableau 19 :	Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme rs798766 dans la population d'étude.....	68
Tableau 20 :	Association des génotypes du polymorphisme rs798766 avec l'âge.....	70

Tableau 21:	Stratification des patients et des témoins selon les génotypes du polymorphisme rs798766 et le statut tabagique (cigarettes).....	71
Tableau 22 :	Stratification des patients et des témoins selon les génotypes du polymorphisme rs798766 et le statut tabagique (tabac à priser).....	72
Tableau 23 :	Répartition des génotypes du polymorphisme rs798766 selon les grades des tumeurs.....	73
Tableau 24 :	Association entre génotypes du polymorphisme rs798766 et risque de récurrence.....	73
Tableau 25 :	Effet combiné des délétions <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> , de l'allèle [T] du polymorphisme rs798766, de la consommation du tabac et association au risque du cancer vésical.	74

Introduction :

Le terme général « cancer » regroupe une large diversité de maladies dont le cancer de la vessie. Le cancer en général est un problème de santé redouté, souvent perçu comme la pire des maladies et il représente un défi majeur en matière de recherches scientifiques.

Dès l'initiation de la cancérogenèse et tout au long de la progression tumorale, les cellules d'une tumeur subissent des altérations moléculaires multiples ayant des conséquences sur leurs propriétés biologiques. Hanahan & Weinberg en 2000 (1) ont proposé un concept identifiant les six capacités ou « hallmarks » qu'une cellule acquiert pour devenir tumorale puis maligne et enfin métastatique au stade ultime. Pour assurer l'homéostasie tissulaire les tissus normaux contrôlent strictement la production et la sécrétion des signaux permettant l'entrée, la progression et la sortie du cycle cellulaire mais aussi le nombre de divisions et la mort cellulaire. Les cellules cancéreuses pour proliférer de façon autonome et infinie doivent : entretenir les signaux de prolifération ; se soustraire aux signaux bloquant la prolifération ; résister à la mort cellulaire ; devenir immortelles ; induire l'angiogenèse pour avoir accès à l'oxygène et aux nutriments ; devenir invasive et métastaser. L'acquisition de ces capacités est progressive et l'évolution d'une cellule « normale » pour devenir une cellule « maligne » est un processus multi-étapes.

Le cancer vésical est une maladie multifactorielle causée conjointement par un grand nombre de facteurs génétiques et environnementaux en plus des effets d'interaction entre ces facteurs.

Parmi les facteurs les plus importants qui peuvent initier ce processus est le métabolisme limité des xénobiotiques. Ces derniers sont des substances exogènes d'origines diverses. Il peut s'agir de produits naturels, de médicaments, de polluants de l'environnement : toxines végétales et animales, additifs alimentaires, herbicides, pesticides, dérivés des combustibles domestiques et industriels, solvants et colorants.

En effet, les voies de biotransformation aboutissent normalement, après une exposition à un xénobiotique, à la formation de métabolites faciles à éliminer. Cependant le métabolisme limité pendant la phase I et II de détoxification augmente les concentrations des xénobiotiques favorisant leurs liaisons à l'ADN en formant un complexe physique connu sous le nom d'adduits (2). Il arrive aussi qu'à l'issue de la première phase du métabolisme et à la suite de l'action des enzymes spécifiques de cette phase I, il se forme des métabolites appelés métabolites fonctionnalisés doués d'une forte réactivité capables de se fixer de façon covalente et stable sur les acides nucléiques, en formant des adduits pouvant produire des mutations et

initier ainsi le processus cancéreux (2). Ainsi, certains procarcinogènes chimiques peuvent être à l'origine de tumeurs dans les tissus cibles excrétoires comme la vessie, en particulier dans le cas de défaillance dans les mécanismes de détoxification qui peut être causé par des altérations sur plusieurs gènes comme le gène du cytochrome *P450* impliqué dans la phase I et les gènes de la famille N -Acétyltransférases (NAT) et de la famille Glutathion S-Transférases (*GST*) impliqués dans la phase II de détoxification.

Sur le plan génétique, le cancer de la vessie présente une forte hétérogénéité, avec au moins une trentaine de polymorphismes/gènes identifiés jusqu'à aujourd'hui, parmi ces gènes nous citons les gènes de détoxification de la famille Glutathion S-Transférases *GSTM1* et *GSTT1*, le gène *TACC3* (Transforming Acid Coiled- coil- Containing protein 3) impliqué dans la stabilité des microtubules du fuseau mitotique et le gène *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor-3) qui code pour une tyrosine kinase transmembranaire. Il est indispensable de mieux connaître les événements moléculaires qui déterminent le mécanisme de progression tumorale afin d'identifier des marqueurs biologiques permettant d'établir non seulement des marqueurs pronostiques mais aussi des critères diagnostiques et de nouvelles cibles thérapeutiques.

Cependant les fréquences des variants à risque et leurs degrés d'implication dans la carcinogénèse vésicale sont variables selon plusieurs critères comme l'origine ethnique et le mode de vie.

En ce qui concerne notre population algérienne, aucune étude moléculaire concernant ce type de cancer n'est rapporté à l'exception de l'étude de Chaoui *et al.*(3) cherchant l'association entre le polymorphisme *MTHFR* C677T impliqué dans le métabolisme du folate et la carcinogénèse vésicale. Les résultats ont montré que le risque serait accru suite à l'effet additif du polymorphisme étudié, du tabac et de l'exposition professionnelle. Ainsi, les génotypes associés au cancer de la vessie, leurs fréquences, leurs degrés d'associations, leurs interactions entre eux et avec les facteurs environnementaux et leurs effets sur la récurrence et la progression de la maladie, toutes ces informations n'ont pas été étudiés dans notre population.

Dans ce contexte, notre travail vise à réaliser une étude cas-témoins sur des patients atteints du cancer de la vessie et des témoins sains par l'analyse génétique et statistique de plusieurs polymorphismes. Après une recherche bibliographique rigoureuse, nous nous sommes donné comme objectifs l'exploration moléculaire des gènes *GSTM1*, *GSTT1* et *TACC3* en cherchant les délétions des deux premiers gènes par PCR multiplex ainsi que le génotypage du polymorphisme rs798766 sur le gène *TACC3* par discrimination allélique TaqMan, afin de

rechercher une éventuelle étiologie génétique du cancer de la vessie, de prospecter l'interaction de ces variations entre elles et avec les facteurs environnementaux comme le tabac, mais également de déterminer les fréquences des variations étudiées dans notre population générale et les comparer à ceux rapportées par la littérature.

I. Anatomie de l'appareil urinaire :

L'appareil urinaire représente l'ensemble des organes qui élaborent l'urine et l'évacuent hors du corps. Il comprend les deux reins et les voies urinaires, avec des différences anatomiques chez l'homme et chez la femme (4, 5) (Figure 1).

I.1. Les reins :

Situés de chaque côté de la colonne vertébrale au niveau de la 11^{ème} et la 12^{ème} côte, juste au-dessus de l'ombilic. Ils assurent plusieurs fonctions vitales dont la production des urines (4).

I.2. Les voies urinaires :

Elles sont constituées par l'ensemble des conduits que l'urine traverse depuis les reins jusqu'au milieu extérieur. Après que l'urine quitte le rein, il s'écoule dans un long conduit appelé l'uretère, sa longueur est d'environ 25 cm avec un diamètre entre 3 et 5 mm. Il y a deux uretères, chacun liant un rein à la vessie où l'urine s'accumule (6, 7).

L'expulsion de l'urine se fait par un unique conduit tubulaire, l'urètre. C'est à ce niveau qu'on remarque des différences entre les deux sexes : chez l'homme l'urètre est long de 16 cm en moyenne et son trajet comporte différentes portions et il débouche à l'extrémité du pénis alors que chez la femme il est plus court (3 à 5 cm) et son ouverture se trouve en avant des orifices du vagin et de l'anus (4, 7, 8) (Figure 1).

I.3. La vessie :

I.3.1. Description :

La vessie est un sac musculomembraneux située dans la cavité pelvienne, qui a pour rôle de stocker l'urine avant la miction. Lorsqu'elle est vide, elle se trouve en arrière de la symphyse pubienne et elle s'élève dans la cavité abdominale lorsqu'elle se remplit. Sa capacité est variable : en moyenne le besoin d'uriner est ressenti pour une contenance de 300 ml environ mais la vessie est très extensible et sa capacité maximum peut être plus grande. Elle peut contenir plus d'un litre mais elle est alors très distendue douloureuse et facilement palpable dans l'abdomen (8).

Chez la femme, la vessie est proche de l'utérus et du vagin alors que chez l'homme elle est proche de la prostate et du rectum. Les rapports de la vessie avec les organes adjacents se modifient avec le remplissage à la fois de la vessie et du rectum (7, 9) (Figure 1).

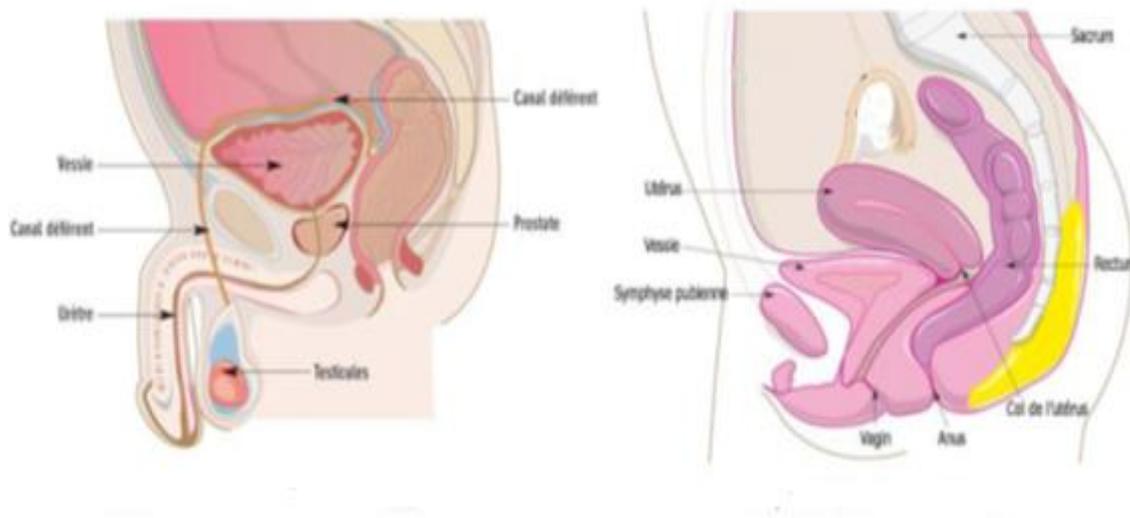


Figure 1 : Schéma montrant l'anatomie de l'appareil uro-génital chez l'Homme et la localisation de la vessie chez les deux sexes (10).

I.3.2.Histologie :

La paroi vésicale est constituée de trois couches tissulaires (Figure 2):

I.3.2.1.La muqueuse ou l'urothélium :

Elle forme le revêtement de la vessie et des autres voies urinaires. C'est un épithélium pluristratifié possédant une strate basale, une strate intermédiaire et une strate superficielle (11).

Les cellules basales sont de petites cellules cubiques d'environ 10 μm qui forment une monocouche en contact avec le tissu conjonctif et servent de précurseurs pour les autres types cellulaires. Les cellules intermédiaires dites en raquettes reposant sur la couche basale sont de (10-25 μm) et sont orientées vers la lumière vésicale. L'épaisseur de la couche de cellules intermédiaires peut varier d'une seule couche à une dizaine. Les cellules superficielles recouvrent les cellules intermédiaires d'où leurs noms de cellules recouvrantes, cellules ombrelles ou en parapluie. Ces dernières sont de grandes cellules (25-250 μm) multinucléées, différenciées et caractérisées par leurs jonctions serrées, ainsi que la synthèse et la sécrétion de glycosaminoglycanes formant le glycocalyx, contribuant à l'imperméabilité de la vessie (12).

Les nombreux replis formant l'urothélium, le rendent capable de s'adapter à des variations importantes de surface dues au remplissage et à la vidange de l'organe et capable également de supporter la toxicité de l'urine (13).

I.3.2.2. Le chorion ou Lamina propria :

Il est composé d'une lame de tissu conjonctif et de vaisseaux sanguins, située entre l'urothélium et la musculuse (13).

I.3.2.3. Le tissu musculaire ou détrusor :

L'urothélium est enveloppé par trois couches musculaires lisses mal délimitées, longitudinale interne, circulaire externe, et longitudinale externe. Cette disposition permet une contraction vésicale uniforme lors de la miction (14).

I.3.2.4. L'adventice :

Elle correspond au tissu adipeux entourant le détrusor contenant des vaisseaux sanguins, lymphatiques et des nerfs.

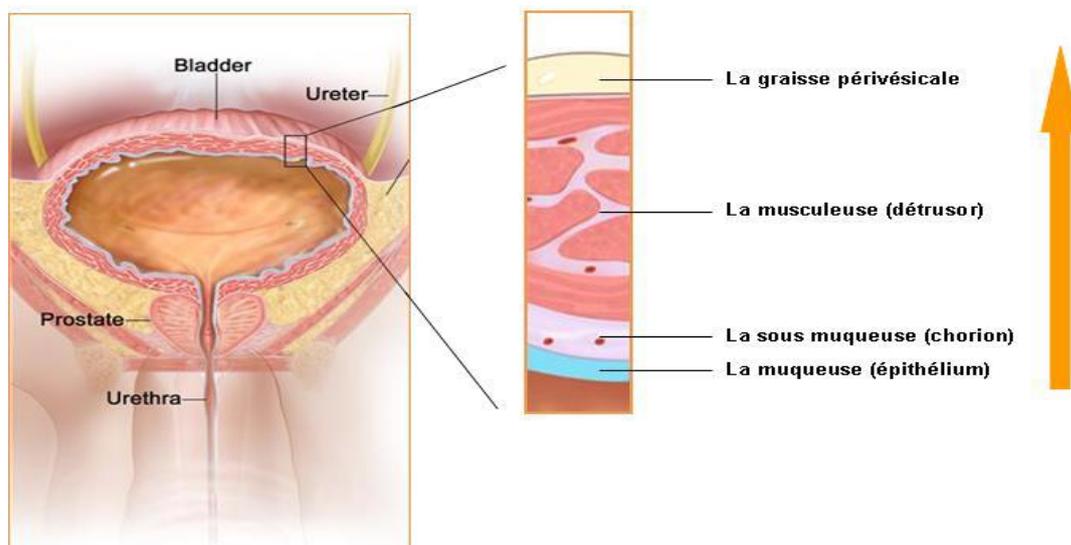


Figure 2 : Schéma montrant les différentes couches de la paroi vésicale (14).

II. Cancer de la vessie :

Le cancer est un problème de préoccupation de santé publique dans le monde. Le cancer vésical est une tumeur qui se développe au détriment de la muqueuse de la vessie. C'est une pathologie multifactorielle qui peut être bénigne ou évoluer rapidement en tumeur maligne. Considéré comme l'un des cancers malveillants les plus communs dans le monde, il représente le cancer le plus fréquent des voies excrétrices urinaires (15) et le 2^{ème} cancer du tractus génito-urinaire après le cancer de la prostate (16-18).

II.1. Epidémiologie du cancer de la vessie :

L'incidence du cancer de la vessie a marqué une augmentation remarquable durant ces dernières années. En effet, en 2003 cette augmentation a été estimée à environ 1% par an durant la période de 1960 et 2003 et de ce fait ce type de cancer est passé de la 11^{ème} cause de cancer dans le monde en 2003 (19) à la 9^{ème} cause en 2009 (20). Il représente le 7^{ème} cancer en fréquence chez les hommes et le 17^{ème} chez les femmes (21).

En 2008, 386 300 nouveaux cas ont été diagnostiqués dans le monde avec 150 200 décès (18, 22). Le taux de mortalité le plus élevé a été enregistré chez les hommes Egyptiens (16,3/100.000 personnes) (18). En 2012, le nombre de nouveaux cas diagnostiqués a augmenté et a atteint 429.800 avec 165.100 décès en précisant que le taux de mortalité le plus élevé a été enregistré cette fois-ci en Turquie (12,8/100.000 personnes) (16).

L'incidence du cancer vésicale varie considérablement selon la localisation géographique et les différences ethniques (23). Les taux d'incidences les plus élevés ont été observés surtout, en Europe, Amérique du nord, Asie occidentale et Afrique de nord (16, 18, 21) (Figure 3).

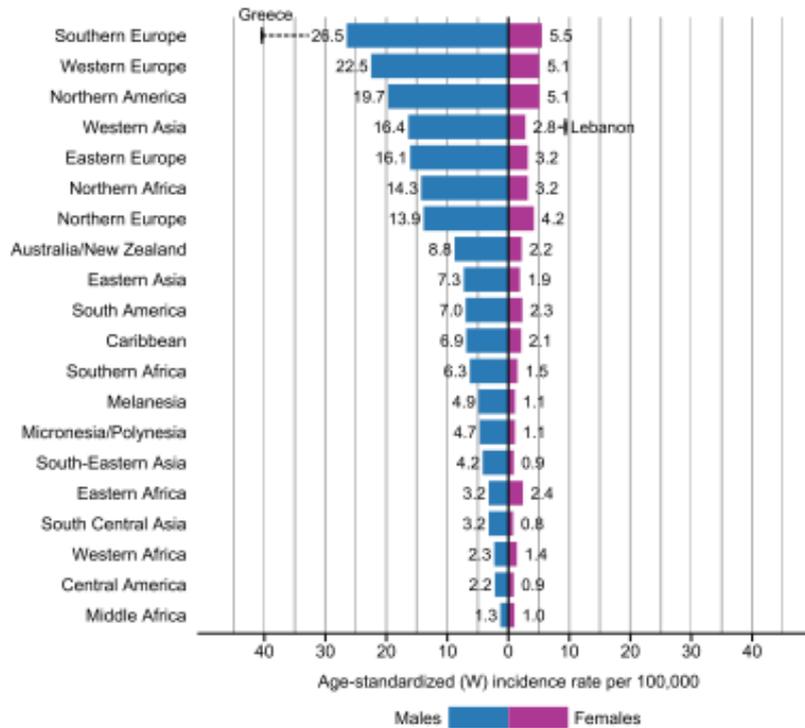


Figure 3 : Taux d'incidence du cancer de la vessie dans le monde répartis par sexe et localisation géographique (24).

Le cancer de la vessie représente la 10^{ème} cause de cancer chez les deux sexes dans le monde Avec plus que 500.000 nouveaux cas et environ 200.000 décès en 2018 (24). il est compté comme la 6^{ème} cause de cancers chez les populations nord africaines avec un taux de mortalité de 7,4/100.000 personnes (21). Il occupe, par conséquent, la 3^{ème} place par ordre de fréquence chez les hommes (14,3/100.000 personnes) (21).

En Algérie, le taux d'incidence du cancer de la vessie augmente de façon significative, il est passé de 1,6/100.000 personnes entre 1986 et 1990 à 10,3/100.000 personnes chez les hommes entre 2006 et 2010 (25, 26) et de 0,2 à 1,2/100.000 personnes chez les femmes durant les mêmes périodes. Durant la période 2006/ 2010, il a représenté 9,1% de l'ensemble des cancers incidents et 55% des cancers urologiques (25). D'après les données de globocan 2018 ce cancer occupe la 6^{ème} place par ordre de fréquence en Algérie avec une incidence de 7,5/100 000 habitants et un taux de mortalité de 3,4/100 000 (27). Chez les hommes Algériens le cancer vésical se situe au 3eme rang d'incidence après le cancer des poumons et le cancer colorectal avec une élévation du taux d'incidence a 13/100 000 et du taux de mortalité a 5,8/100 000 habitants (27).

II.2. Facteurs de risque :

La cause exacte d'apparition du cancer de la vessie n'est pas encore connue. Cependant, l'étiologie de ce type de cancer semble associée à plusieurs facteurs de risque. L'âge et le sexe représentent des facteurs de risque très importants (28, 29). En effet, 90% des cas diagnostiqués sont des patients de plus de 55 ans avec un âge moyen au diagnostic de 73 ans (30). En terme de sexe, il a été rapporté que l'incidence du cancer vésical chez les hommes est beaucoup plus élevée que celle des femmes (16, 18, 21); certaines études ont rapporté que l'incidence chez les hommes était 4 fois plus élevée. Cependant, les taux de mortalité chez les femmes sont plus élevés que chez les hommes (31). Les raisons relatives à ce dernier point restent inconnues.

L'ethnicité, déjà évoqué antérieurement, semble être également un facteur de risque du cancer de la vessie (28). En effet, les taux d'incidence les plus élevés sont observés en Europe, Amérique du nord et Afrique du nord (16, 18, 21), tandis que les taux les plus faibles sont retrouvés en Amérique du sud, Asie et Afrique subsaharienne (32).

Les caractères sexuels (différences anatomiques) sont aussi impliqués tels que les habitudes de miction, et les facteurs hormonaux (33).

D'autres facteurs sont également associés à l'étiologie du cancer de la vessie tels que les facteurs environnementaux et la susceptibilité génétique.

II.2.1. Facteurs de risque environnementaux :

En fonction du rôle de la vessie dans la collecte des urines avant la miction, elle se trouve en contact avec plusieurs agents exogènes qui peuvent représenter un facteur de risque pour le développement d'un cancer. Parmi les facteurs les plus impliqués nous citons :

II.2.1.1. Le tabac :

L'inhalation de la fumée du tabac est considérée comme le plus important facteur de risque exogène pour le cancer de la vessie chez les deux sexes (34, 35). Le risque chez les fumeurs est considéré 4 fois plus élevé par rapport au non-fumeurs (35). Il a été aussi démontré, que la consommation de cigarette, est associée au cancer de la vessie dans 50% des cas chez l'homme et 35% des cas chez la femme (36). En effet, la combustion du tabac libère au moins 69 agents cancérigènes connus, y compris les nitrosamines, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), 2 naphtylamines et d'autres amines aromatiques (29, 37), qui sont aussi présents dans l'urine des fumeurs (38) et seraient responsables de mutations géniques des cellules épithéliales conduisant à l'apparition de cellules cancéreuses (29, 37, 39). Le risque augmente avec le

nombre de cigarettes fumées, la durée du tabagisme et le degré d'inhalation de la fumée (33). Toutefois, l'arrêt du tabagisme réduirait le risque à 40% au bout d'un an mais ce risque persiste quand même jusqu'à 25 ans après le sevrage tabagique (39).

II.2.1.2. Les expositions professionnelles :

Le second facteur de risque le plus important du cancer de la vessie est l'exposition professionnelle régulière et prolongée à certains produits chimiques tels que les amines aromatiques, les HAP et les Nitrosamines (28, 29, 39).

L'exposition à ces produits chimiques est également constatée dans le cadre de certaines professions des secteurs de la peinture, du cuir, de l'automobile, du métal, du papier, du caoutchouc et des produits pétroliers, mais aussi chez les conducteurs de camions, les teinturiers, les techniciens dentaires, les coiffeurs et plombiers (39). L'industrie des colorants à base d'aniline ou de binzidine, et d'autres produits chimiques tels que ceux liés à la fabrication et développement des films photographiques, dérivés chlorés présents dans l'eau des piscines, sel de cadmium ...etc, ont été aussi signalés à être causalement liés au cancer de la vessie (39).

II.2.1.3. Facteurs alimentaires :

Le manque d'apport hydrique adéquat, en particulier d'eau, augmente le risque du cancer de la vessie. La vacance de la vessie semble provoquer une accumulation de produits chimiques en raison du retard dans l'élimination des déchets de la vessie, ce qui entraîne un risque accru de cancers vésicaux. En d'autres termes, augmenter la quantité de liquide absorbé (par exemple en diluant l'urine) et augmenter la miction permettra de réduire l'exposition du tissu urothéliale aux carcinogènes (40).

Selon le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), l'arsenic sous sa forme inorganique est classé cancérigène pour l'homme. Il est admis que la présence de l'arsenic dans l'eau potable est un facteur de risque pour les cancers vésicaux dans de nombreux pays du monde (41).

La prise de compléments nutritionnels contenant de l'acide aristolochique (de la famille *Aristolochia*) a été également associée à un risque accru du cancer de la vessie (42).

L'implication de la consommation d'alcool dans l'apparition du cancer vésical a été un sujet de débat depuis toujours, la méta-analyse de Pelucchi *et al.* (43) a démontré que parmi 19 études réalisées entre 1983 et 2009 deux seulement ont révélé une association entre la consommation d'alcool et le risque de développer un cancer de la vessie (44, 45).

Aucun lien n'a été retrouvé entre la consommation de café ou de thé et la carcinogénèse vésicale (46).

II.2.1.4. Facteurs infectieux : infections chroniques et irritation :

Les infections urinaires chroniques ont également été impliquées dans le développement d'un cancer vésical en particulier chez les femmes et les patients portant des lésions médullaires (20). La *Schistosoma Haematobium* est la cause principale des infections urinaires (bilharziose) associées au cancer de la vessie (47). Dans les pays en voie de développement, en particulier en Afrique et le Moyen-Orient, l'infection urinaire chronique causée par *Schistosoma Haematobium* est associée à environ 50% des cas de cancer de la vessie (18).

L'irritation chronique de la vessie causée par une sonde à demeure ou des calculs vésicaux présente également un facteur de risque (48).

II.2.1.5. Conditions médicales :

Comme pour la plupart des cancers, les radiations ionisantes augmentent le risque de développer un cancer de la vessie (29). En effet, il a été rapporté que les tumeurs secondaires à la radiothérapie sont généralement de haut grade et localement avancées au moment du diagnostic (49).

L'administration antérieure de certaines chimiothérapies notamment à base de chlornaphazine (50) ou de cyclophosphamide (51) ainsi que la consommation massive d'agents analgésiques contenant de la phénacétine (52) sont des facteurs favorisant la survenue du cancer de la vessie.

II.3. Susceptibilité génétique :

La susceptibilité de chaque individu par rapport au risque du cancer de la vessie est liée à l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques, dans le métabolisme du folate, dans la réparation de l'ADN etc. L'expression de ces gènes est elle-même modulée par le polymorphisme génétique porté par ces gènes et les facteurs environnementaux. Malgré que plusieurs études pangénomiques sur les prédispositions génétiques liées à la survenue du cancer vésical sont toujours en progression, certains gènes impliqués dans le métabolisme des substances exogènes ont été déjà associés au cancer de la vessie notamment ceux codant la N -Acétyltransférase (*NAT*) présentant le profil « acétyleur lent » et ceux codant les Glutathion S-Transférases (*GST*) incluant les délétions des gènes Glutathion S-Transférases mu 1 (*GSTM1*) et ou Glutathion S-Transférases theta 1 (*GSTT1*) (53-

56). Par ailleurs, il a été rapporté que l'association entre *GSTM1 nul*, *NAT2* acétyleur lent et tabagisme confère un risque accru à la carcinogénèse vésicale (57, 58).

Des études menées sur les polymorphismes des gènes des systèmes de réparation de l'ADN et leur impact sur la survenue du cancer vésical ont montré que la substitution *XPC* Ala499Val augmente considérablement le risque du cancer de la vessie (59). De même pour le polymorphisme du gène *ERCC1* (Lys8092Gln) influençant le développement du cancer de la vessie dans les modèles co-dominants et récessifs (60). Les résultats de certaines méta-analyses ont suggéré aussi que le polymorphisme *XRCC3* (Thr241Met), *XRCC1* (Arg399Gln) et *XRCC1*(Arg280His) étaient associés à un risque accru de cancer de la vessie, en particulier chez les Asiatiques (61, 62).

Concernant les gènes impliqués dans le métabolisme des folates, des études préalables ont montré que les polymorphismes des gènes *MTHFR* et *MS* combinés à une faible prise de folate et une consommation de tabac augmentent fortement le risque de la carcinogénèse vésicale (63).

II.4. Classification des tumeurs vésicales :

II.4.1. Classification histologique :

Du point de vue histologique les tumeurs vésicales peuvent se présenter sous différents types. Le type le plus fréquent est le carcinome transitionnel (urothélial) qui se forme dans l'urothélium avec une fréquence de 90% de toutes les tumeurs de vessie. Il se caractérise par une différenciation cellulaire (grade histologique) et un degré d'infiltration (stade T). Dans ce contexte, ce carcinome peut être non infiltrant restreint aux couches superficielles de la paroi de la vessie (TVNIM) ou infiltrant s'il envahisse le muscle vésical (TVIM).

Les autres types histologiques sont plus rares et englobent 10 % des tumeurs vésicales. On compte en premier lieu les carcinomes à cellules squameuses ou épidermoïdes dans 5 % des cas, liés généralement à la schistomiase. Les adénocarcinomes représentent de 0,5 % à 2% des tumeurs malignes de vessie. Enfin, les cancers à cellules indifférenciées (environ 1%) qui regroupent tous les autres cancers y compris les cancers à petites cellules qui représentent 0,5% à 1% des cancers de la vessie (64, 65).

II.4.2. Classification anatomopathologique :

Le classement des tumeurs en général représente un avantage pour la compréhension de la maladie et un meilleur diagnostic et suivi thérapeutique. Cette classification repose principalement sur le stade et le grade de la tumeur.

II.4.2.1. Stade :

Les médecins utilisent les stades du cancer pour estimer l'étendue du cancer et le pronostic du patient. La classification TNM est couramment utilisée. Le « T » représente la taille de la tumeur et invasion des tissus avoisinants. Le suffixe « m » doit être ajouté à la catégorie T appropriée pour indiquer l'existence des tumeurs multiples. Le suffixe « is » peut être ajouté à toute catégorie T pour indiquer l'existence de carcinome *in situ* associé. Le « N » pour l'atteinte des ganglions lymphatiques et enfin le « M » qui indique la présence de métastases ou propagation du cancer à un autre organe du corps. L'étude de ces critères aboutira au classement du cancer dans l'un des stades présentés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Classification TNM 2010 du cancer de la vessie (66).

T Tumeur primitive	PTx	Tumeur primitive non évaluable
	PT0	Tumeur primitive non retrouvée
	PTa	Carcinome papillaire non invasif
	PTis	Carcinome in situ « plan »
	PT1	Tumeur envahissant le chorion
	PT2	Tumeur envahissant la musculature – T2a Tumeur envahissant le muscle superficiel (moitié interne) – T2b Tumeur envahissant le muscle profond (moitié externe)
	PT3	Tumeur envahissant le tissu péri-vésical – T3a Envahissement microscopique – T3b Envahissement extra-vésical macroscopique
	PT4	Tumeur envahissant une structure péri-vésicale – T4a Prostate, vagin ou utérus – T4b Paroi pelvienne ou abdominale
N Ganglions lymphatiques régionaux	Nx	Ganglions non évaluables
	N0	Absence de métastase ganglionnaire régionale
	N1	Métastase ganglionnaire unique < 2 cm
	N2	Métastase ganglionnaire unique > 2 cm et < 5 cm ou métastases ganglionnaires multiples < 5 cm
	N3	Métastase(s) ganglionnaire(s) > 5 cm
M Métastases à distance	Mx	Métastase non évaluable
	M0	Absence de métastase à distance
	M1	Métastase (s) à distance

Le système TNM est liée à la classification TVNIM/TVIM (67, 68) puisque les TVNIM regroupent les stades PTis, PTa et PT1 alors que les TVIM englobent les PT2 et plus (Figure 4).

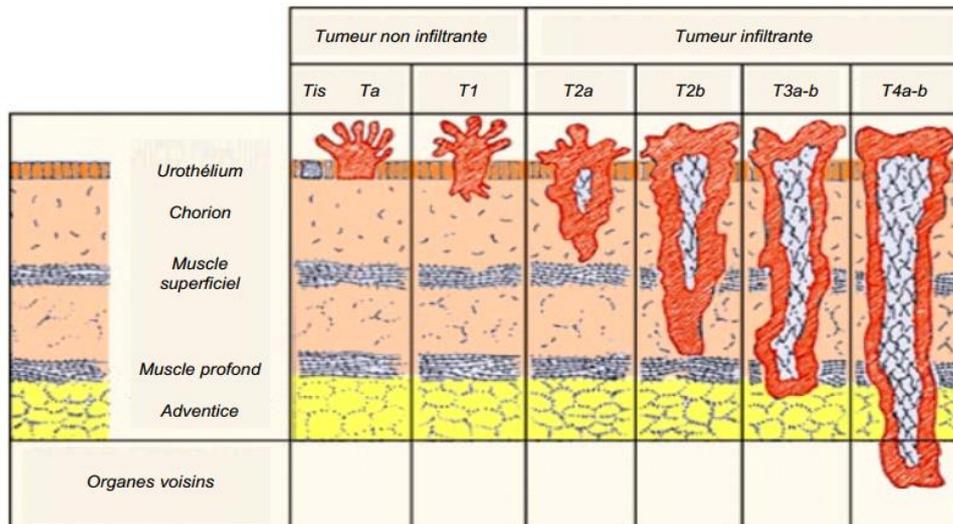


Figure 4 : Classification des stades des tumeurs de la vessie (66).

II.4.2.2. Grade :

Le grade repose sur l'aspect architectural et le degré de différenciation cellulaire des cellules tumorales : atypie, index mitotique, conservation de la polarité. Le grade est évalué parallèlement au stade grâce à l'observation microscopique des prélèvements. La classification histologique du cancer permet principalement à l'équipe soignante d'avoir une idée du développement futur de la tumeur. Deux classifications décrivent le grade tumoral : la classification WHO (World Health Organisation) ou OMS en français (Organisation Mondiale de santé) de 1973 et celle datant de 2004. La classification WHO 1973 distingue trois grades d'agressivité croissant : grade G1 : (cellules bien différenciées), G2 (cellules moyennement différenciées) et G3 (cellules faiblement indifférenciées). La classification de l'OMS 2004 classe les tumeurs en carcinome de bas grade (regroupant les G1 et certains G2) ou en carcinome de haut grade (regroupant certains G2 et les G3). D'un point de vue clinique il est recommandé pour établir le grade des tumeurs vésicales d'utiliser les deux classifications à la fois (69).

II.4.3. Les voies de progression :

Lors du diagnostic, on estime qu'environ 70% à 80 % des carcinomes transitionnels sont des tumeurs superficielles souvent des tumeurs papillaires de bas grades Ta G1/G2. Ces tumeurs

papillaires ont des fréquences des récurrences qui varient entre 60 et 70% (70). Le risque évolutif des TVNIM est divisé en trois classes : faible risque, risque intermédiaire et haut risque (Tableau 2). Cette classification permet de déterminer le traitement adéquat à proposer aux patients (71).

Tableau 2 : Tumeurs superficielles classées selon leur risque évolutif (71).

Risque évolutif	Tumeurs superficielles de la vessie	Risque de progression à 5 ans
Groupe 1: Faible risque	TaG1 unique (bas grade), diamètre inférieur à 3 cm, non récidivé.	7,1%
Groupe 2: Risque intermédiaire	TaG1-G2 (bas grade) multifocal et/ou récidivante, T1G1-G2 (bas grade).	17,4%
Groupe 3: Haut risque	TaG3 (haut grade), T1 récidivante, T1G3 (haut grade), TCis	41,6%

L'origine des tumeurs de stade Ta de haut grade G3 est actuellement incertaine. Elles pourraient se développer à partir des Cis ou de tumeurs papillaires de bas grade Ta G1/G2 dont le degré d'anaplasie aurait augmenté (72). On sait néanmoins qu'elles ont une probabilité relativement élevée (environ 40%) d'évoluer vers une tumeur invasive du chorion ou du muscle (73). Les tumeurs de stade T1 ou plus (G3) récidivent dans 80% des cas avec un risque de progression de plus de 40% (74).

Chez 15% à 20 % des malades le diagnostic indique des tumeurs invasives du muscle (T2 ou plus) (15, 70). Ces tumeurs envahissant le muscle, se développant principalement à partir des Cis, tumeurs planes de haut grade (G3) (72). On note qu'environ 80% des tumeurs invasives sont des premières tumeurs. Seulement 20% ont une histoire antérieure de tumeurs superficielles (75, 76).

En raison de la nature agressive et la probabilité de métastase, environ 70% des patients sont susceptibles de mourir (77).

Le cancer de la vessie pourrait schématiquement évoluer selon deux voies. Une première voie comprendrait les Cis et les tumeurs papillaires de haut grade TaG3 qui formeraient un ensemble de tumeurs ayant tendance à évoluer vers des tumeurs infiltrant le muscle. Une seconde voie comprendrait les tumeurs papillaires superficielles de bas grade Ta G1/G2.

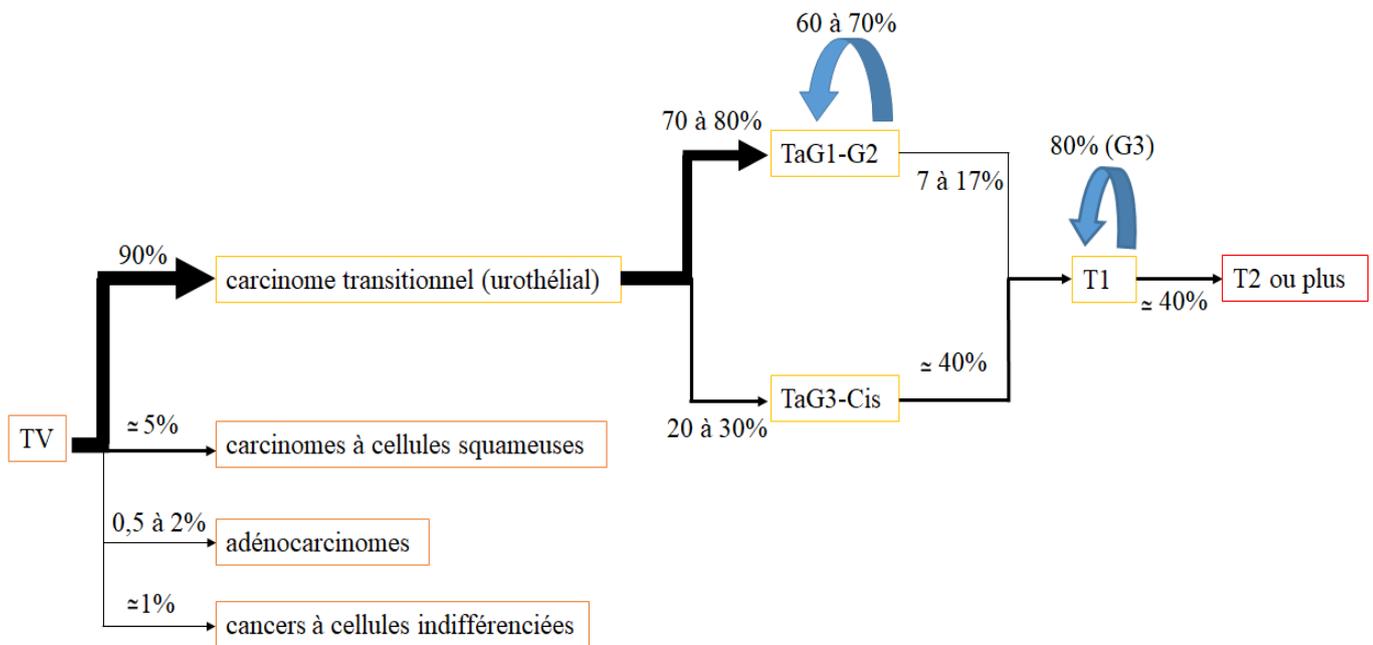


Figure 5 : Types histologiques et voies de progression des tumeurs vésicales.

II.5. Signes cliniques diagnostic et traitement :

II.5.1. Signes cliniques :

Les principaux symptômes du cancer de la vessie sont :

- Dans 80% des cas, l'émission de sang dans les urines (hématurie) le plus souvent en fin de miction, généralement indolore.
- Dans 20% des cas, des signes d'irritation vésicale comme la pollakiurie, l'impériosité, douleurs pelviennes, sensations de brûlures urinaires et infections urinaires à répétition (78).
- Une tumeur de la vessie peut bloquer l'écoulement de l'urine provenant du rein. L'accumulation de l'urine dans le rein peut conduire à une distension de cet organe (hydronéphrose) et à des douleurs.
- Dans les cas de métastases osseuses ou du rétro-péritoine, le patient peut ressentir des douleurs osseuses ou au flanc et il n'existe pas de signe physique spécifique pour le diagnostic du cancer de la vessie (79).

II.5.2.Diagnostic :

II.5.2.1. Bilan biologique :

Lors d'une tumeur vésicale un examen d'urine est réalisé en premier lieu afin de confirmer la présence d'une hématurie suivie d'un examen cyto bactériologique d'urine (ECBU) pour éliminer la possibilité d'infection urinaire. La cytologie urinaire est systématiquement réalisée dans le but de détecter des cellules tumorales dans les urines. La sensibilité de cet examen est bonne pour les tumeurs à haut grade et est par contre faible pour les tumeurs à bas grade (79).

II.5.2.2. La radiologie :

Les examens radiologiques sont largement utilisés par les urologues mais pas seulement pour le bilan diagnostique pour une 1^{ère} tumeur vésicale mais aussi dans le cadre des bilans d'extension locorégionales de ces tumeurs et la surveillance post opératoire (80).

II.5.2.3. L'échographie :

L'échographie abdomino-pelvienne est l'examen de première intention réalisé devant une hématurie macroscopique ou une manifestation urologique clinique évocatrice de tumeur vésicale. La réalisation d'une endoscopie vésicale est indispensable dans tous les cas. Une échographie négative ne peut en aucun cas suffire et la confirmation se fait par cystoscopie (80). Devant une tumeur de la vessie découverte à l'échographie abdomino-pelvienne, l'examen endoscopique vésical reste indispensable pour l'évaluation de l'aspect macroscopique qui donne une idée pronostique (infiltrant ou superficiel), la topographie, nombre des tumeurs et les lésions atypiques à l'échographie (80).

II.5.2.4. La cystoscopie :

La cystoscopie est l'examen de choix pour confirmer la présence d'une tumeur vésicale (81). Elle permet la visualisation directe de la vessie et la réalisation des biopsies des tumeurs et de la muqueuse adjacente pour établir le diagnostic final par examen anatomopathologique (15). La cystoscopie permet aussi de prédire le caractère infiltrant d'une tumeur de la vessie, élément déterminant dans le choix d'éventuels examens radiologiques complémentaires comme le scanner ou une imagerie par résonance magnétique (IRM) (80).

II.5.2.5. Scanner et imagerie par résonance magnétique (IRM) :

Si l'examen anatomopathologique révèle que la tumeur s'est propagée dans les couches profondes (couches musculaires) de la vessie, un examen radiologique par un scanner ou une

imagerie par résonance magnétique (IRM) de l'abdomen et du bassin est nécessaire pour déterminer si la tumeur s'est également développée dans les ganglions lymphatiques et les tissus situés à l'extérieur de la vessie (78).

II.5.3. Traitement :

Le traitement du cancer de la vessie dépend du stade de la maladie et de l'endroit où se loge la tumeur ainsi que de l'âge et l'état de santé général du patient. La chirurgie, la chimiothérapie, la thérapie biologique et la radiothérapie font partie des options du traitement.

II.5.3.1. Traitement des tumeurs superficielles (TVNIM) :

La chirurgie est l'option de traitement la plus fréquente pour ce cancer. Après une cystoscopie initiale presque tous les patients subissent une résection transurétrale de la vessie. Souvent toute la tumeur est réséquée. Pour les tumeurs non infiltrantes 60 à 70% patients présentent une récurrence dans les mois ou les années qui suivent la résection (70) et pour éviter cela, les patients sont traités avec des médicaments adjuvants en intra-vésicale (78).

Le type de traitement complémentaire dépendra du risque de récurrence et de progression, mais également des capacités du patient à tolérer les effets secondaires.

II.5.3.2. Traitement des tumeurs invasives (TVIM) :

Pour les tumeurs infiltrantes la résection transurétrale ne représente pas un traitement. Dans ces cas l'approche la plus utilisée est la cystectomie totale (66, 82) associée à une dissection ganglionnaire pelvienne (83).

De nombreuses études ont démontré la chimio-sensibilité des tumeurs infiltrantes de la vessie (84). Pour les patients qui ont des tumeurs avec des stades T2, une chimiothérapie néo-adjuvante est recommandée (78). Cette chimiothérapie permettrait de diminuer le volume tumoral rendant opérables certaines tumeurs jugées initialement inextirpables (85). Après une intervention chirurgicale une chimiothérapie adjuvante peut être pratiquée (78).

La radiothérapie est généralement néo-adjuvante, la comparaison de taux de survie à 5 ans entre des individus qui ont subi une cystectomie seule ou précédée d'une radiothérapie a montré que le taux est de 35% pour la cystectomie seule et de 54% pour l'autre (85). La radiothérapie seule peut-être indiquée pour les patients qui ne sont pas médicalement aptes à subir une intervention chirurgicale (85).

D'autres options thérapeutiques sont disponibles comme le traitement trimodal qui consiste en une combinaison d'une radiothérapie, une chimiothérapie et une résection transurétrale de la vessie qui permet la conservation de la vessie, mais jusqu'à nos jours la cystectomie totale reste l'option la plus fiable (82).

II.5.3.3. Thérapie génique :

Des récepteurs à activité tyrosine kinase ont été proposés comme cibles thérapeutiques dans les cancers de vessie envahissant le muscle: *EGFR* (86-88), *ERBB2* (89-91), *FGFR3* (92) et des médicaments visant ces cibles sont en essai clinique.

III. Caractérisation moléculaire des tumeurs vésicales :

La croissance non contrôlée des cellules de l'urothélium, observée dans le cancer de la vessie est généralement la conséquence de l'accumulation de plusieurs facteurs : génétiques comprenant les aberrations chromosomiques (délétions / duplications) et les altérations géniques (mutations ponctuelles) et épigénétiques. Sachant que les TVNIM et les TVIM sont caractérisées par des altérations moléculaires distinctes. Il est indispensable de mieux connaître les événements moléculaires qui déterminent le mécanisme de progression tumorale afin d'identifier des marqueurs biologiques permettant d'établir non seulement des marqueurs pronostiques mais aussi des critères diagnostiques et de nouvelles cibles thérapeutiques.

III.1. Aberrations chromosomiques :

Le comportement caractéristique du cancer de la vessie a donné l'occasion d'étudier les génomes de ces cellules. De nombreux changements structuraux et numériques ont été identifiés dans différents types de cellules tumorales. Plusieurs études ont montré que les tumeurs à différents stades présentent différentes aberrations chromosomiques et que le taux élevé d'aberrations chromosomiques est présent dans les tumeurs invasives des muscles (stades $\geq T2$) par rapport aux tumeurs superficielles (stades Ta, T1) (39). Parmi ces aberrations chromosomiques on note :

III.1.1. Les duplications :

Selon Reznikoff *et al.* (93) les régions les plus fréquemment dupliquées sont 1q12-q25 (36%), 6p (54%), 8q21-q22 (45%) et 17q11-q13 (73%). Sachant que les duplications 1q, 8q et 17q sont principalement associées à des tumeurs invasives (33, 39). Des amplifications ont été trouvées aussi dans les cancers primaires et métastatiques au niveau des régions : 10q22-q23 (33%),

17q11-q12 qui renferme le locus *ERBB2* (24%), 1q12-q25 (11%) et 11q11-q14 qui comporte le locus *CCND1* (11%) et 20q11.1-qter (9%) (93).

III.1.2. Les délétions :

Les régions les plus fréquemment sous représentées (délétées) incluent : 8p11-p21 (54%), 9q (60%), 10q24-q26 (54%), 17p13 (45%) et Y (50%). Il existe deux autres délétions sur le 8q, il s'agit de 8q12 et 8q21 (93). Les délétions 6q, 11p, 18q, 17p13 (cause l'inactivation du gène *P53*) et 13q14 (cause l'inactivation du gène *Rb1*) et sont plus fréquemment associées à des tumeurs invasives (33, 39).

Un nombre important d'études ont démontré une association entre les délétions des gènes *GSTM1* et *GSTT1* et le cancer de la vessie (94, 95), ces deux gènes sont détaillés ci-dessous.

III.2. Mutations ponctuelles :

Dans ce contexte, un nombre important de polymorphismes ont été associés au cancer de la vessie. Parmi les polymorphismes les plus anciennement découverts, nous énumérons les mutations sur les gènes *P53*, *Rb1*, les gènes *FGFR* en particulier le *FGFR3*, les gènes de la famille *EGFR* et les gènes de la famille *RAS*. Il a été montré que les tumeurs Ta G1/G2 sont caractérisées, pour 80% d'entre elles, par des mutations des gènes de la famille *RAS* (majoritairement *HRAS* et *KRAS*) et *FGFR3*, exclusives l'une par rapport à l'autre (65% pour *FGFR3* et 15% pour *RAS*) (96). Les tumeurs envahissant le muscle se caractérisent, quant à elles, par une mutation du gène suppresseur de tumeurs *P53* et/ou une perte fonctionnelle de la protéine du retinoblastome (*RB1/RB*) (97).

III.2.1. Le gène *P53* :

Le gène *P53* est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans de nombreuses voies de carcinogénèse y compris l'urothéliale. Il est localisé à la position 17p13.1 et code pour une protéine de 393 acides aminés (aa) d'un poids moléculaire de 53 kDa, d'où il tient son nom. Il joue un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et la réparation des altérations de l'ADN. Les mutations sur ce gène sont observées dans 20% à 60% des tumeurs vésicaux. Elles sont absentes ou présentes avec une faible fréquence dans les tumeurs superficielles à bas grade et sont par contre plus fréquentes dans les tumeurs invasives (98, 99). Une étude récente a prouvé l'association des mutations *P53* aux tumeurs invasives de la vessie. En effet, il a été montré que l'interaction de la protéine nucléaire *DDX31* (DEAD box

polypeptide 31) avec la protéine muté P53 favoriserait la transcription du gène *P53* muté entraînant de ce fait la migration et l'invasion des tumeurs vésicales (100).

III.2.2. Le gène *Rb1* :

Le gène *Rb1* (gène de rétinoblastome) est localisé en position 13q14.2 (101). Il code pour une protéine de 928 aa. Les anomalies de *Rb1* impliquent le dérèglement du cycle cellulaire entraînant une division anarchique (39). Il est fréquemment muté chez les patients atteints d'un cancer vésical en particulier dans les tumeurs invasives (102, 103).

III.2.3. Les gènes de la famille *RAS* :

Les gènes de la famille des proto-oncogènes *RAS* codent pour des protéines qui ont des poids moléculaires de 21000 Daltons, d'où le nom de p21. Ces protéines sont localisées à la face interne de la membrane cytoplasmique et ancrées dans la couche phospholipidique membranaire par leur extrémité C-terminale (104).

Dans les cellules tumorales les mutations du gène *HRAS* induisent l'activation permanente de la protéine *HRAS* qui va déclencher une cascade de phosphorylations conduisant à une augmentation de la prolifération cellulaire (101). L'étude réalisée par Zhu *et al.* (105) indique que des mutations du gène *HRAS* sont retrouvées dans 30 à 40% des carcinomes urothéliaux.

III.2.4. Le gène *FGFR3* :

FGFR3 est un récepteur à activité tyrosine kinase. Il est codé par un gène localisé sur le bras court (p) du chromosome 4, en position 16.3, et plus précisément de la paire de base 1795038 jusqu'à la paire de base 1810598. Le récepteur 3 des facteurs de croissance de fibroblastes (*FGFR3*), est une glycoprotéine transmembranaire, formée de 806 aa de type tyrosine kinase, et dont le poids moléculaire est de 115 kDa, elle comporte dans sa région extracellulaire trois domaines de type immunoglobulines, et dans sa région intracellulaire un domaine tyrosine kinase (106).

L'activation de *FGFR3* se fait par la fixation d'un ligand, il peut aussi être actif constitutivement après mutation dans certains cancer. Environ 70% des tumeurs de la vessie stade Ta présentent des mutations activatrices du gène *FGFR3* contre une fréquence de 10 à 20% dans les tumeurs invasives (107).

La Figure 6 résume les fréquences des mutations des gènes *FGFR3* et *TP53* impliqués dans les voies de progression des tumeurs urothéliales.

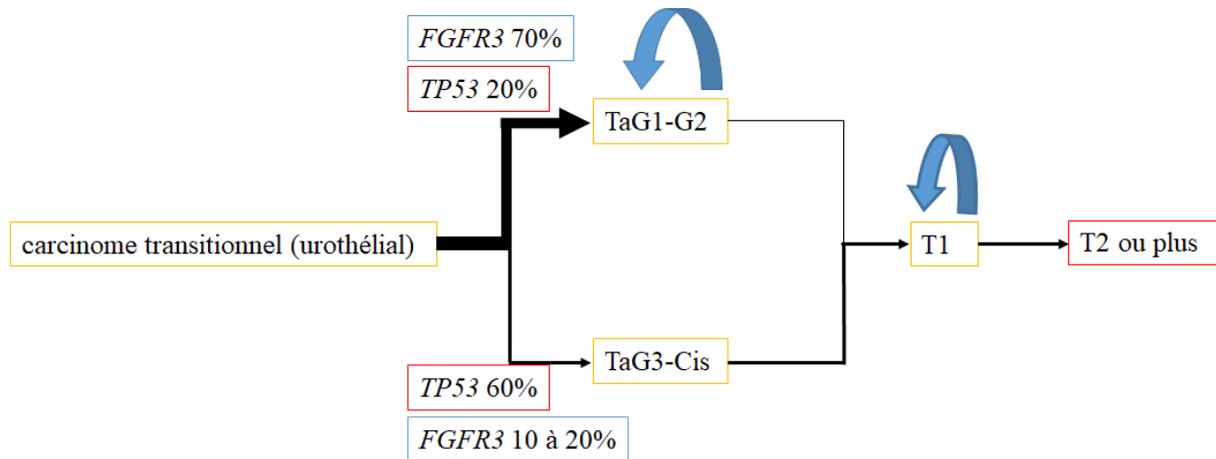


Figure 6 : Fréquences des mutations des gènes *FGFR3* et *TP53* dans les deux voies de progression des tumeurs vésicales.

III.2.5. Le gène *TACC3* :

Le gène *TACC3* est composé de 16 exons et est localisé en position 4q16.3 (Figure 7) entre les paires de base 1721490 et 1745178 à 70 kb du gène *FGFR3* (108, 109).

Plusieurs SNP sont localisés sur le gène *TACC3* mais la base des données LitVar cite principalement les travaux associant le polymorphisme rs798766 au cancer de la vessie (110). La protéine *TACC3* contient 838 aa avec un poids moléculaire de 90 kDa (111). Les niveaux d'expression les plus élevés sont observés dans les testicules, la moelle osseuse et les nœuds lymphatiques et d'un niveau d'expression un peu plus bas dans le tissu vésical et le placenta (108).

Le gène *TACC3* est considéré comme un facteur important dans l'organisation et la stabilité des microtubules du fuseau mitotique au cours de la division cellulaire (112, 113). L'altération de ce gène se traduit par une désorganisation des fibres kinétochoriens et l'interférence de la progression mitotique ainsi que la ségrégation normale des chromosomes (114).

Ces erreurs de ségrégations conduisant à des aneuploïdies peuvent être impliquées dans la carcinogenèse (114). Le rôle exact du gène *TACC3* dans l'apparition des cancers et en particulier du cancer de la vessie reste toujours inconnu (112). D'après une série de tests fonctionnels réalisée par Lin *et al.* (112), une nouvelle fonction régulatrice du cycle cellulaire

du point G1/S a été découverte pour le gène *TACC3* et a été démontré qu'un niveau élevé d'expression de ce gène est associé au cancer de la vessie confirmant l'effet oncogénique du gène *TACC3* dans la carcinogénèse vésicale (112).

Une fusion entre les gènes *FGFR3-TACC3* causée par un réarrangement sur le chromosome 4 est remarquée dans plusieurs cancers y compris le cancer de la vessie. Le gène transformé résultant de la fusion est appelé *FT3* (114). On a montré que la formation du gène *FT3* conduit à une augmentation de l'activité tyrosine kinase du domaine FGFR3 mais la fonction exacte du gène de fusion *FT3* n'est pas encore déterminée (115).

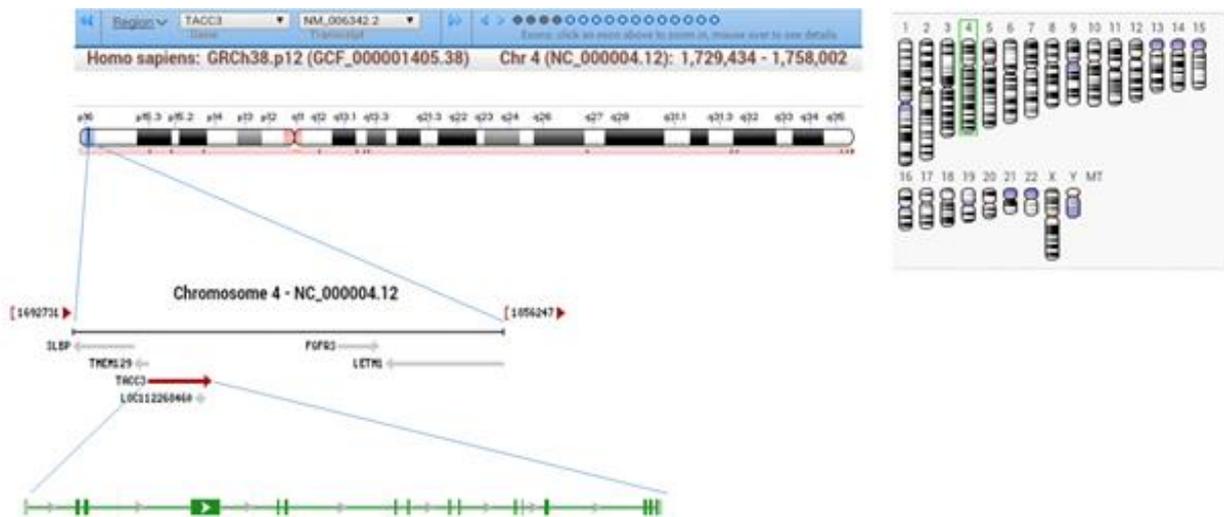
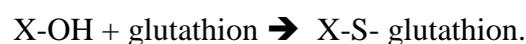


Figure 7 : Position et structure du gène *TACC3*.

III.3. Les Gluthation-S-Transférases (*GST*) :

Comme mentionné préalablement, les HAP ainsi que d'autres agents cancérigènes sont hautement associés au risque de développement d'un cancer vésical. L'exposition à ces xénobiotiques est plus importante chez les fumeurs et dans certains cadres professionnels.

Les glutathion-S-transférases sont une famille de transférases impliquées dans la phase II de détoxification de nombreux composés hydrophobes et électrophiles comme les HAP. Ces transférases utilisent le glutathion comme composé endogène pour conjuguer le xénobiotique ou son métabolite succédant aux oxydations (phase I) si celles-ci n'ont pas suffi à éliminer le xénobiotique selon la formule suivante :



X : xénobiotique.

Le conjugué est généralement plus hydrosoluble et plus polaire et donc plus facilement excrétable.

Chez les eucaryotes plusieurs isoenzymes sont exprimées, soit cytosoliques ou membranaires. Chez l'être humain l'expression des *GST* n'est pas homogène, ils sont trouvés principalement dans le foie ; un peu moins dans les ovaires, la peau et le tissu surrénal. Dans la vessie, ils sont exprimés en faible quantité (116).

Actuellement, la superfamille des *GST* humain contient au moins 16 gènes subdivisés en 8 classes distinctes (π), (α), (σ), (μ), (θ), (κ), (ω) et (ζ) qui sont codés par les gènes *GSTA*, *GSTM*, *GSTK*, *GSTO*, *GSTP*, *GSTS*, *GSTT* et *GSTZ* (117). Les groupes sont répartis selon leurs propriétés structurales (similarité des séquences nucléotidique, localisations et nature du substrat) biochimiques (point isoélectrique) et immunologiques. Plusieurs polymorphismes qui influencent les fonctions des gènes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* et *GSTAI* ont été découverts (117, 118). Au cours de notre étude, nous allons nous intéresser aux délétions des gènes *GSTM1* et *GSTT1*. Si le gène est doublement délété (absent sur les deux chromosomes homologues) on parle dans ce cas de génotype nul et on note *GSTM1 nul* ou *GSTT1 nul*. Un manque d'activité enzymatique a été observé en association avec les délétions homozygotes des gènes *GSTM1* et *GSTT1* (37, 48), sachant que le génotype *GSTM1 nul* est le facteur le plus important de la réduction globale de l'activité GST (119).

III.3.1. *GSTM1*, gène et enzyme :

III.3.1.1. Structure du gène *GSTM1* :

Le gène *GSTM1* appartient à la classe (μ) avec 4 autres gènes nommés *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* et *GSTM5* tous localisés sur le chromosome 1 au niveau de la région 1p13.3. La position du gène *GSTM1* est en aval des gènes *GSTM4* et *GSTM2* et en amont des gènes *GSTM5* et *GSTM3* (120). Son taux d'expression est maximal dans le vagin, les ovaires, le foie, l'œsophage, la glande surrénale et la vessie (121). Il existe deux isoformes principales du gène *GSTM1*, l'isoforme 1 est constitué de 8 exons et 7 introns avec une taille de 5,92 kb (120) qui donne une protéine de 218 aa (122) tandis que l'isoforme 2 contient que 7 exons et donne une protéine plus courte de 37 aa (123) (Figure 8).

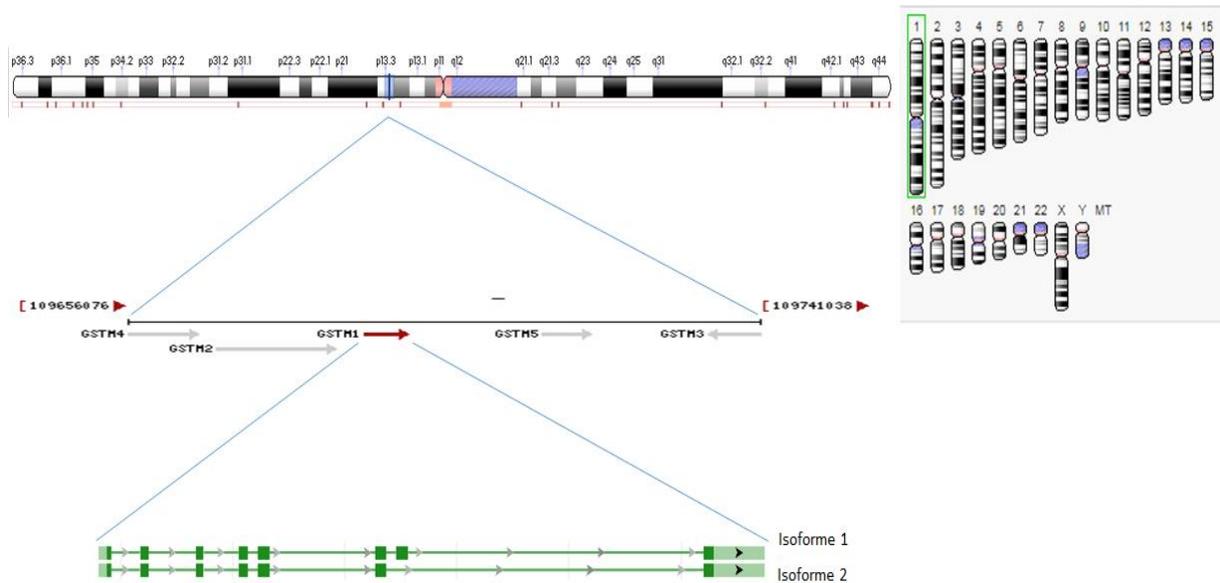


Figure 8 : Position et structure du gène *GSTM1*.

III.3.1.2. Polymorphismes :

Selon la base des données db SNP, un nombre très important des SNP sont localisés sur le gène *GSTM1* (124). D'après Hollman *et al.* (125) seul le polymorphisme rs1065411 qui cause la mutation protéique K173N est impliqué dans le cancer colorectal.

La délétion homozygote complète du gène représenté par l'allèle *GSTM10/0* ou bien *GSTM1 nul* représente un polymorphisme important du gène car comme il est déjà noté que cette délétion implique la perte de protéine qui induit un déficit enzymatique total pour le gène *GSTM1* et une grande réduction de l'activité globale des gènes *GST*. Cette forme allélique résulte d'un crossing over inégal entre deux régions répétées de 4,2 kb, qui flanquent le gène *GSTM1* et qui provoque une délétion de 15 kb incluant le gène entier (126) (Figure 9).

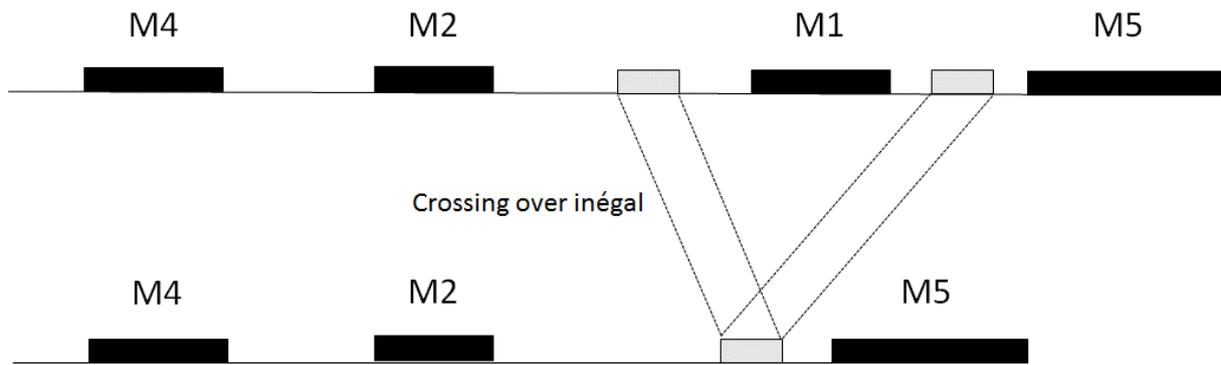


Figure 9 : Mécanisme d'apparition de la délétion *GSTM1*(127).

III.3.1.3. Fréquence du génotype *GSTM1 nul* :

La fréquence du génotype *GSTM1 nul* varie entre 31% et 88% selon le groupe ethnique (128). Selon les études citées dans la méta-analyse de Yu *et al.* (95), la fréquence de cette délétion varie entre 45% et 55% chez les caucasiens. Dans la population tunisienne, cette fréquence est de 44,8% (129, 130) et elle est de 45% chez les Egyptiens (48). Il est à noter, que les fréquences les plus élevées sont observées chez les Asiatiques (95, 131, 132). D'autre part, il existe une variation au sein d'un même groupe ethnique, cette variation résulte de différents facteurs tels que la taille de l'échantillon étudié, la tranche d'âge des sujets et la source de leur sélection.

III.3.1.4. Structure et substrats de l'enzyme *GSTM1* :

L'enzyme *GSTM1* est un dimère de 218 aa pour l'isoforme 1 alors que l'isoforme 2 ne contient que 181 aa. Chaque monomère est composé de deux domaines (133) :

- Le premier domaine (G-site) assure la liaison et l'activation du glutathion et est identique chez tous les enzymes de la familles GST (133).
- Le deuxième domaine (H-site) est le site de liaison du substrat et est différent d'un GST à un autre selon le type de substrat (133) (Figure 10).

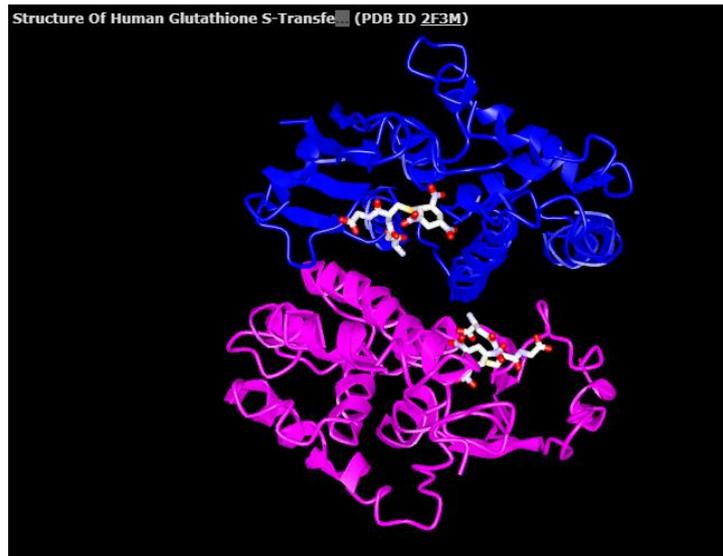


Figure 10 : Structure de l'enzyme GSTM1(134).

Le GSTM1 permet la conjugaison du glutathion avec plusieurs substances telles que : les époxydes, les dérivés nitrés, les hydroxylamines, le styrène, l'oxyde de styrène, le benzène et le benzo (a) pyrène, composés carcinogènes retrouvés dans la fumée du tabac mentionnés précédemment. Cette enzyme intervient aussi dans la détoxification de quelques médicaments comme le paracétamol et les produits du stress oxydative.

III.3.2. *GSTT1*, gène et enzyme :

III.3.2.1. Position et structure du gène *GSTT1* :

Chez l'homme le gène *GSTT1* est composé de 8179 bases et localisé sur le chromosome 22 en position 22q11.23 à proximité de l'autre gène de la classe thêta (*GSTT2*), ces deux gènes sont séparés par 50 kb environ (Figure 11). Chacun des deux gènes contient 5 exons et 4 introns et leurs protéines sont identiques à 55% (135). L'épissage alternatif de *GSTT1* donne plusieurs variants de transcription, actuellement 9 variants sont répertoriés dans la banque des données NCBI (136).

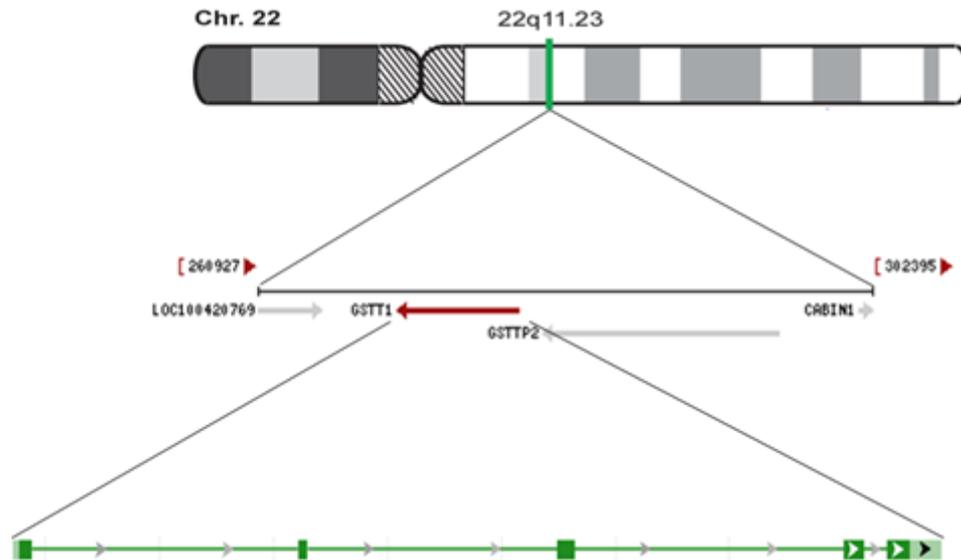


Figure 11 : Position et structure du gène *GSTT1*.

III.3.2.2. Polymorphismes :

Comme pour le gène *GSTM1*, la base des données db SNP renferme un nombre important des SNP pour le gène *GSTT1* mais selon Hollman *et al.* (125) deux SNP seulement sont impliqués dans la carcinogenèse rs2266637 et rs141759372.

Suite à l'étude portée sur la variabilité du métabolisme du chlorure de méthylène dans le sang humain, la délétion partielle de 54 251 paires de bases du gène *GSTT1* a été découverte. Il existe trois phénotypes distincts (" *non conjugators*, *low conjugators* et *high conjugators*") selon que deux, un seul ou aucun des deux allèles soient délétés. Le phénotype non conjuguant est donc dû à une délétion homozygote de l'allèle fonctionnel de *GSTT1* et correspond par conséquent, au génotype *GSTT10/0* ou *GSTT1 nul* (137). Ce dernier, cause la perte de fonction protéique et est impliqué dans plusieurs pathologies et cancer.

III.3.2.3. Fréquence du génotype *GSTT1 nul* :

Comme pour le gène *GSTM1* la fréquence du génotype nul du gène *GSTT1* varie selon le groupe ethnique. Chez nos voisins les Tunisiens, elle est de 30,4% (130) alors qu'elle ne dépasse pas les 15% chez les Egyptiens (48). Les fréquences de *GSTT1 nul* les plus élevées sont localisées chez les populations asiatiques dont la fréquence est variable selon la localisation géographique mais la plupart du temps dépasse les 50% (95).

III.3.2.4. Structure et substrats de l'enzyme GSTT1 :

Le GSTT1 catalyse la conjugaison de substances toxiques environnementales citées auparavant. Parmi les 9 isoformes, l'isoforme **a** code pour la protéine la plus longue composée de 240 aa avec un poids moléculaire de 27335 Daltons (138). Comme pour l'enzyme GSTM1 celui codé par *GSTT1* est aussi un dimère avec la présence des mêmes domaines (G-site et H-site) (138).

Chez l'homme, son spectre d'expression est proche de celui du gène *GSTM1* en général. Cependant, il est hautement exprimé dans la thyroïde, la glande surrénal, prostate et un peu moins exprimé dans la vessie mais sa présence reste bien importante (139).

III.4. Les facteurs épigénétiques :

Les facteurs épigénétiques (méthylation d'ADN et modification de la structure des histones) peuvent être aussi impliqués dans la carcinogénèse vésicale (33). La méthylation de l'ADN est reconnue comme l'altération épigénétique la plus impliquée dans le cancer chez l'homme (140). Dans le cas du cancer de la vessie des régions hyperméthylées sur ou proches des promoteurs de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs ont été localisées, ces méthylations sont associées à l'inactivation de la transcription de ces gènes (39). Parmi ces gènes on cite le *BRCA1* avec un taux de méthylation de 71%, *WT1* (38,7%) et *RARB* (38,7%) (140).

Dans certains cas une hypométhylation globale de l'ADN est possible, elle peut mener à la carcinogénèse car elle cause l'instabilité du génome. Une étude réalisée par Moore *et al.* (141) a montré que l'hypométhylation de l'ADN est associée à un risque élevé de développer un cancer de la vessie et que cette association est indépendante de la consommation de tabac ou à l'exposition à d'autres facteurs de risques environnementaux. L'hypométhylation peut être aussi spécifique à un groupe de gènes (141) tels que les oncogènes dont l'hypométhylation induit leur activation entraînant de ce fait la carcinogénèse.

I. Population d'étude :

L'étude réalisée est transversale de type cas témoins. Elle a porté sur une population de **363** personnes non apparentées et appariées selon l'âge, le sexe et l'origine géographique. Leur recrutement en vue de l'analyse génétique s'est étendu de septembre 2014 à mai 2016. Notre population d'étude est subdivisée en deux groupes : patients et témoins.

I.1. Patients :

Un total de **175** patients atteints de cancer de la vessie a été inclus dans notre étude. Ces cas ont été diagnostiqués à différents stades et à différents grades de sévérité selon respectivement le système de classification TNM de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC, 1997) et la classification OMS 1973. Le recrutement des patients a été établi au sein des départements d'urologie du Centre Hospitalier Universitaire de Tizi-Ouzou et de la Clinique Rénale Daksi de Constantine, tous étaient originaires du nord de l'Algérie et âgés au moment du recrutement entre 22 et 90 ans, plus de 92% d'entre eux étaient des hommes.

I.2. Témoins :

Un nombre de **188** témoins en bonne santé apparente et sans histoire familiale de cancer, ont été inclus dans cette étude. Le recrutement des témoins a été réalisé dans les mêmes régions que celles des patients et ont été choisis pour avoir un maximum de similitude avec les patients en terme d'âge et de sexe.

Tous les sujets témoins et patients ont été soumis à un questionnaire détaillé retraçant les informations personnelles et les données épidémiologiques utiles pour notre étude (Age, sexe, origine géographique, statut tabagique) (**Annexe 01**). Les données cliniques et anatomo-pathologiques ont été recueillies auprès des médecins traitants et à partir des dossiers des patients atteints de tumeurs vésicales hospitalisés dans les services d'urologie. Un consentement éclairé a été également signé par l'ensemble des sujets, après lecture et explication nous autorisant à utiliser leur matériel génétique au cours de cette recherche (**Annexe 02**). Le comité d'éthique interne nous a accordé l'autorisation de réaliser nos travaux.

II. Méthodes :

II.1. Prélèvement sanguin :

Pour chaque individu, un volume de 5 à 10 ml de sang destiné à l'extraction de l'ADN a été prélevé dans des conditions adéquates (stérilité, ponction veineuse par un personnel hospitalier compétent) dans des tubes vacutainer EDTA (Ethylène Diamine Tetra-Acetic) comme anticoagulant.

II.2. Extraction de l'ADN génomique :

Une grande variété de techniques ont été élaborées pour pouvoir extraire de l'ADN génomique total à partir de cellules issues elles-mêmes d'une variété de tissus, en tenant compte du tissu disponible, mais également des explorations moléculaires à entreprendre par la suite (analyses génomiques, expression des gènes, ...). Cependant, la source la plus commune et la plus accessible d'ADN chez l'homme reste les leucocytes du sang périphérique. Au cours de notre étude l'extraction de l'ADN génomique à partir du sang total a été réalisée par la technique au chlorure de sodium ("salting-out").

La méthode de "salting-out" offre ainsi l'avantage d'éviter l'utilisation de solvants organiques dangereux, tels le phénol ou le chloroforme utilisés par la méthode classique d'extraction au phénol : chloroforme, pour l'élimination des protéines digérées (142, 143).

II.2.1.Principe :

La méthode de "salting-out" consiste à isoler l'ADN en solution (provenant de la lyse des cellules) suite à une précipitation des débris cellulaires, et ce grâce à une force ionique élevée apportée par une forte concentration en sel de Chlorure de Sodium (NaCl). L'ADN est ensuite traité par la protéinase K qui le débarrasse de toutes les protéines qui lui sont associées, puis précipité par l'éthanol sous forme d'une pelote de filaments blanchâtres appelée méduse. L'ADN ainsi obtenu est solubilisé en phase aqueuse (143) (**Annexe 03**).

II.2.2. Estimation de la concentration de l'ADN et contrôle de sa qualité :

Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption maximal en UV à 260 nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration de l'ADN. Les protéines qui représentent les témoins de contamination absorbent aussi bien à 260 nm qu'à 280 nm alors que les molécules organiques et les tampons absorbent le mieux à 230 nm. La mesure de la densité optique de chaque échantillon à 260 nm, 280 nm et 230 nm est établie par spectrophotométrie à UV avec un

Nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop 1000). Deux rapports sont établis DO 260/280 et DO 260/230.

Pour une pureté idéale d'ADN, le rapport DO 260/280 doit être compris entre 1,8 et 2 afin de pouvoir considérer l'ADN débarrassé des protéines cellulaires, un rapport >2 indique une contamination avec des ARN alors qu'un rapport $<1,8$ indique une contamination par des protéines. Le rapport DO 260/230 doit être compris entre 1,8 et 2,2 afin de pouvoir considérer l'ADN débarrassé des solvants, sels et contaminants organiques, un rapport $<1,8$ indique une contamination par ces solvants.

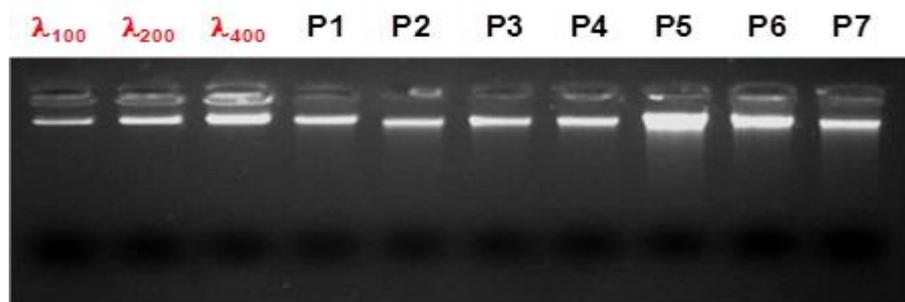
La concentration de l'ADN est donnée directement en ng/ μ l sachant qu'une unité de densité optique à 260 nm est équivalente à 50 ng/ μ l. Les ADN purs sont conservés à + 4°C jusqu'à utilisation (ou congelés à - 20°C dans le but de les conserver pour une longue durée).

II.2.3. Estimation qualitative et semi-quantitative de l'ADN extrait par électrophorèse sur gel d'agarose :

Le but de cette étape n'est pas seulement d'estimer la réussite de l'extraction d'ADN, mais bien aussi d'apprécier la quantité relative d'ADN disponible, tout autant que sa qualité, nous avons opté pour une estimation sur gel d'agarose à 1 % (1g dans 100 ml) pendant 30 min à 100 Volts (**Annexe 04**).

L'apparition de trainées est témoin d'une dégradation partielle ou totale de l'ADN extrait.

En utilisant une gamme de concentrations connues (ADN à différentes concentrations), il est possible d'estimer la quantité d'ADN disponible pour chacun des échantillons qui auront été testés (photographie 1).



Photographie 1 : Exemple d'estimation qualitative et semi-quantitative, après électrophorèse sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium (0,5 μ g/ml), de quelques ADN génomiques des patients. **P1 à 7** : ADN génomiques de certains patients ; λ_{100} , λ_{200} , λ_{400} : gamme de concentration d'un ADN contrôle lambda à 100, 200 et 400 ng.

II.2.4. Dilution de la concentration d'ADN extrait :

Une concentration de 10 ng/μl est largement suffisante pour réaliser les protocoles moléculaires envisagés pour notre étude, pour cela une dilution de la concentration d'ADN a été effectuée. Ces dilutions nous ont permis d'une part, d'économiser la quantité d'ADN dont nous disposons et d'autre part, cela nous a permis d'homogénéiser la concentration de tous les échantillons pour une meilleure application des protocoles expérimentaux. Pour nous assurer de la bonne qualité et de la concentration des ADN les rapports DO 260/280 et 260/230 ont été remesurés.

II.3. Analyse génétique :

L'extraction de l'ADN a été réalisée au niveau du laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire de l'université Constantine 3. L'analyse moléculaire comprenant la détection des délétions des gènes *GSTM1* et *GSTT1* des glutathion S- transférases par PCR multiplexe, le séquençage ainsi que la PCR en temps réel du polymorphisme rs798766 du gène *TACC3* s'est déroulée au niveau de la plateforme de Biologie Moléculaire de l'institut Curie, Paris, France.

II.3.1. Recherche des délétions des gènes glutathion S-transférases (*GSTM1* et *GSTT1*) par PCR multiplexe :

Dans le but de rechercher des délétions *GSTM1* et *GSTT1* nous avons adopté le protocole de la PCR multiplexe. Il consiste à amplifier simultanément un fragment de chacun des deux gènes d'intérêt ainsi qu'une partie du gène de la β globuline qui sert de contrôle interne.

II.3.1.1. Principe de l'amplification par PCR Multiplexe :

La PCR ("Polymerase Chain Reaction") est une technique de biologie moléculaire mise en évidence par Kary Mullis et ses collaborateurs en 1985 (144). Elle permet d'amplifier selon un mode exponentiel *in vitro* des séquences d'ADN spécifiques et requiert deux amorces oligonucléotidiques ("primers") de 20 à 25 nucléotides complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN de la séquence cible d'intérêt à amplifier. Sous l'action de l'activité polymérasique d'une enzyme thermostable, la *Taq* polymérase dont le rôle est d'allonger les amorces dans le sens 5'→3' par incorporation de désoxynucléotides (dNTPs) par une complémentarité base-base avec le brin matrice (144).

La PCR multiplexe est une variante de la PCR classique. Elle permet d'amplifier plusieurs gènes au cours d'une même réaction PCR, par l'introduction dans le milieu d'amplification de couple d'amorces spécifiques pour chaque gène à amplifier.

II.3.1.2. Amorces utilisées :

Les séquences des amorces utilisées sont indiquées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Séquences des oligonucléotides des amorces utilisées pour l'amplification des gènes *GSTM1*, *GSTT1* et β globuline par PCR multiplexe.

gènes	Séquences	Taille du fragment amplifié
<i>GSTM1</i>	F 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' R 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'	230 pb
<i>GSTT1</i>	F 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' R 5'-TCACCGGATCATGGCCACCA-3'	480 pb
β globuline	F 5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3' R 5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3'	110 pb

*F pour Foward : sens et R pour Reverse : antisens ; β globuline contrôle interne.

II.3.1.3. Conditions pratiques de l'amplification :

L'amplification est réalisée dans un mélange réactionnel de 25 μ l contenant 50 ng d'ADN génomique, 1X du tampon de PCR (Qiagen[®]), 1,5mM de MgCl₂ (Qiagen[®]), 0,2 mM de chacun des quatre dNTPs (Thermo Fisher[®]), 0,3mM de chaque amorce (BioLabs[®]), 0,05U/ μ l de *Taq* DNA polymérase (Qiagen[®]). Le volume est complété avec de l'eau distillée.

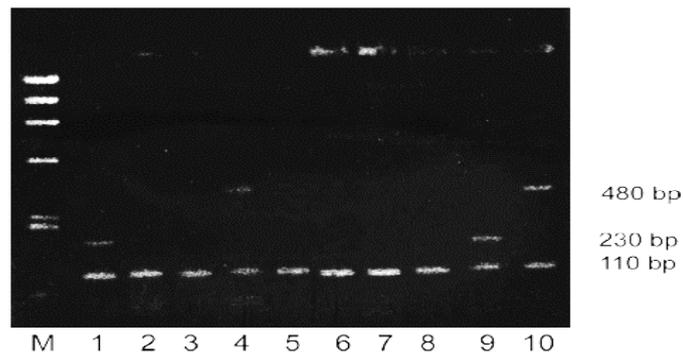
Lors de l'amplification, il est nécessaire de réaliser en parallèle un témoin négatif ne contenant pas de l'ADN afin de contrôler une éventuelle contamination des réactifs utilisés. La réaction de PCR a été effectuée dans un thermocycleur (BIO-RAD cycler) qui a été programmé pour exécuter le programme d'amplification de 35 cycles :

- ✓ Etape 1 : dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min.
- ✓ Etape 2 : dénaturation à 94°C, 1 min
hybridation à 60°C, 45 sec
élongation 72°C, 1 min } x 35 cycles
- ✓ Etape 3 : étape d'élongation finale à 72°C durant 10 min.

Les produits de PCR sont soit utilisés immédiatement soit stockés à 4 °C jusqu'à utilisation.

II.3.1.4. Révélation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose :

La migration des produits PCR se fait sur gel d'agarose concentré à 1,5% sous un courant à 100 Volts pendant 30 à 40 min en présence du bromure d'éthidium (BET). Un marqueur de taille 100 pb (BioLabs®) a été utilisé en parallèle afin de déterminer la taille des produits d'ADN amplifiés (**Annexe 05**). Les fragments attendus sont représentés dans la photographie 2.



Photographie 2 : Electrophorèse sur gel d'agarose pour des produits PCR du *GSTM1* (230 pb), *GSTT1* (480 pb) et β globuline (110 pb) (48).

II.4. Etude du polymorphisme rs798766 du gène *TACC3* par séquençage et QPCR :

Le génotypage de l'ensemble des échantillons pour le polymorphisme rs798766 du gène *TACC3* a été réalisé par PCR en temps réel (TaqMan). Cependant pour la mise au point de cette technique et pour confirmer les résultats obtenus, il a été nécessaire au préalable de déterminer quelques génotypes par la méthode de référence : séquençage (méthode de Sanger) puis les comparer à ceux obtenus par la technique de discrimination allélique utilisant des sondes fluorescentes TaqMan.

II.4.1. Séquençage :

II.4.1.1. Principe :

Le séquençage repose sur la synthèse d'un brin d'ADN, à partir de la séquence que l'on veut explorer, par une Taq polymérase d'une haute-fidélité. L'enzyme synthétise à partir de l'extrémité 3' d'une amorce, ajoutant des nucléotides complémentaires de ceux du brin d'ADN qu'elle copie, avec pour substrats des désoxynucléotides triphosphates normaux mélangés avec des didésoxynucléotides dont la fonction alcool secondaire en 3' est réduite (empêchant alors la synthèse de se poursuivre). Les didésoxynucléotides incorporés sont marqués spécifiquement

par des molécules fluorescentes. Les fragments synthétisés sont alors séparés dans un séquenceur en fonction de leur longueur et identifiés grâce à une lecture par laser, permettant après extraction et analyse des données d'obtenir des électrophorégrammes ensuite traduits en séquences (145).

II.4.1.2. Mode opératoire :

La réalisation du séquençage passe par trois étapes : L'amplification du fragment du gène d'intérêt par PCR, la purification du produit PCR, la réalisation d'une PCR séquence par marquage du fragment purifié.

➤ *Amplification par PCR :*

Pour une réaction de séquençage par la méthode de Sanger sur le gène *TAAC3*, il est nécessaire de disposer, tout d'abord d'une grande quantité de fragments à séquencer (amplicons). L'amplification se fait par PCR classique en utilisant une paire d'amorces spécifique de la région de l'intron 5 du gène *TACC3* incluant le polymorphisme rs798766. Les caractéristiques de la paire d'amorces utilisée sont mentionnées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Séquences des oligonucléotides utilisées pour l'amplification du gène *TAAC3* par PCR classique.

Gène	Séquences	Taille du fragment amplifié
<i>TACC3</i>	F 5'-CGTAAGATTGGAAGGTGGAAC-3' R 5'-CAGGACTCGGAAACACACCT-3'	311pb

*F pour Forward : sens et R pour Reverse : antisens.

La préparation du milieu réactionnel de la réaction d'amplification est réalisée comme décrit précédemment pour l'amplification des gènes *GSTM1* et *GSTT1*.

Le thermocycleur a été programmé pour exécuter le profil d'amplification spécifique à ces amorces :

- ✓ Etape 1 : dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min.
- ✓ Etape 2 : dénaturation à 94°C, 1 min
hybridation à 62°C, 30 sec
élongation 72°C, 1 min } x 35 cycles
- ✓ Etape 3 : étape d'élongation finale à 72°C durant 10 min.

➤ **Contrôle des produits PCR sur gel d'agarose :**

Le contrôle des produits PCR obtenus est effectué par migration sur gel d'agarose à 2 % contenant du Bromure d'ETHidium (BET) (0,5 µg/ml). 4 µl de chaque produit PCR mélangé à 2 µl du bleu de bromo-phénol, sont soumis à une migration électrophoretique à 100 Volts pendant 20 min en présence d'un marqueur de taille 100 pb (BioLabs®). La réussite de la PCR se traduit par une bande nette.

➤ **Purification des produits PCR :**

De manière succincte, les produits PCR ont été purifiés pour éliminer l'excès d'amorces et de dNTPs subsistants par l'utilisation du tampon ExoSAP composé de deux enzymes hydrolytiques : l'exonucléase I et la phosphatase alcaline. Le milieu réactionnel ainsi que les conditions de purification sont indiqués dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Protocole de purification du fragment amplifié.

Réactifs	Volume (µl)	Conditions de purification
Produit PCR	5	37 °C 15 min
ExoSAP	1	
H ₂ O	6	80 °C 15 min

➤ **PCR séquence ou Marquage des fragments purifiés :**

Pour le séquençage de l'intron 5 du gène *TAAC3* deux plaques de séquences ont été préparées en utilisant l'une des deux amorces *TACC3F* ou *TACC3R*, ainsi que les composants du kit de séquençage BigDye® Terminator (Applied Biosystems®).

Il s'agit d'une PCR classique qui s'effectue dans un thermocycleur avec un milieu réactionnel et des conditions d'amplifications comme décrit dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Les compositions d'un mix réactionnel d'un volume final de 10 µl et le programme de l'amplification de la PCR séquence.

Réactifs	Volume (µl)	Conditions d'amplification	Cycles
Produit PCR	1 µl	96°C, 1min	1
BigDye V1.1	1 µl		
Tampon 5X	1,5 µl	96 °C, 20s	25
Amorce F ou R (5µM)	1 µl	50 °C, 15s	
H ₂ O	5,5 µl	60 °C, 4min	

La réaction de séquence est suivie par une purification pour éliminer l'excès de produits de séquençage (éliminer les colorants) comme suit :

- Ajouter 80 µl d'éthanol 76 % à 10 µl du produit de PCR séquence (par puits) et laisser sur paillasse ou sur glace pendant 15 à 30 min.
- Centrifuger pendant 15min à 4000 tpm à température ambiante.
- Retirer le surnageant en renversant la plaque de séquence rapidement.
- Centrifuger pendant 1 min à 1000 tpm à l'envers sur papier absorbant (Wathman).
- Réhydrater les plaques en rajoutant 10 µl d' H₂O (par puits).

Les produits de séquence purifiés sont soumis à une migration électrophoretique sur gel de séquence pendant 1-2 heures sur séquenceur automatique (ABI PRISM® 3100 PerkinElmer®), et des électrophorégrammes/séquences ont pu être obtenus.

L'analyse des résultats a été faite par l'utilisation d'un logiciel Sequence Scanner V.1. (Applied Biosystems®).

Toutes les séquences obtenues ont été comparées à une séquence de référence du fragment d'intérêt du gène étudié en consultant deux banques de données :

- NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Ensembl Genome Browser : <http://www.ensembl.org/index.html>

II.4.2. Méthode de géotypage par discrimination allélique TaqMan (QPCR) :

II.4.2.1. Principe :

La PCR en temps réel est une variante de la PCR classique qui est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons néoformés durant la réaction PCR. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : celui qui utilise un fluorochrome particulier, le SYBR Green et celui qui utilise les sondes fluorescentes (146). Dans cette dernière catégorie, nous avons opté pour la technique TaqMan que nous avons utilisé au cours du géotypage de l'intron 5 du gène *TAAC3*.

Le principe de la technologie TaqMan est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la *Taq* polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR.

De ce fait, la technique de discrimination allélique TaqMan utilise deux sondes fluorescentes qui diffèrent uniquement par un nucléotide et qui sont complémentaire, soit à l'allèle sauvage soit à l'allèle muté.

Un fluorochrome émetteur (reporter) (FAM ou VIC) est fixé à l'extrémité 5' de chaque sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3' (MGB). Lorsque il est stimulé, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence (147). Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. Durant l'étape d'extension, la *Taq* polymérase possédant une activité 5'-exonucléasique coupe uniquement la sonde parfaitement hybridée à la séquence cible. Le reporter est alors libéré du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence. Le type de signal fluorescent (VIC ou FAM) est lu en fin de PCR et est spécifique de la séquence présente dans l'échantillon (146) (Figure 12).

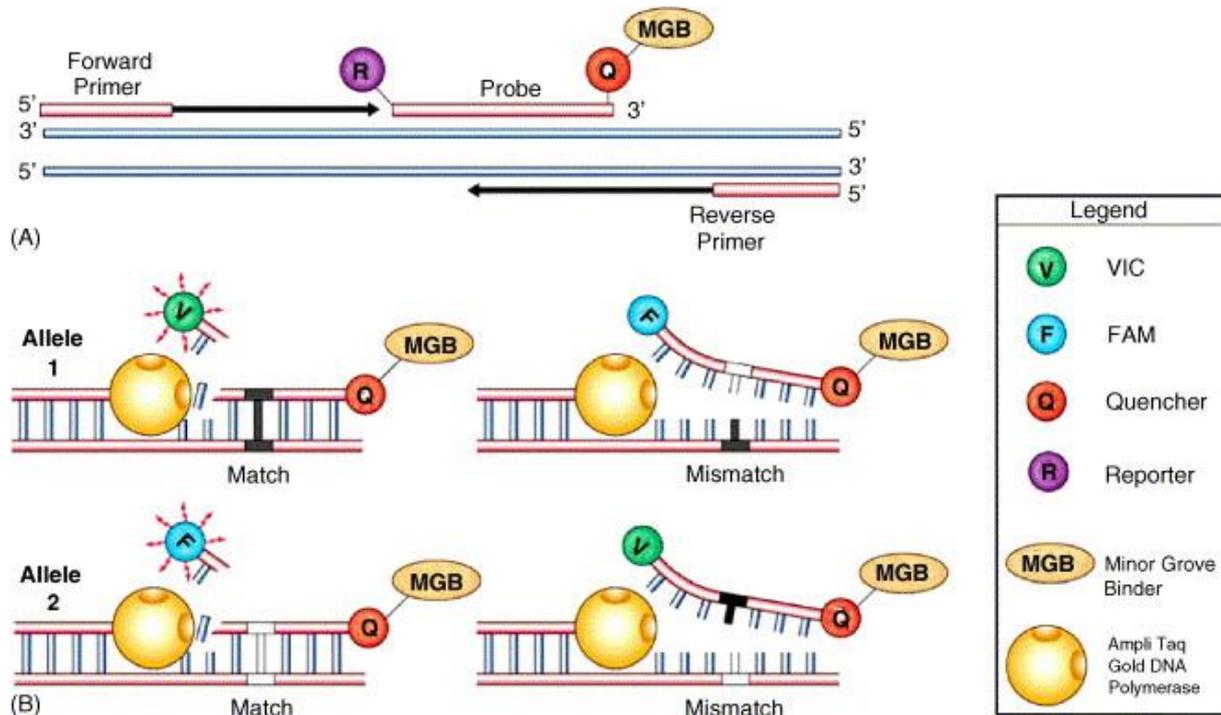


Figure 12 : Principe de génotypage par discrimination allélique TaqMan (148).

II.4.2.2. Mode opératoire :

Pour le génotypage du gène *TAAC3* nous avons utilisés le kit TaqMan® SNP Genotyping Assays de life technologie (Thermo Fisher®). Ce kit comprend deux amorces sens et antisens spécifiques de la région qui renferme le SNP étudié, et les deux sondes, marquées à leur extrémité 5', et ne différant l'une de l'autre que par un nucléotide, l'une complémentaire de la séquence sauvage et l'autre complémentaire de la séquence mutée. Pour chaque type de sonde nous avons utilisé un fluorochrome différent (VIC® pour l'allèle normal et FAM™ pour l'allèle muté).

➤ Préparation des plaques PCR :

Tableau 7 : Mix de la QPCR réalisé dans un volume final de 10 µl.

Réactifs	Volume (µl)
TaqMan genotyping master mix X2.	5 µl
TaqMan genotyping assay X20.	0,5 µl
10 ng d'ADN	1 µl
H ₂ O	3,5 µl

Il est recommandé que le TaqMan genotyping assay soit bien conservé à l'abri de la lumière

Les mix sont par la suite déposés sur des plaques Star Lab transparentes (référence : I1402-9909-BC) adaptées au thermocycleur (LightCycler 480 Roche®) puis recouvertes avec un film adhésif.

➤ **Réalisation de la QPCR :**

La QPCR a été effectuée sur un LightCycler 480 selon le programme suivant :

95 °C, 10 min
95 °C, 15 sec } 40 cycles
60 °C, 1 min }

Pour le génotypage par PCR fluorescente des « calibrateurs » (allèle sauvage et allèle muté) sont nécessaires. Nous avons choisi comme calibrateurs des échantillons issus de notre propre banque d'ADN qui avaient été antérieurement génotypé par la technique de référence PCR-séquençage. Le calibrateur allèle sauvage (allèle 1) était un sujet homozygote sauvage (CC) et le calibrateur allèle muté (allèle 2) était un sujet TT.

➤ **Lecture et analyse des résultats :**

La lecture et l'analyse des résultats sont effectuées grâce au logiciel LightCycler® 480 Software V1.5 (Roche®). La détection de la fluorescence émise par les sondes VIC ou FAM, hybridées respectivement à l'allèle sauvage et l'allèle muté permet de distinguer les trois génotypes : le génotype sauvage (CC) lorsque la fluorescence est émise par VIC uniquement, le génotype muté (TT) où la fluorescence est émise par FAM uniquement et le génotype hétérozygote (CT) s'il y a lieu d'émission des deux fluorescences VIC et FAM simultanément.

II.5. Analyse statistique :

Les résultats obtenus ont été analysés par des tests de statistiques conventionnels : En ce qui concerne la variante âge des patients et des témoins, les variables quantitatives sont décrites par la moyenne \pm l'écart type (SD).

L'âge moyen a été déterminé par calcul de la moyenne (somme de toutes les valeurs d'observation \div nombre d'observations). L'écart type \pm SD (mesure de la dispersion autour de la moyenne) nous a permis d'estimer la dispersion de l'âge dans notre population d'étude.

Au cours de ce travail, nous avons établi une étude statistique d'association entre les délétions *GSTM1*, *GSTT1*, polymorphisme *TACC3* et cancer de la vessie. Les risques relatifs ont été estimés en calculant les Odds ratios (OR) avec des intervalles de confiance à 95% (IC) au seuil de signification de 0,05. Le but est de mettre en évidence une différence dans les fréquences alléliques du marqueur étudié entre les patients et les témoins.

II.5.1. Calcul de l'Odds Ratio :

L'Odds ratio a été calculé par l'utilisation du logiciel R software version 3.2.3. Les résultats ont été confrontés à ceux calculés à partir du logiciel Epi-info (version 6). Pour calculer l'Odds ratio à partir de ce dernier logiciel nous avons établi un tableau de contingence : Il est sous forme de tableau croisé 2x2 (Tableau 8).

Tableau 8 : Tableau de contingence croisé.

	Patients	Témoins	Total
Exposés au facteur de risque présumé de la maladie (E+)	a	B	a+b
Non exposés au facteur de risque présumé de la maladie (E-)	c	D	c+d
	a + c	b+d	a+b+ c+d

L'intensité de l'association entre le polymorphisme et la maladie est calculée comme suit :

$$OR = a * d / b * c$$

Le risque est d'autant plus élevé pour les sujets porteurs de l'allèle à risque et dont le calcul de l'OR est supérieur à 1.

L'OR est toujours accompagné par l'intervalle de confiance (IC) à 95 %.

II.5.2. La valeur p (p-value) :

Correspond au degré de signification qui correspond à la probabilité que l'écart global entre patients et témoins soit dû au hasard. Avec un intervalle de confiance de 95%.

Pour le choix de la valeur p, le seuil critique a priori est de 0,05 (risque α). Si la valeur de p calculée à posteriori est inférieure à ce seuil, la différence de distribution entre patients et témoins pour un marqueur donné est déclarée statistiquement significative. Le marqueur étudié

dans ce cas peut être considéré comme étant associé à la pathologie. Le calcul de la p-valeur a été assuré par les mêmes logiciels cités ci-dessus.

Il est à noter que tous les résultats du génotypage des polymorphismes étudiés que ce soit des patients ou ceux des témoins ont été portés sur fichier Excel afin d'assurer les calculs des fréquences alléliques et génotypiques. Ces fréquences ont été comparées à celles calculés par les deux logiciels utilisés.

I. Caractéristiques générales de la population d'étude :

A partir des renseignements personnelles tirés des questionnaires élaborés et remplis par nous même pour les patients et les témoins et à partir des données cliniques obtenus soit directement des médecins traitants ou en consultant le dossier médical de chaque patient nous avons pu répartir l'ensemble des sujets selon le sexe, les tranches d'âges et le statut tabagique. Les patients ont été également répartis selon leurs données cliniques à savoir le stade, le grade tumoral et la récurrence. Les caractéristiques des sujets (patients ou témoins) ont été rapportées dans les Tableaux 9 et 10.

I.1. Age et sexe :

La population des patients recueillis est formée de **175** patients atteints du cancer de la vessie issus de familles indépendantes, tous originaires du Nord Est ou du Nord Centre de l'Algérie et venant de 18 wilayas. 162/175 (92,6 %) sont des hommes et 13/175 (7,4%) sont des femmes, le sex-ratio est de **12:1** et une moyenne d'âge au moment du diagnostic de $60,77 \pm 13,21$ ans (intervalle 22-90 ans). Il est à noter qu'aucun des patients recrutés n'avait d'antécédent familial, ce qui élimine la possibilité de réaliser des études familiales.

Dans le but de réaliser une étude comparative entre cas et témoins, **188** témoins apparemment sains et non apparentés d'une moyenne d'âge de $59,56 \pm 14,02$ ans (22-89 ans) sont recrutés dans les mêmes conditions. Les patients et les témoins sont appariés selon l'âge, le sexe et l'origine (Tableau 9).

Tableau 9 : Caractéristiques générales de la population d'étude.

<i>paramètres</i>	<i>Témoins</i>		<i>Cas</i>		<i>p-value</i>
	(n=188)		(n=175)		
<i>Sexe</i>					0,37
homme	169	89,9%	162	92,6%	
Femme	19	10,1%	13	7,4%	
<i>Age (ans)</i>					0,5
<50	43	22,9%	35	20%	
≥50	145	77,1%	140	80%	
<i>Moyenne d'âge (intervalle)</i>	59,56±14,02		60,77±13,21		
<i>Grade</i>	(22-89)		(22-90)		
G1			28	16%	
G2			44	25,1%	
G3			103	58,9%	
<i>Stade TNM</i>					
Ta			34	19,4%	
T1			85	48,6%	
T2			41	23,4%	
T3 ou plus			15	8,6%	
<i>Récidive</i>					
Non			81	46,3%	
Oui			94	53,7%	
cystectomie après évolution			9	5,1%	

Notre étude a révélé en premier lieu que ce type de cancer touche préférentiellement les hommes (sex-ratio **12:1**). Cette prédominance masculine est rapportée dans la totalité des travaux réalisés sur ce type de cancer quel que soit le groupe ethnique mais avec des incidences variables d'une population à une autre. Dans la plupart des travaux réalisés à travers le monde le sex-ratio varie entre 4:1 et 5:1 (149-151). Ainsi, dans les populations nord africaines il est compris en général entre 5:1 et 6:1 (16, 18, 21). En Algérie, deux études épidémiologiques l'une réalisée par Hamdi Cherif *et al.* (25) dans l'Est (région de Sétif) et l'autre menée par Salah *et al.* (152) dans l'Ouest (région de Sidi Bel Abas) (152), ont montré que le sex-ratio chez les patients atteints de cancer vésical été de 10:1, ces résultats sont presque comparables à ceux de notre population d'étude.

Ce fait, que les hommes ont un risque d'atteinte plus accru par rapport aux femmes a été expliqué par l'exposition des hommes à un certains nombres de facteurs de susceptibilité tel que le tabagisme qui a lui seul multiplierait le risque de 4 fois et aussi l'exposition professionnelle (29). Il serait expliqué également par les différences anatomiques de l'appareil urinaire chez les deux sexes, les habitudes urinaires chez les hommes et d'autres facteurs hormonaux (29, 33). Dans ce contexte, il a été rapporté que les hormones sexuelles et notamment le récepteur aux androgènes (AR) expliquerait aussi cette différence. En effet, plusieurs études ont démontré que l'expression de AR est augmenté dans les tumeurs de patients atteints de cancer vésical et que l'AR serait impliqué dans plusieurs voies de signalisation telles que la prolifération, l'angiogenèse, la migration, favorisant ainsi la tumorigénèse et la progression de ce type de cancer (153, 154).

Dans notre population la survenue de ce type de cancer est rare et plus tardive chez la femme, la fréquence obtenue de 7,4% est plus faible que celles observées dans les autres populations où elle est comprise entre 15% et 20% chez les Asiatiques (151, 155), alors que chez les Caucasiens elle peut arriver jusqu'à 28% (156). Cette différence est probablement due à des raisons typiques aux traditions et mode de vie de la population algérienne. Selon Fajkovic *et al.* (31) le pourcentage de femmes atteintes par le cancer de vessie à travers le monde augmente depuis quelques années et ce, notamment à cause de la progression du tabagisme féminin.

En deuxième lieu d'après la répartition des cas selon les tranches d'âges nous avons remarqué que la survenue de cette étiologie augmente progressivement avec l'âge des patients avec une fréquence maximale entre 60 et 69 ans (30,3%) et une moyenne d'âge au diagnostic de la maladie de $60,77 \pm 13,21$ ans (Figure 13). Ces résultats se rapprochent de ceux de nos voisins Marocains (157) et Tunisiens (158) et diffèrent de la moyenne d'âge internationale oscillant entre 65 et 70 ans (66, 159, 160). Par contre, ils se trouvent complètement différents des séries Africaines rapportant une survenue de la maladie plus précoce (âge médian entre 45 et 49 ans), qui s'expliquerait par l'endémie de la Bilharziose qui reste le principal facteur cancérigène dans les pays Africains (161, 162).

Environ 80% de nos patients ont plus de 50 ans lors du diagnostic. En effet, selon Ferris *et al.* (28) le cancer vésical est typique de la vieillesse, la grande majorité des cas sont diagnostiqués après l'âge de 65 ans, rarement avant l'âge de 50 ans et exceptionnellement chez les patients âgés de 10 ans ou moins. Cette caractéristique met en évidence la résistance biologique innée des cellules de la muqueuse de la vessie aux carcinogènes urinaires et plasmatiques, avec des latences de plusieurs décennies.

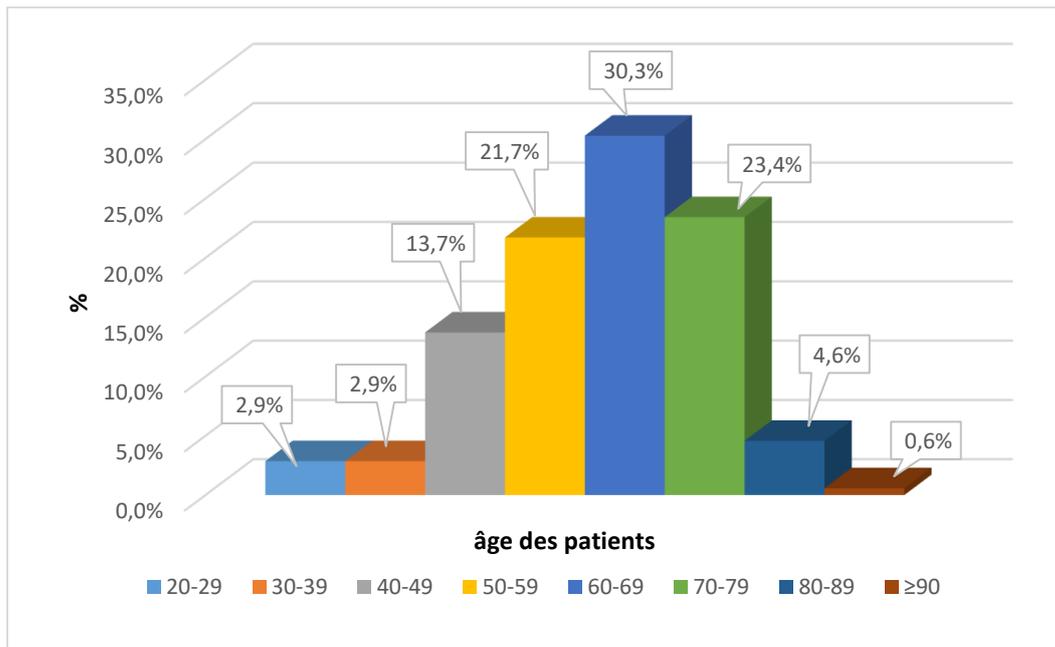


Figure 13 : Répartition des patients selon l'âge du diagnostic.

I.2. Statut tabagique :

L'utilisation du tabac représente l'un des facteurs les plus communs et le plus incriminé dans la carcinogénèse vésicale à travers le monde (163). L'utilisation de la pipe et du tabac à priser semble également être des facteurs de risque pour cette étiologie (23). Dans ce contexte nous avons exploré au cours de notre étude l'impact de deux formes de consommation du tabac sur le cancer vésical à savoir le tabac sous forme de cigarettes et le tabac à priser qui est très consommé en Algérie.

D'après nos résultats (Tableau 10), il s'avère que la consommation de tabac sous forme de cigarettes est plus répandue dans le groupe des patients atteints de cancer vésical (69,7%) que dans celui des témoins (39,4% (OR=3,55 ; CI : 2,29-5,48 et $p=1,21E-08$). Ces résultats concordent avec ceux de Burger *et al.* (29) qui ont montré que plus de 50% des patients atteints de ce type de cancer sont des fumeurs et ramènent des preuves concrètes que le tabagisme est un facteur de risque important dans la survenue et le développement de cancers vésicaux. En effet il a été rapporté que chez les patients fumeurs, le risque de développer un cancer de la vessie serait multiplié par 3 par rapport aux patients non-fumeurs (164). Ceci est dû à l'action des substances carcinogènes présentes dans la cigarette telle la 2-naphtylamine et le 4-aminobiphenyl et d'autres amines aromatiques secrétées dans l'urine des fumeurs et seraient responsables de mutations génétique des cellules épithéliales et le déclenchement du processus de carcinogénèse vésicale (165).

Tableau 10 : Informations générales du statut tabagique de la population d'étude.

	Témoins	%	Cas	%	OR	IC	p- value
<i>Cigarette</i>							
<i>non-fumeurs</i>	114	60,64%	53	30,29%	1		
<i>fumeurs ou anciens fumeurs</i>	74	39,36%	122	69,71%	3,55	2,29 – 5,48	1,21E-08
<i>Fumeurs</i>							
<i>taux de consommation (cigarette/jour)</i>							
<i>Passive</i>	4	2,13%	1	0,57%	0,54	0,01 – 5,62	1
<i>1 à 20</i>	41	21,81%	48	27,43%	2,52	1,49 - 4,27	0,0006
<i>21 à 40</i>	23	12,23%	42	24%	3,74	1,99 – 7,18	1,38E-05
<i>> 40</i>	1	0,53%	7	4%	14,8	1,8 - 682	0,002
<i>durée de consommation (années)</i>							
<i><10</i>	6	3,19%	5	2,86%	1,78	0,41 – 7,38	0,34
<i>≥10</i>	63	33,51%	93	53,14%	3,17	2,01 – 5,01	7,05E-07
<i>anciens fumeurs</i>							
<i>durée d'arrêt de consommation (années)</i>							
<i>arrêt<5</i>	0	0%	1	0,57%			
<i>5≤ arrêt ≤10</i>	5	2,66%	4	2,29%			
<i>25> arrêt >10</i>	0	0%	19	10,86%			

Par ailleurs, l'incidence du cancer vésical est aussi liée à la durée d'exposition au tabac et la quantité de cigarettes consommées (166, 167). En effet, dans notre population d'étude le risque se trouve augmenté considérablement avec le nombre de cigarettes consommées par jour (Tableau 10). Parmi nos patients fumeurs actifs 50 % (49/98) sont des gros fumeurs (entre 20 et 40 cigarettes ou plus) et presque 95% (93/98) d'entre eux ont fumé durant une longue période (plus de 10 ans) confirmant ainsi l'effet dose c'est-à-dire l'accumulation des effets nocifs au fil du temps. Ces résultats sont en accord avec ceux de Mitra *et al.* (33) qui ont montré que le risque de survenue du cancer vésical augmente avec l'intensité du tabagisme, la durée de consommation et reste présent même jusqu'à 25 ans après l'arrêt de consommation du tabac. De même pour les résultats de Brennan *et al.* (168) qui a observé une augmentation significative du risque de développer un cancer de vessie au-delà de 10 cigarettes fumées par jour et pour une durée au moins égale à 10 ans. Dans ce même contexte une étude réalisée par Bjerregaard *et al.* (169) explorant le risque de développer une tumeur vésicale chez les fumeurs actifs, les anciens fumeurs et les non-fumeurs a mis en évidence un risque accru de cancer de vessie à la

fois chez les fumeurs actifs et anciens fumeurs comparativement aux non-fumeurs. Ce risque augmente avec l'intensité et la durée du tabagisme chez les fumeurs actifs et diminue par rapport à un âge tardif de début du tabagisme et avec l'augmentation de la durée de sevrage.

La deuxième forme de consommation de tabac répandue dans la population algérienne est le tabac à priser. Il contient les mêmes substances chimiques retrouvées dans la cigarette mais avec une dose plus importante de nicotine ce qui rend les consommateurs de ce type de tabac plus dépendants que les fumeurs. D'après le Tableau 11, cette habitude est aussi bien fréquente chez les patients que chez les témoins (49,71 % vs 45,21%). Il s'en suit que l'étude de l'association entre statut tabagique (tabac à priser) et survenue de cancer de la vessie n'a montré aucune association. Ceci pourrait être expliqué d'une part par l'effet dose / durée puisque la majorité de nos témoins ont commencé à utiliser cette forme de tabac à un âge avancé comparé à nos patients qui l'ont consommé à un âge plus précoce. D'autre part, il a été montré dernièrement que les concentrations de certains composés du tabac à priser ont été diminuées par rapport au tabac fumé même le taux des substances carcinogènes a été réduit (plus de 30 carcinogènes dans le tabac à priser contre plus de 60 carcinogènes dans le tabac fumé) ce qui rend l'effet du tabac à priser moins nocif que celui du tabac fumé (170). Aucune étude précédente n'a testé l'association de tabac à priser avec le risque du cancer de la vessie, alors qu'il est fortement associé à d'autres types de cancer (cancer buccal, cancer de l'œsophage et cancer pancréatique) selon la méta-analyse de Bouffetta *et al.* (170). Les auteurs concluent qu'il y a probablement moins de risques de cancer chez les consommateurs de tabac à priser que chez les fumeurs, tout en rappelant bien que le risque de cancer est plus élevé évidemment chez les consommateurs de tabac à priser que chez ceux qui ne consomment aucune forme de tabac.

Tableau 11 : Statut tabagique (consommation du tabac à priser).

<i>statut tabagique</i>	<i>Témoins</i>	<i>%</i>	<i>Cas</i>	<i>%</i>	<i>OR</i>	<i>IC</i>	<i>p-value</i>
<i>Tabac à priser</i>							
<i>non-consommateur</i>	103	54,79%	88	50,29%	1		
<i>anciens consommateurs</i>	6	3,19%	3	1,71%	0,58	0,09 - 2,8	0,51
<i>consommateurs</i>	79	42,02%	84	48,00%	1,24	0,8 - 1,9	0,3
<i>consommateur ou anciens consommateur</i>	85	45,21%	87	49,71%	1,2	0,8 - 1,8	0,4
<i>total</i>	188	1	175	1			

I.3. Données cliniques :

Notre étude a porté sur 175 patients atteints de tumeurs de la vessie à différents stades et grades au moment du diagnostic. La classification anatomopathologique du grade selon l’OMS 1973 a révélé (Figure 14) :

- 16% de tumeurs de grade I.
- 25,1% de tumeurs de grade II.
- 58,9% de tumeurs de grade III.

D’après la classification anatomopathologique TNM, ces tumeurs sont classées selon les stades suivants :

- 19,4% de stade Ta.
- 48,6% de stade T1.
- 23,4% de stade T2.
- 8,6% de stade T3 ou plus.

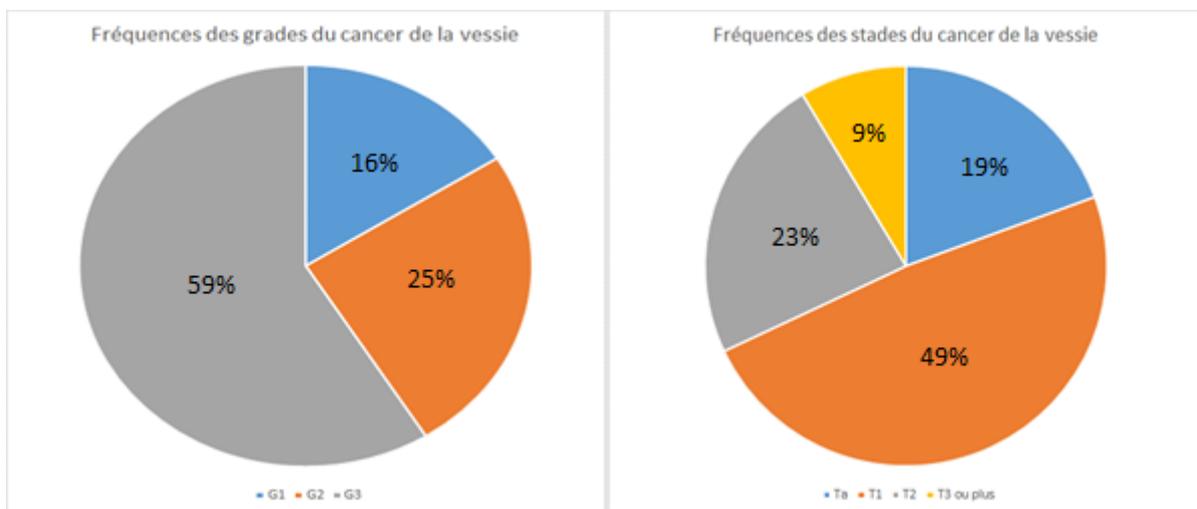


Figure 14 : Répartition des tumeurs étudiées selon le grade et le stade tumoral.

La première observation qui attire l’attention est la nature agressive des tumeurs vésicales chez nos patients. En effet, seulement 19,4% (N=34) de nos malades ont des tumeurs de stade Ta. Parmi les TVNIM de stade Ta (15/34) présentent le grade III. Selon les dossiers de ces patients 10/15 sont diagnostiqués au stade TaG3 directement (pas d’évolution à partir des G1

ou G2) et les 5 autres malades ont eu une récurrence dans les 4 ans qui suivent une première résection d'une tumeur d'un grade I ou II.

Il est à noter que la plupart des patients présentent des tumeurs PT1 soit 48,6% (N=85), le plus souvent de grade III (50/85). L'origine de ces T1 le plus probable serait l'évolution des tumeurs TaG3 sachant que la plupart de ces patients ont subi plusieurs résections (entre 2 à 7 résections) durant des années, certains malades ont subi 7 résections dans un intervalle de plus que 10 ans. Ces informations nous renseignent sur la gravité de l'état de nos malades.

Dans notre échantillon le taux de récurrence est important, 54% des patients ont rechuté après traitement. Parmi les 81 patients qui n'ont pas eu de récurrence, 4 d'entre eux n'ont pas présenté de récurrence dans les 5 ans qui suivent la première résection (Figure 15).

Le taux de récurrence le plus important est observé chez les patients avec des tumeurs TaG1-G2 avec une fréquence d'environ 75% alors que pour les autres types les fréquences sont comprises entre 47% pour les TaG3 et environ 50% pour les autres stades et grades. Les fréquences de récurrence des TaG1-G2 sont similaires à celles de la littérature alors que pour les autres types on remarque que nos fréquences sont plus importantes (171, 172). Ces résultats sont aussi comparables avec ceux d'Irani *et al.* (173) qui ont montré que les patients ayant des tumeurs vésicales superficielles PT1G3 présentent un risque élevé de rechute à 5 ans et une élévation du risque de décès à 10 ans.

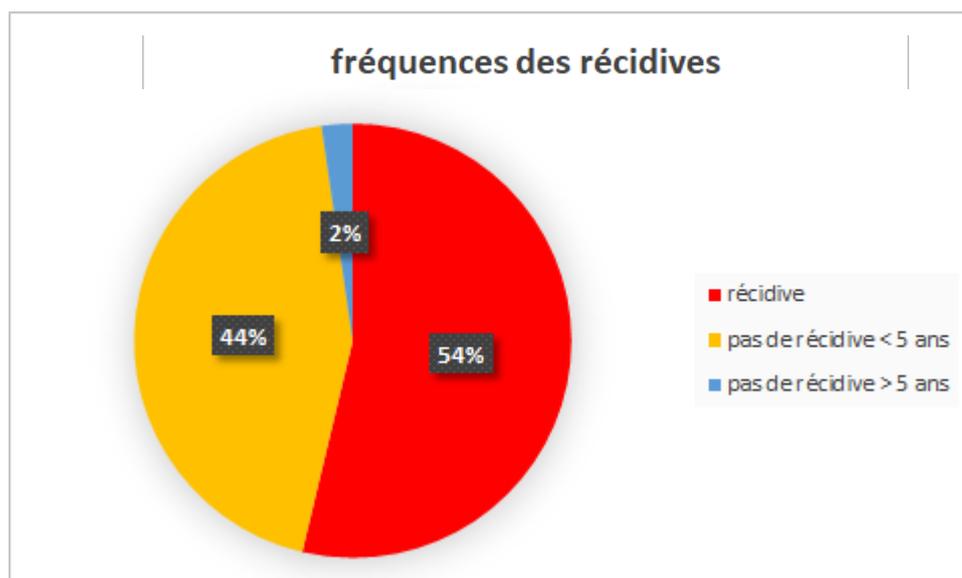


Figure 15 : Répartition des récurrences des tumeurs vésicales.

II. Analyse des polymorphismes des gènes *GSTM1*, *GSTT1* par PCR multiplexe et leurs interactions avec la consommation de tabac et les paramètres clinico-pathologiques :

Le cancer de la vessie est le résultat final de plusieurs combinaisons entre des facteurs endogènes dits facteurs constitutionnels et des facteurs exogènes dits facteurs environnementaux (28). De ce fait, les polymorphismes génétiques des gènes impliqués dans le mécanisme de détoxification peuvent être hautement impliqués dans la susceptibilité individuelle face au risque de cancers y compris les cancers vésicaux. Ces variations génétiques causent la vulnérabilité des défenses cellulaires contre les facteurs environnementaux ce qui pourrait augmenter leurs risque vis-à-vis de la carcinogénèse en générale et vésicale en particulier (174). Un exemple de ces variations porte sur les délétions dans les gènes *GSTM1* et *GSTT1* codant pour des enzymes de la famille GST intervenant dans la phase II de détoxification. Ces enzymes sont responsables du métabolisme des xénobiotiques et des substances carcinogènes dont celles présentes dans le tabac (28, 37, 48, 94). Leur déficit total ou partiel conduit à un défaut de détoxification à effet génotoxique favorisant ainsi l'apparition de cancer.

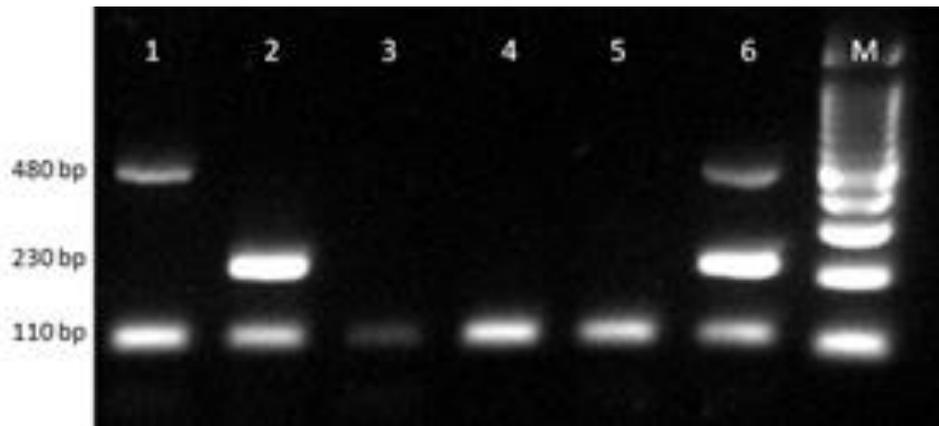
Le but de cette étude a été d'abord d'examiner l'association entre les polymorphismes des gènes *GSTM1* et *GSTT1* et le risque du cancer de la vessie à travers une étude cas-témoins dans la population algérienne. Ensuite, nous avons essayé d'évaluer le différentiel ainsi que l'effet combiné des polymorphismes d'intérêt en fonction du tabagisme dans l'apparition et le développement de ce type de cancer. Puis, nous avons cherché s'il y a des associations entre les deux gènes étudiés et les caractéristiques clinico-pathologiques du cancer de la vessie.

Par ailleurs, nous avons testé également l'association entre les délétions des gènes *GST* et le polymorphisme rs7988766 du gène *TACC3* localisé à proximité du gène *FGFR3* et représentant un facteur de risque du cancer vésical selon la littérature (109).

II.1. Fréquences des *GST* et association avec le cancer de la vessie :

Lors du déroulement de la réaction de la PCR multiplexe nous avons amplifié simultanément des fragments de 480 pb du gène *GSTT1*, de 230 pb du gène *GSTM1* et de 110 pb du gène β -globuline, contrôle interne de la PCR. La bande de β -globuline sera présente dans tous les profils de migration indiquant le succès de la PCR (voir photographie 3).

Les délétions homozygotes *GSTM1* et *GSTT1* sont caractérisées par une absence totale des bandes correspondantes à l'amplification. Dans notre étude nous tenons compte que des délétions homozygotes car elles se traduisent par une perte totale de l'enzyme.



Photographie 3 : Analyses des délétions *GSTM1*, *GSTT1* par PCR multiplexe ; M, marqueur de taille 100 bp ; 1, *GSTM1* 0/0 et *GSTT1* positive ($M1-/T1+$) ; 2, *GSTM1* positive/*GSTT1* 0/0 ($M1+/T1-$) ; 3, 4 et 5, *GSTM1* 0/0 et *GSTT1* 0/0 ($M1-/T1-$) ; 6, *GSTM1* positive/*GSTT1* positive ($M1+/T1+$).

Il ressort des résultats obtenus que le génotype *GSTM1* 0/0 ($M1-$) soit plus fréquent que le génotype *GSTT1* 0/0 ($T1-$) dans notre population d'étude. Le génotype *GSTM1* 0/0 est retrouvé avec une fréquence de 57,1% chez les patients et de 44,7% chez les témoins (Tableau 12). Cette différence est statistiquement significative ($p = 0,018$). En effet, d'après la littérature il a été rapporté que la fréquence de délétion homozygote du gène *GSTM1* varie selon l'origine ethnique, elle est comprise entre 31% et 88% (128). Nos fréquences sont cependant proches de celles retrouvées chez les populations tunisiennes et égyptiennes en particulier pour les témoins (44,8% et 45,9% respectivement) (175-177).

En ce qui concerne le génotype *GSTT1 nul*, il est présent chez 39,4% des patients et 26,6% des témoins (Tableau 12). Cette différence est statistiquement significatif ($p = 0,009$). Il s'avère que ces proportions sont différentes de celles observées chez d'autres groupes ethniques (178). Ainsi il a été rapporté que la fréquence du génotype *GSTT1 nul* était plus élevée chez les patients Algériens que chez les patients Tunisiens (39,4% et 24% respectivement), alors qu'elle est inversée chez les témoins (26,6% vs 30,4%) (130).

Au cours de cette étude nous avons mené une investigation pour prospecter une possible implication des délétions des gènes *GSTM1* et *GSTT1* dans la genèse de cancer vésical en Algérie. Pour ce faire, nous avons comparé les génotypes *GST* obtenus avec les génotypes sauvages comme référence (*GSTM1* positive, *GSTT1* positive) en appliquant un test statistique incluant témoins et patients, dans un premier temps pour chaque gène séparément puis pour les combinaisons possibles des génotypes des deux gènes étudiés.

Les résultats obtenus montrent que la présence de délétion à l'état homozygote des deux gènes d'intérêt qu'ils soient pris en compte séparément ou combiné est statistiquement associée au développement du cancer de la vessie ($p < 0,05$) (Tableau 12). Le risque le plus élevé a été observé pour le génotype *GSTM1 0/0 / GSTT1 0/0* ($p = 0,001$).

Tableau 12 : Fréquences génotypiques des gènes *GSTM1* et *GSTT1* dans la population d'étude.

génotypes	Témoins	%	Cas	%	OR	IC 95%	p-value
<i>GSTM1</i>							
<i>MI+</i>	104	55,3%	75	42,90%	1		
<i>MI-</i>	84	44,7%	100	57,10%	1,65	1,09 – 2,5	0,018
<i>GSTT1</i>							
<i>TI+</i>	138	73,4%	106	60,6%	1		
<i>TI-</i>	50	26,6%	69	39,4%	1,8	1,15 – 2,8	0,009
<i>GSTM1/GSTT1</i>							
<i>MI+/TI+</i>	76	40,4%	40	22,9%	1		
<i>MI+/TI-</i>	28	14,9%	35	20%	2,36	1,2 – 4,67	0,004
<i>MI-/TI+</i>	62	33%	66	37,7%	2,02	1,2 – 3,39	0,007
<i>MI-/TI-</i>	22	11,7%	34	19,4%	2,9	1,44 – 6	0,001
<i>MI- ou TI-</i>	112	59,6%	135	77,1%	2,29	1,45 – 3,6	0,0004

Nos résultats indiquent que dans la population algérienne le génotype *GSTM1 0/0* confère statistiquement une corrélation significative pour le risque global du cancer de la vessie ($p=0,018$). Cette constatation est cohérente avec les résultats rapportés dans une méta-analyse regroupant 26 études cas-témoins sur différents groupes ethniques incluant 5029 patients atteints du cancer de la vessie et 6680 témoins, fournissant des preuves de l'association du génotype *GSTM1 0/0* avec le risque de survenue d'un cancer vésical dans les populations Asiatiques et Caucasiennes (179). Contrairement à ces groupes ethniques et à nos résultats,

chez les Tunisiens et les Egyptiens les études ne montrent aucune association entre la délétion du gène *GSTM1* et le risque du cancer de la vessie (129, 130, 177, 180).

De même pour le gène *GSTT1*, nous avons montré une association entre le génotype *GSTT1 0/0* et la carcinogénèse vésicale. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de la méta-analyse de Gong *et al.* (94) indiquant l'implication de la délétion du gène *GSTT1* dans la genèse de cancers vésicaux chez les Caucasiens. Chez d'autres populations y compris les populations nord africaines cette association n'a pas été prouvée (48, 94, 129, 130, 155, 177), à l'exception de l'étude menée par Saad *et al.* (180) ou ils suggèrent une association de cette délétion au risque de développement d'un cancer de la vessie dans la population égyptienne.

L'analyse des combinaisons possibles entre les génotypes des deux gènes d'intérêt (*GSTM1/GSTT1*) présentée dans le Tableau 12 montre que la présence d'au moins de l'un des deux génotypes *GSTM1 0/0* ou *GSTT1 0/0* représente un facteur de risque pour le cancer de la vessie ($p < 0,05$). Nous constatons qu'environ 77% des patients ont au moins l'une des deux délétions contre environ 59% des témoins, il apparaît que le risque le plus important est associé à la présence simultanée des deux délétions *GSTM1 0/0 / GSTT1 0/0* ($p = 0,001$). Nos résultats sont cohérents avec ceux rapportés dans des méta-analyses fournissant la preuve de corrélation statistiquement significative entre la présence de la double délétion des gènes *GST* étudiés et la carcinogénèse vésicale (94, 95). Ces observations peuvent être expliquées par le fait que la présence des deux délétions à l'état homozygote est associée à une réduction ou une perte totale de l'activité enzymatique des Glutathion S-Transférases (48, 181). Dans ce contexte, on pourrait suggérer que la présence de la double délétion *GSTM1 0/0 / GSTT1 0/0* jouerait un rôle important dans la carcinogénèse vésicale mettant en exergue le rôle biologique important accompli par les enzymes Glutathion S-transférases dans la détoxification des xénobiotiques.

II.2. Distribution des génotypes *GSTM1 0/0* et *GSTT1 0/0* selon l'âge :

Nous avons analysé la répartition des polymorphismes *GST* en divisant notre échantillon en deux groupes selon l'âge (plus ou égal à 50 ans pour le 1^{er} groupe et inférieur à 50 ans pour le 2^{ème} groupe). Les résultats sont présentés dans le Tableau 13.

Tableau13 : Association du génotype *GSTM1* et/ou *GSTT1* avec l'âge de la population d'étude.

	<i>Cas</i>	<i>%</i>	<i>Témoins</i>	<i>%</i>	<i>OR</i>	<i>IC</i>	<i>p-value</i>
	<50 ans						
<i>Génotypes</i>							
(+/+)	7	20,0%	19	44,2%	1		
(+/-)	8	22,9%	5	11,6%	4,1	0,8 – 22	0,08
(-/+)	16	45,7%	13	30,2%	3,2	0,9 – 12	0,054
(-/-)	4	11,4%	6	14%	1,8	0,3 – 10	0,45
<i>Total</i>	35	100,0%	43	100,0%			
	≥50 ans						
(+/+)	33	23,6%	57	39,3%	1		
(+/-)	27	19,3%	22	15,2%	2,1	0,98 – 4,6	0,048
(-/+)	50	35,7%	50	34,5%	1,7	0,97 - 3,1	0,06
(-/-)	30	21,4%	16	11%	3,2	1,5 – 7,3	0,001
<i>Total</i>	140	100,0%	145	100,0%			

Les tests statistiques montrent que chaque gène seul ne représente pas un facteur de risque de carcinogénèse vésicale pour les deux groupes (<50 ans et ≥50 ans). Pour le groupe <50 ans la présence d'une double délétion des deux gènes *GSTM1* et *GSTT1* n'est pas un facteur de risque du cancer de la vessie, cependant, elle est fortement associée au cancer vésical pour les patients de plus de 50 ans. La vulnérabilité du système immunitaire, la fragilité de l'organisme avec l'âge en plus de la différence de la durée d'exposition aux facteurs de risque environnementaux peuvent expliquer cette différence.

II.3. Combinaison *GST*-tabac et association au risque du cancer de la vessie :

Comme mentionné précédemment les gènes de la famille *GST* en général et les gènes *GSTM1* et *GSTT1* en particulier jouent un rôle important dans la phase II de détoxification d'un large éventail de xénobiotiques y compris les HAP. Au cours de notre étude, nous avons aussi démontré préalablement que le tabac referme un nombre important de xénobiotiques dont les HAP et est associé au cancer de la vessie chez nos patients. Par conséquent vu que le rôle des gènes d'intérêt est nettement lié au tabagisme nous avons cherché l'implication de la combinaison polymorphisme *GST*-statut tabagique sur la genèse du cancer vésical.

II.3.1. Cigarette :

La stratification des patients et des témoins selon les génotypes *GST* et le statut tabagique est illustrée dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Stratification des patients et des témoins selon les génotypes *GST* et le statut tabagique (cigarette).

	<i>Témoins</i>	<i>%</i>	<i>Cas</i>	<i>%</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>	<i>p-value</i>
<i>GSTM1-cigarette</i>							
<i>Non-fumeurs</i>							
<i>MI+</i>	58	30,9%	28	16%	1		
<i>MI-</i>	56	29,8%	25	14,3%	0,9	0,45 – 1,86	0,87
<i>Fumeurs ou anciens fumeurs</i>							
<i>MI+</i>	46	24,5%	47	26,9%	2,1	1,1 – 4,1	0,01
<i>MI-</i>	28	14,9%	75	42,9%	5,5	2,84 – 10,9	3,87E-08
<i>GSTT1-cigarette</i>							
<i>Non-fumeurs</i>							
<i>T1+</i>	81	43,1%	31	17,7%	1		
<i>T1-</i>	33	17,6%	22	12,6%	1,7	0,8 – 3,6	0,1
<i>Fumeurs ou anciens fumeurs</i>							
<i>T1+</i>	57	30,3%	75	42,9%	3,4	2 – 6	6,96E-06
<i>T1-</i>	17	9%	47	26,9%	7,1	3,4 – 15,4	6,3E-09
<i>GSTM1/GSTT1-cigarette</i>							
<i>Non-fumeurs</i>							
<i>MI+/T1+</i>	38	20,2%	14	8%	1		
<i>MI+/T1-</i>	20	10,6%	14	8%	1,9	0,7 – 5,2	0,2
<i>MI-/T1+</i>	43	22,9%	18	10,3%	1,1	0,5 -2,8	0,8
<i>MI-/T1-</i>	13	6,9%	7	4%	1,4	0,4 – 5	0,56
<i>Fumeurs ou anciens fumeurs</i>							
<i>MI+/T1+</i>	38	20,2%	26	14,9%	1,8	0,8 – 4,4	0,17
<i>MI+/T1-</i>	8	4,3%	21	12%	6,9	2,3 – 22,7	0,0001
<i>MI-/T1+</i>	19	10,1%	48	27,4%	6,7	2,8 – 16,8	1,33E-06
<i>MI-/T1-</i>	9	4,8%	27	15,4%	7,9	2,8 – 24,4	1,09E-05

Les résultats indiquent une association non statistiquement significative entre les génotypes *GSTM1 0/0*, *GSTT1 0/0* pris en compte séparément ou les génotypes combinés *GSTM1 / GSTT1* et le risque du cancer vésical dans le groupe des non-fumeurs.

Cependant, nous avons remarqué que dans le groupe : fumeurs / anciens fumeurs, tous les génotypes testés ont été révélés comme des génotypes à risque, à l'exception de la combinaison *GSTM1 positive / GSTT1 positive* ($p = 0,17$). Il est important de noter que l'association entre le tabagisme et les génotypes d'un *GST nul* augmente considérablement le risque (OR = 6,7 ; IC : 2,8-16,8 ; $p = 1,33E-06$) pour le génotype *GSTM1 0/0* et (OR = 6,9 ; IC : 2,3 -22,7, $p = 0,0001$) pour le génotype *GSTT1 0/0*. Les fumeurs avec la présence concomitante des deux délétions ont un risque plus accru de développer un cancer de la vessie (OR = 7,9; IC : 2,8-24,4 ; $p = 1,09E-05$).

Cette combinaison gène-tabac est biologiquement plausible car les gènes *GSTM1* et *GSTT1* sont impliqués dans la détoxification de phase II des carcinogènes HAP présents dans la fumée des cigarettes. Il est admis également que ce soit le génotype délété *GSTM1 0/0* ou *GSTT1 0/0*, provoque une réduction de l'activité enzymatique des enzymes de détoxification (48, 181).

Dans le groupe des non-fumeurs, l'exposition aux cancérogènes de la fumée de tabac est moindre par rapport au groupe des fumeurs. Ce qui explique par ailleurs que les génotypes délétés des gènes *GSTM1* et *GSTT1* auront un effet moins nocifs chez les non-fumeurs. Au regard des fumeurs actifs, l'exposition continue rend très important le processus de détoxification qui implique des interventions d'enzymes codées par les gènes *GSTM1* et (ou) *GSTT1*, si ces derniers sont défaillants, ils entraîneront l'accumulation de l'effet nocif des carcinogènes au fil du temps et seront susceptibles d'induire le processus de cancérisation, Rouissi *et al.* (129) ont rapporté un risque accru après la combinaison de nombreux facteurs, y compris les génotypes *GSTM1nul*, *GSTT1nul* et tabagisme.

Nous concluons que l'association simultanée des facteurs de risque donne une forte probabilité de développer un cancer de la vessie, comme indiqué par l'augmentation de la valeur de l'Odds ratio présentée dans notre étude (OR = 7,9).

II.3.2. Tabac à priser :

La stratification des patients et des témoins selon les génotypes *GST* et le tabac à priser est illustrée dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Stratification des patients et des témoins selon les génotypes *GST* et le statut tabagique (tabac à priser).

	Témoins	%	Cas	%	OR	IC 95%	p-value
<i>GSTM1</i> -tabac à priser							
non-consommateur							
MI+	54	28,72%	37	21,14%	1		
MI-	49	26,06%	51	29,14%	1,51	0,8 - 2,7	0,15
consommateur ou anciens consommateur							
MI+	50	26,60%	38	21,71%	1,1	0,6 - 2	0,7
MI-	35	18,62%	49	28,00%	2	1,1 - 3,7	0,02
<i>GSTT1</i> -tabac à priser							
Non-consommateur							
T1+	71	37,77%	49	28,00%	1		
T1-	32	17,02%	39	22,29%	1,76	0,98 - 3,2	0,06
consommateur ou anciens consommateur							
T1+	69	36,70%	57	32,57%	1,2	0,7 - 2	0,48
T1-	16	8,51%	30	17,14%	2,7	1,3 - 5,9	0,006
<i>GSTM1/GSTT1</i> -tabac à priser							
non-consommateur							
MI+/T1+	36	19,15%	17	9,71%	1		
MI+/T1-	18	9,57%	20	11,43%	2,3	0,9 - 6	0,055
MI-/T1+	35	18,62%	32	18,29%	1,9	0,8 - 4,4	0,09
MI-/T1-	14	7,45%	19	10,86%	2,8	1,1 - 7,8	0,02
consommateur ou anciens consommateur							
MI+/T1+	41	21,81%	23	13,14%	1,19	0,5 - 2,8	0,7
MI+/T1-	9	4,79%	15	8,57%	3,5	1,1 - 11	0,02
MI-/T1+	28	14,89%	34	19,43%	2,5	1,1 - 5,9	0,01
MI-/T1-	7	3,72%	15	8,57%	4,4	1,4 - 15	0,005

Les résultats obtenus pour la combinaison *GST*-tabac à priser sont similaires à ceux de la combinaison *GST*-cigarette mais avec un effet moins marqué. Comme il est porté sur les deux Tableaux (14 et 15), le fait d'avoir l'un ou les deux génotypes à risque associé à la consommation de tabac sous ses deux formes augmenterait le risque par rapport à la présence des facteurs génétiques testés seuls, toutefois le risque est plus élevé chez les patients avec l'un ou les deux génotypes délétés consommant des cigarettes que pour ceux renfermant l'un ou les deux génotypes délétés et consommant le tabac à priser. Il est à noter qu'aucune étude ne rapporte cette association entre la combinaison *GST*-tabac à priser et le cancer de la vessie.

Nous concluons que la combinaison *GST*-tabac (fumé ou prisé) présente un facteur de risque élevé en comparaison avec les génotypes à risque seuls ou la consommation de tabac seul.

II.4. Interaction des polymorphismes des gènes *GSTM1*, *GSTT1* avec les paramètres clinico-pathologiques :

Comme il est observé dans le Tableau 16 les répartitions du stade et du grade tumoral ne montrent aucune différence significative avec la présence ou l'absence des délétions des gènes étudiés ($p > 0,05$). Selon la bibliographie plusieurs études n'ont montré également aucune association entre les délétions des gènes *GSTM1* et *GSTT1* et le stade et le grade des tumeurs (117, 119, 155). Il est à noter, dans notre cohorte que la majorité des patients avec des tumeurs de stade Ta (23/34) présente une délétion du gène *GSTM1*, en particulier chez les patients qui ont des tumeurs TaG1-G2, dont 89% ont au moins l'une des deux délétions (Tableau 16). Cette fréquence est supérieure à celle observée dans la population générale (environ 60%). Cela nous incite à penser que les délétions des gènes *GST* sont des mutations qui peuvent être responsable de l'initiation du processus de carcinogénèse.

Tableau 16 : Distributions des délétions des gènes *GSTM1* et *GSTT1* selon les stades et grades des tumeurs

	<i>TaG1-G2</i>		<i>TaG3</i>		<i>T1</i>		$\geq T2$		<i>p-value</i>
<i>M1+</i>	5	26%	6	40%	38	45%	25	45%	0,5
<i>M1-</i>	14	74%	9	60%	47	55%	30	55%	
<i>T1+</i>	12	63%	9	60%	47	55%	37	67%	0,55
<i>T1-</i>	7	37%	6	40%	38	45%	18	33%	
+/+	2	11%	4	27%	19	22%	14	25%	0,4
+/-	3	16%	2	13%	19	22%	11	20%	
-/+	10	53%	5	33%	28	33%	23	42%	
-/-	4	21%	4	27%	19	22%	7	13%	
	19	100%	15	100%	85	100%	55	100%	
<i>M1- ou T1-</i>	17	89%	11	73%	66	78%	41	75%	0,6

II.5. Association des délétions des gènes *GST*-cigarette-récidive des tumeurs :

La confrontation des données sur les individus ayant une récurrence d'une tumeur vésicale et les polymorphismes étudiés n'a pas montré d'association ni avec les délétions des gènes *GSTM1* et *GSTT1* ni avec la combinaison *GST*-cigarette ($p > 0,05$). Cependant, la fréquence de la double délétion (*M1-/T1-*) semble plus importante chez les patients qui ont déjà eu une

récidive (22,3%) dont la majorité ont le profil fumeurs (19,15%) par rapport aux patients double délétés pour les gènes d'intérêt et qui n'ont jamais eu de récurrence (16%) (Tableau 17).

Tableau 17 : Associations des génotypes des gènes *GSTM1* et *GSTT1* au risque de la récurrence : combinaisons gène-gène et gènes-cigarettes.

<i>Patients</i>	<i>R</i>	<i>%</i>	<i>NR</i>	<i>%</i>	<i>OR</i>	<i>IC</i>	<i>p-value</i>
<i>génotype</i>							
<i>M+</i>	36	38,30%	39	48,15%	1		
<i>M-</i>	58	61,70%	42	51,85%	1,44	0,8 - 2,6	0,24
<i>T+</i>	54	57,45%	52	64,20%	1		
<i>T-</i>	40	42,55%	29	35,80%	1,38	0,7 - 2,6	0,35
<i>(+/+)</i>	17	18,09%	23	28,40%	1		
<i>(+/-)</i>	19	20,21%	16	19,75%	1,6	0,6 - 4,4	0,36
<i>(-/+)</i>	37	39,36%	29	35,80%	1,6	0,7 - 3,9	0,32
<i>(-/-)</i>	21	22,34%	13	16,05%	2,2	0,8 - 6,1	0,1
<i>Total</i>	94	100,00%	81	100,00%			
<i>Génotype-cigarette</i>							
<i>non-fumeurs</i>	29	30,85%	23	28,40%			
<i>MI+</i>	14	14,89%	13	16,05%	1		
<i>MI-</i>	15	15,96%	10	12,35%	1,38	0,4 - 4,8	0,59
<i>TI+</i>	17	18,09%	13	16,05%	1,2	0,4 - 4	0,8
<i>TI-</i>	12	12,77%	10	12,35%	1,1	0,3 - 4	1
<i>(+/+)</i>	5	5,32%	7	8,64%	1		
<i>(+/-)</i>	9	9,57%	6	7,41%	2	0,3 - 13	0,45
<i>(-/+)</i>	12	12,77%	6	7,41%	2,7	0,5 - 16	0,26
<i>(-/-)</i>	3	3,19%	4	4,94%	1,05	0,1 - 10	1
<i>fumeurs ou anciens fumeurs</i>	65	69,15%	58	71,60%			
<i>MI+</i>	22	23,40%	26	32,10%	1		
<i>MI-</i>	43	45,74%	32	39,51%	1,6	0,7 - 3,5	0,27
<i>TI+</i>	37	39,36%	39	48,15%	1		
<i>TI-</i>	28	29,79%	19	23,46%	1,5	0,7 - 3,5	0,27
<i>(+/+)</i>	12	12,77%	16	19,75%	1		
<i>(+/-)</i>	10	10,64%	10	12,35%	1,3	0,36 - 4,9	0,77
<i>(-/+)</i>	25	26,60%	23	28,40%	1,44	0,5 - 4,13	0,48
<i>(-/-)</i>	18	19,15%	9	11,11%	2,6	0,8 - 9	0,1

R : récurrence, NR : pas de récurrence.

III. Etude du polymorphisme rs798766 du gène *TACC3* :

Le polymorphisme rs798766 est l'un des marqueurs bialléliques dont l'association au cancer de la vessie a été rapportée ces dernières années. La variation de ce SNP est C→T avec l'allèle C sauvage et l'allèle T muté. Ce polymorphisme est situé sur l'intron 5 du gène *TACC3*. Les deux gènes, *TACC3* et *FGFR3* sont connus pour être impliqués dans la carcinogénèse vésicale (109). Il a été démontré que la présence de l'allèle muté du polymorphisme rs798766 est observée le plus souvent dans des tumeurs avec des mutations activatrices sur le gène *FGFR3* (182). Wang *et al.* (113) ont aussi trouvé que la présence de l'allèle muté du polymorphisme rs798766 est associée à une forte expression de l'ARNm du gène *FGFR3*.

Afin de mettre en évidence une éventuelle association entre ce polymorphisme (rs798766 du gène *TACC3*) et la survenue du cancer vésical nous avons effectué l'analyse génotypique par QPCR précédée par un séquençage permettant le calibrage de la technique.

III.1. Génotypage par séquençage :

Avant de pouvoir mettre au point un protocole pour la QPCR, nous avons procédé au séquençage de huit (8) échantillons parmi nos ADN. Trois (3) d'entre eux ont été utilisés comme contrôles représentant les trois (3) génotypes possibles du polymorphisme d'intérêt (homozygote muté, hétérozygote et homozygote sauvage). Ces ADN dont le génotype a été obtenu par séquençage sont utilisés en tant que calibrateurs de la QPCR pour le bon déroulement de cette technique et confirmation des résultats du génotypage obtenus.

III.1.1. Amplification de la région du gène *TACC3* portant le polymorphisme rs798766 :

Nous avons choisi les amorces par modélisation par rapport à la région d'intérêt sur l'intron 5, en accordant une importance toute particulière pour l'amplification d'une séquence suffisamment grande (311 pb), de telle façon que le polymorphisme étudié soit à une bonne distance des deux extrémités de la séquence amplifiée et d'obtenir un bon profil de séquençage. Tenant compte de la T_m , "melting temperature" qui doit être voisine pour les deux amorces, d'une composition en bases équilibrée, d'une absence de complémentarité entre les dernières bases des extrémités 3' des amorces entre elles (formation de dimères) et la non-formation de structures secondaires (épingles à cheveux) pour chaque amorce.

La mise au point de la technique a permis une bonne amplification avec une température d'hybridation de 62 °C.

III.1.2. Séquençage :

Après la mise au point de la PCR, nous avons amplifié les huit ADN dont le but de les séquencer. Les profils obtenus sont ceux d'un homozygote muté, 4 homozygotes sauvages et 3 hétérozygotes comme présentés dans la Figure 16 et le Tableau 18.

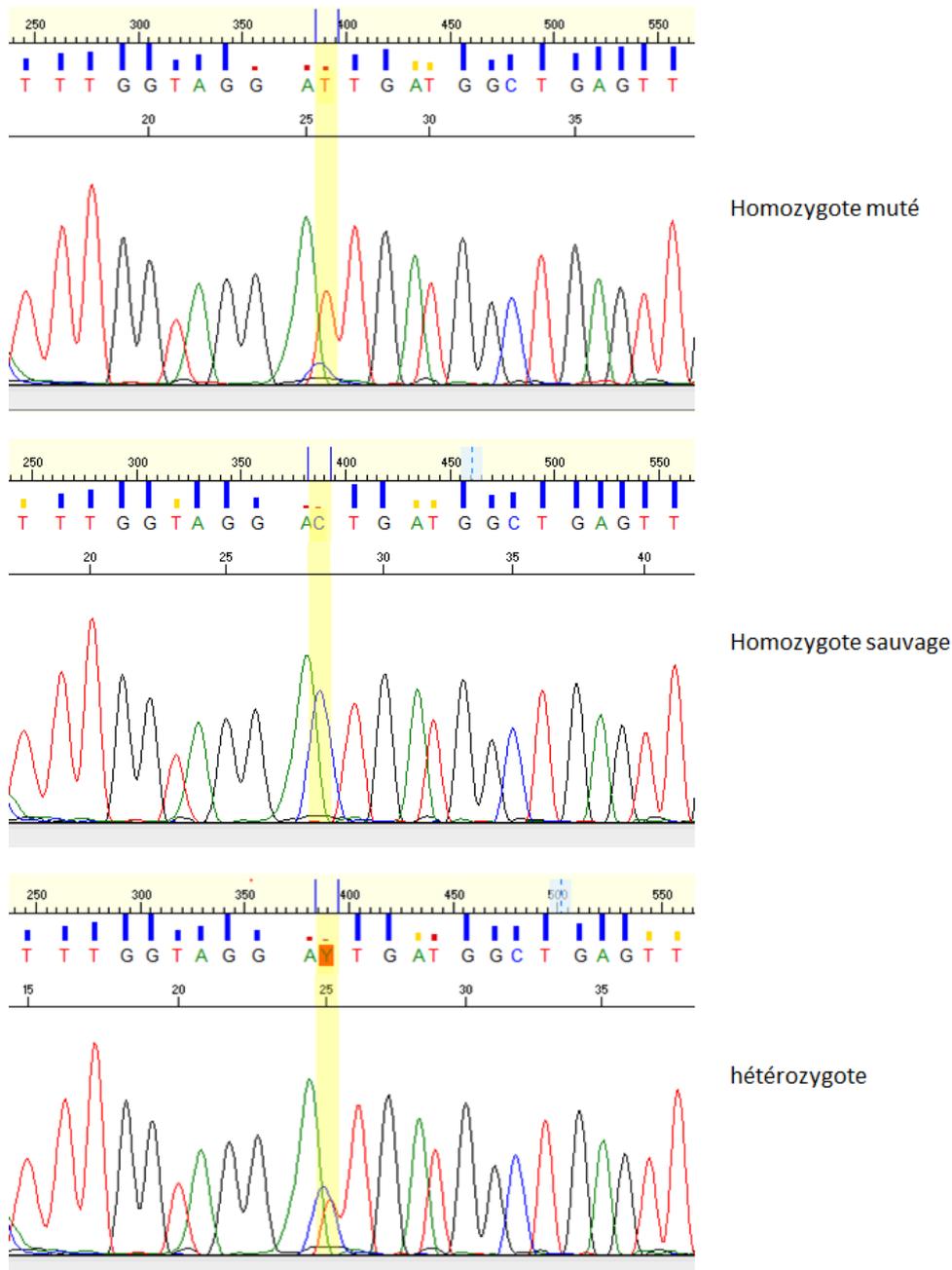


Figure 16 : Profil de séquençage d'un homozygote muté, d'un homozygote sauvage et d'un hétérozygote du polymorphisme rs798766.

Tableau 18 : Résultat du génotypage du polymorphisme rs798766 par séquençage.

N° échantillon d'ADN	Génotype
E1	TT
E2	CC
E3	CT
E4	CC
E5	CC
E6	CC
E7	CT
E8	CT

PS : (TT), génotype homozygote muté ; (CT) génotype hétérozygote et (CC) génotype homozygote sauvage.

III.2. Génotypage par la QPCR :

Après plusieurs essais de température d'hybridation nous avons obtenu un bon profil d'amplification à 60°C avec une fluorescence optimale et des résultats de génotypage des échantillons testés identiques à ceux obtenus préalablement par séquençage (Figure 17).

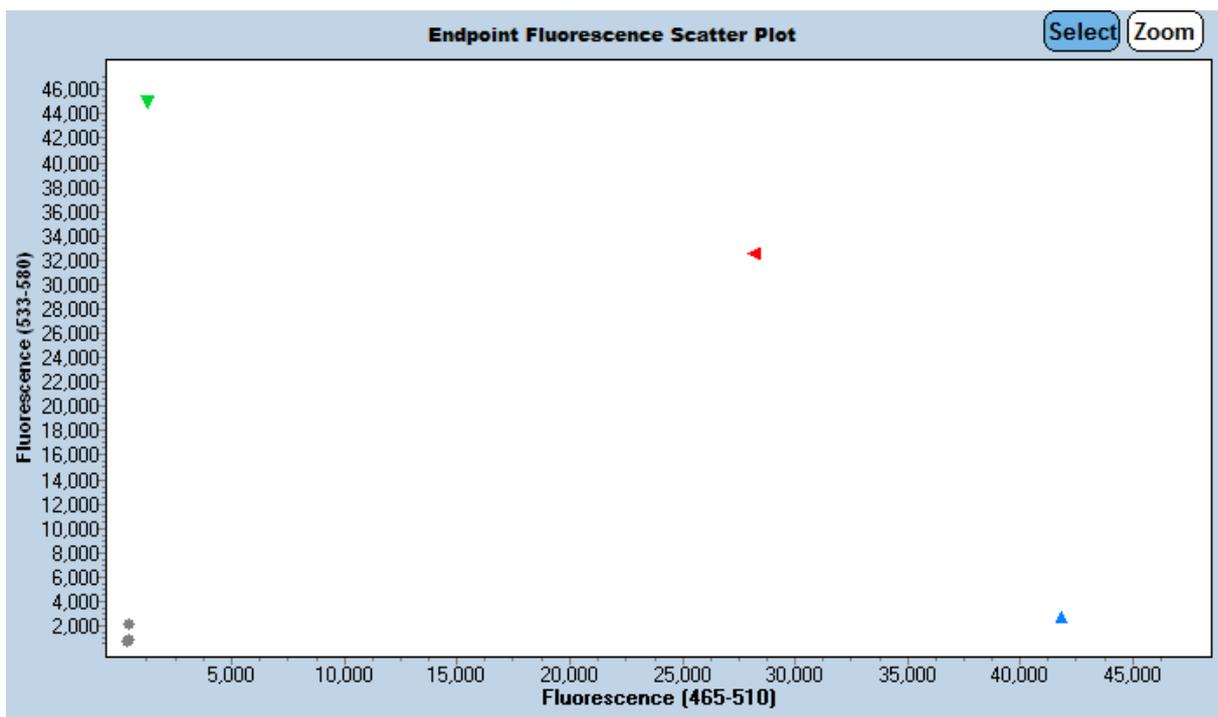


Figure 17 : Profil d'amplification par QPCR analysé par le logiciel LightCycler 480 obtenu après amplification de la région du gène *TACC3* incluant le polymorphisme rs798766. L'axe des « y » fluorescence à 533-580 (VIC), l'axe des « x » fluorescence à 465-510 (FAM). Les points en gris : blanc PCR (témoins négatif de la PCR, mix PCR sans ADN) ; en vert : homozygote sauvage marqué par le VIC (ADN E2) ; en bleu : homozygote muté marqué par le FAM (ADN E1) et en rouge : hétérozygote marqué par les deux fluorochromes VIC/FAM (ADN E3).

Le bon déroulement de l'essai nous a permis de lancer des QPCR pour des plaques de 96 puits procédant au génotypage de tous nos ADN (témoins et patients). Les résultats sont présentés dans la Figure 18.

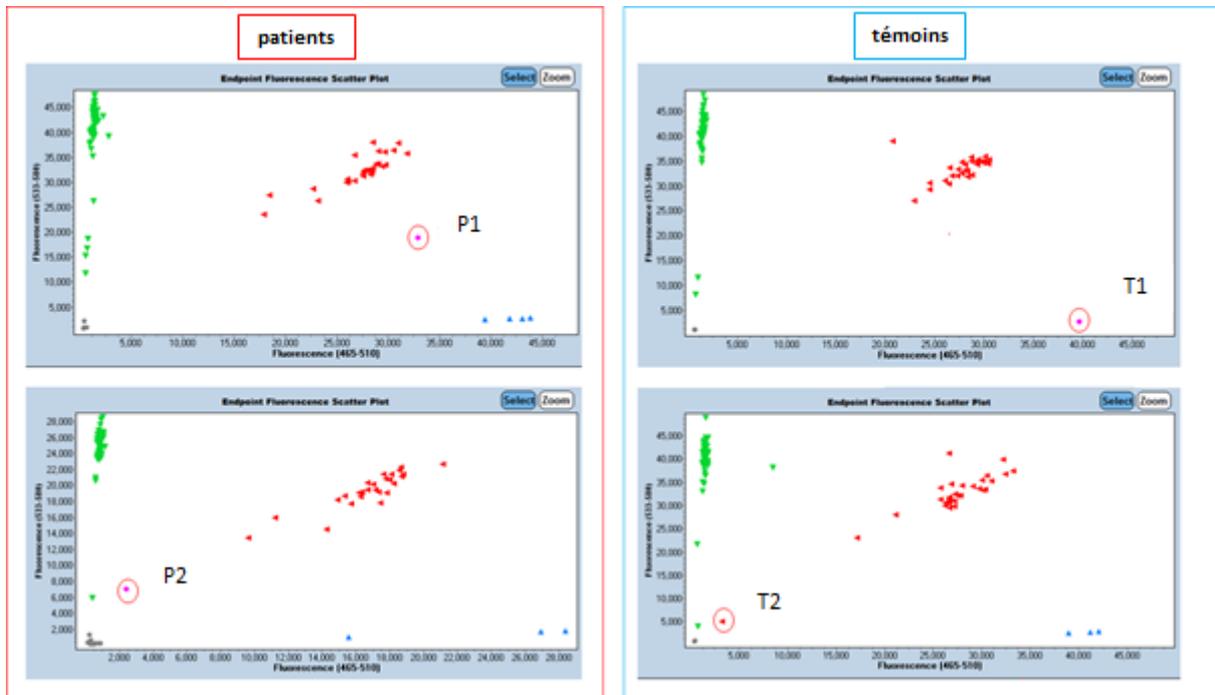


Figure 18 : Profil d'amplification par QPCR analysé par le logiciel LightCycler 480 obtenu après amplification de la région du gène *TACC3* incluant le polymorphisme rs798766. Les profils encadrés en rouge correspondent à ceux des patients, les profils encadrés en bleu correspondent à ceux des témoins. Les triangles verts : hybridation avec la sonde VIC seulement (génotype homozygote sauvage) ; les triangles bleus : hybridation avec la sonde FAM seulement (génotype homozygote muté) ; les triangles rouges : double hybridation avec les deux sondes VIC et FAM (génotype hétérozygote) ; les points roses : génotype non déterminé.

III.3. Les ADN non déterminés par le logiciel LightCycler 480 :

Pour quelques ADN le logiciel n'a pas pu déterminer le génotype ou bien il a donné un résultat négatif (pas d'amplification). Pour répondre à ces questions nous avons réalisé le séquençage de ces échantillons. Pour les ADN P2 et T2 (indiqué sur la Figure 18) nous n'avons pas pu déterminer le génotype. Cependant, pour les ADN P1 et T1 le séquençage a indiqué que l'ADN P1 est un hétérozygote alors que l'ADN T1 est un homozygote muté (Figure 19).

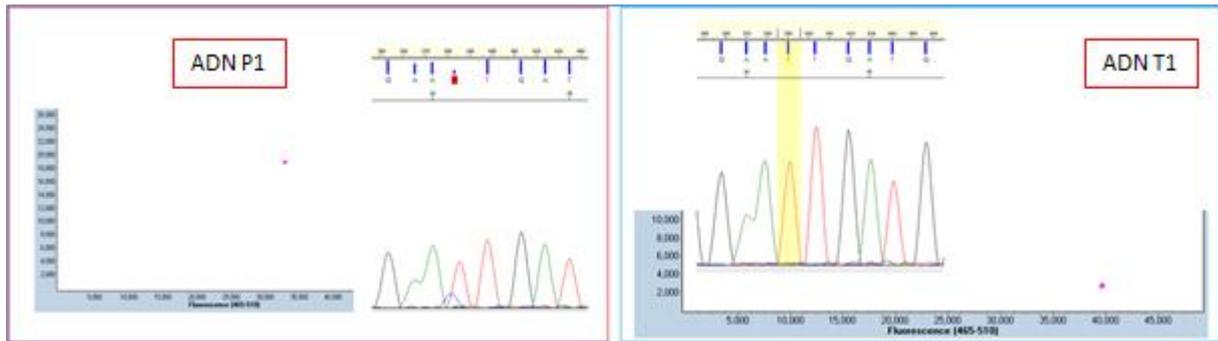


Figure 19 : Comparaison entre les profils obtenus par QPCR et séquençage des échantillons P1 et T1.

III.4. Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme rs798766 et association avec le cancer de la vessie :

L'analyse des résultats du génotypage du gène *TACC3* pour le polymorphisme rs798766 démontre que le génotype muté TT est rare dans notre population d'étude. Il n'est présent que chez environ 2% des témoins et 4% des patients. Cependant, la fréquence de l'allèle T est homogène pour les deux groupes : 19,83% chez les patients et 19,62% chez les témoins. Le génotype sauvage est très répandu dans notre population d'étude, représenté chez plus de 60% des patients et témoins. Comme il est indiqué dans le Tableau 19, le test statistique ne montre aucune association entre le polymorphisme rs798766 et le cancer de la vessie, ce qui nous permet de conclure que ce polymorphisme ne constitue pas un facteur de risque de la carcinogénèse vésicale dans notre population ($p > 0,05$).

La rareté du génotype muté est remarquée dans tous les groupes ethniques, sa fréquence varie entre 0,0% et 17% selon les populations (183). Les fréquences génotypiques obtenues chez nos témoins sont très proches de celles publiées dans le projet HapMap impliquant des individus d'origine Nord-Ouest Européen (CC = 62,83%, CT = 34,51% et TT = 2,65%) (183).

La fréquence allélique de l'allèle T est comprise entre 0,0% et 36% selon les populations. Il est à noter que les fréquences observées dans notre étude sont proches de celles retrouvées dans les populations indiennes ou d'origine Nord-Ouest Européen du projet HapMap et des populations chinoises ou Japonaises du projet 1000 génomes (183, 184).

Tableau 19 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme rs798766 dans la population d'étude.

	Témoins	%	Cas	%	OR	IC 95%	p-value
<i>TACC3</i>							
CC	118	63,44%	112	64,37%	1		
CT	63	33,87%	55	31,61%	0,9	0,6 - 1,4	0,7
TT	5	2,69%	7	4,02%	1,5	0,4 - 6	0,56
total	186	100,00%	174	100,00%			
<i>allèle C</i>							
allèle C	299	80,38%	279	80,17%	1		
allèle T	73	19,62%	69	19,83%	1,01	0,7 - 1,5	0,94
total	372	100,00%	348	100,00%			

D'après la méta-analyse de *Meng et al.* (109), l'absence d'association statistique entre le polymorphisme rs798766 et le cancer de la vessie conclue dans notre étude concorde avec plusieurs études Européennes (Belgique, Pays-Bas, Royaume-Uni et Italie). Cependant, nos résultats se trouvent contradictoires avec les études menées sur les populations asiatiques et Caucasiennes qui ont rapporté que le polymorphisme d'intérêt peut être considéré comme un éventuel facteur de risque génétique du cancer vésical, parmi ces études, il y a plusieurs études d'association à l'échelle génomique (GWAS) (109).

La faible fréquence du génotype TT rend l'association statistique entre le polymorphisme rs798766 et le cancer de la vessie difficile à mettre en évidence et un échantillonnage plus important permettrait une éventuelle mise en évidence de cette association.

Bien que les tests statistiques de certaines études aient rapporté l'association entre le polymorphisme rs798766 et le cancer vésical, le mécanisme d'action de ce polymorphisme dans la carcinogénèse vésicale n'a pas été complètement élucidé. Dans ce contexte, seulement certaines hypothèses ont été postulées :

- premièrement, du fait qu'il a été rapporté précédemment qu'une association statistiquement significative existe entre l'allèle T du polymorphisme rs798766 qui se trouve en amont du gène *FGFR3* et la surexpression de ce dernier (182, 185), il a été suggéré que le polymorphisme rs798766 serait positionné dans la région régulatrice du gène *FGFR3* induisant de ce fait l'amélioration de l'activité du promoteur de ce dernier gène, déclenchant sa surexpression et entraînant finalement la transformation tumorale,

- deuxièmement, la fréquence élevée de l'allèle à risque pourrait induire une surexpression du gène *TACC3* favorisant massivement la division cellulaire et accélérant la formation de tumeurs initiées préalablement par l'activation du récepteur *FGFR3*,
- troisièmement, puisque dans la majorité des études GWAS où il a été rapporté une corrélation entre rs798766 [T] et le cancer de la vessie a été également rapporté une corrélation significative entre rs9642880 [T] (30 kb en amont de *MYC* et qui exerce une régulation à long terme pour *MYC*) (186) et la carcinogénèse vésicale, ce qui laisse supposer l'implication du polymorphisme rs798766 dans les voies de signalisation *MYC* favorisant le cancer vésical (187, 188).

III.5. Distribution des génotypes rs798766 selon l'âge :

La division de nos effectifs selon l'âge (dans les groupes moins de 50 ans et plus ou égal à 50 ans) ne montre aucune différence des fréquences des génotypes rs798766 par rapport aux fréquences initiales globales. Cependant, nous avons remarqué une absence totale du génotype homozygote muté parmi les patients ayant moins de 50 ans. Cela peut être dû d'une part à la rareté du génotype homozygote muté et d'autre part à l'effectif restreint de la catégorie des patients moins de 50 ans. Comme le montre le Tableau 20 les tests statistiques ne rapportent aucune association entre le polymorphisme étudié et le cancer de la vessie dans les deux catégories d'âge. Contrairement à nos résultats, Kiemeny *et al.* (182) ont trouvé une association plus importante entre l'allèle muté du SNP rs798766 et le cancer de la vessie chez des patients avec un âge précoce.

Tableau 20 : Association des génotypes du polymorphisme rs798766 avec l'âge.

	Témoins	%	Cas	%	OR	IC 95%	p-value
<i><50 ans</i>							
<i>TACC3</i>							
<i>CC</i>	27	62,79%	21	61,76%	1		
<i>CT</i>	14	32,56%	13	38,24%	1,19	0,4 - 3,4	0,81
<i>TT</i>	2	4,65%	0	0,00%	/	/	/
	43	100,00%	34	100,00%			
<i>allèle C</i>							
	68	79,07%	55	80,88%	1		
<i>allèle T</i>	18	20,93%	13	19,12%	0,9	0,4 – 2,1	0,84
	86	100,00%	68	100,00%			
<i>≥50 ans</i>							
<i>TACC3</i>							
<i>CC</i>	91	63,63%	91	65,00%	1		
<i>CT</i>	49	34,26%	42	30,00%	0,86	0,5 - 1,4	0,55
<i>TT</i>	3	2,11%	7	5,00%	2,3	0,5 - 14	0,3
	143	100,00%	140	100,00%			
<i>allèle C</i>							
	231	80,76%	224	80,00%	1		
<i>allèle T</i>	55	19,24%	56	20,00%	1,05	0,7 - 1,6	0,82
	286	100,00%	280	100,00%			

III.6. Combinaison rs798766-tabac et leurs associations avec le risque du cancer vésical :

Il est bien admis que le cancer vésical est une maladie multifactorielle avec une susceptibilité individuelle dépendant de la constitution génétique et de l'exposition aux facteurs environnementaux. Même si du point de vue fonctionnel le gène *TACC3* n'a pas de relation directe avec la consommation de tabac, un effet additif suite à la combinaison de plusieurs facteurs de risque pourrait augmenter le risque du cancer vésical comme a été rapporté par Rouissi *et al.* (129). Dans ce contexte, nous avons établi la stratification des génotypes rs798766 de notre population d'étude selon le facteur tabac. Les résultats sont présentés dans les Tableaux 21 et 22.

III.6.1. Cigarette :

La stratification des patients et des témoins selon le génotype rs798766 et le statut tabagique est décrite dans le Tableau 21. Comparativement aux non-fumeurs ayant le génotype CC comme référence, les résultats indiquent une absence d'association entre les génotypes CT/TT et le risque du cancer de la vessie dans le groupe des non-fumeurs. Cependant, un risque

significativement accru du cancer vésical a été observé chez les fumeurs possédant les génotypes CC et CT/TT (OR = 4,3, IC 95% : 2,4-8, $p < 0,001$ et OR = 3,4, IC 95% : 1,7-7, $p < 0,001$ respectivement). Néanmoins, aucun effet additif entre rs798766 et le statut tabagique (cigarette) n'a été détecté. Le même résultat est rapporté par Wang *et al.* (113). Cette constatation ne fait que mettre en évidence l'effet du tabac qui est considéré comme le facteur de risque le plus incriminé de cette étiologie (3, 23).

Tableau 21 : Stratification des patients et des témoins selon les génotypes du polymorphisme rs798766 et le statut tabagique (cigarettes).

<i>TACC3-cigarette</i>	<i>Témoins %</i>	<i>Cas %</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>	<i>p-value</i>
<i>Non-fumeurs</i>					
<i>CC</i>	70 37,63%	28 16,09%	1		
<i>CT/TT</i>	37 21,51%	23 13,22%	1,4	0,7 – 3	0,3
<i>Fumeurs ou anciens fumeurs</i>					
<i>CC</i>	48 25,81%	84 48,28%	4,3	2,4 - 8	<0,001
<i>CT/TT</i>	28 15,05%	39 22,41%	3,4	1,7 – 7	<0,001

III.6.2. Tabac à priser :

Comme pour la cigarette, l'association rs798766-tabac à priser ne représente pas un facteur de risque pour le cancer de la vessie (Tableau 22). Nos résultats ont montré que la plupart des patients possédant le génotype TT du polymorphisme rs798766 (6/7) ne sont pas des consommateurs de cette forme de tabac. Cela confirme bien que ce polymorphisme rs798766 ne présente aucune association avec la consommation du tabac. Il est à noter, qu'aucune étude n'a été réalisée dans ce contexte préalablement.

Tableau 22 : Stratification des patients et des témoins selon les génotypes du polymorphisme rs798766 et le statut tabagique (tabac à priser).

<i>rs798766-tabac à priser</i>	<i>Témoins</i>	<i>%</i>	<i>Cas</i>	<i>%</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>	<i>p-value</i>
<i>Non consommateur</i>							
<i>CC</i>	63	63,00%	48	55,81%	1		
<i>CT/TT</i>	37	37,00%	38	44,19%	1,3	0,7 – 2,4	0,32
<i>Total</i>	100		86				
<i>Consommateurs ou anciens consommateurs</i>							
<i>CC</i>	54	63,53%	63	72,41%	1,53	0,9 – 2,9	0,11
<i>CT/TT</i>	31	36,47%	24	27,59%	1	0,5 – 2	1
<i>total</i>	85		87				

III.7. Interaction entre le polymorphisme rs798766 et les paramètres clinico-pathologiques :

Comme indiqué précédemment, la présence d'un allèle muté du polymorphisme rs798766 est associée à une forte expression du gène *FGFR3* (182). D'autre part, la surexpression de *FGFR3* est plus observée dans les tumeurs vésicales non invasives (107). Pour ces raisons, nous avons essayé d'établir une association entre le polymorphisme rs798766 et les caractéristiques clinico-pathologiques du cancer de la vessie. Or, les résultats obtenus, n'ont montré aucune association entre l'allèle rs798766 [T] et le stade ou le grade tumoral ($p > 0,05$) (Tableau 23), ce qui est conforme aux résultats de Yates *et al.* (189). Contrairement, d'autres études ont conclu une association de l'allèle muté avec des tumeurs de faible stade et bas grade (113, 182).

D'après les résultats de notre étude, nous avons remarqué que l'allèle [T] semble être plus présent chez les patients avec des tumeurs non invasives TaG1-G2 (40%) impliquées dans la première voie de progression (voie *FGFR3*) par rapport aux patients qui ont des tumeurs TaG3 (13%) impliquées dans la deuxième voie de progression dite voie *TP53*.

Tableau 23 : Répartition des génotypes du polymorphisme rs798766 selon les grades des tumeurs.

	<i>TaG1-G2</i>		<i>TaG3</i>		<i>T1</i>		$\geq T2$		<i>p-value</i>
<i>CC</i>	12	60%	13	87%	46	57%	36	71%	
<i>CT</i>	8	40%	2	13%	31	38%	12	24%	
<i>TT</i>	0	0%	0	0%	4	5%	3	6%	
<i>CT/TT</i>	8	40%	2	13%	35	43%	15	29%	0,099
	20	100%	15	100%	81	100%	51	100%	

III.8. Association entre le polymorphisme rs798766 et la récurrence des tumeurs :

En ce qui concerne le risque de récurrence, la fréquence la plus importante (46,7 %) a été observée chez les patients ayant des tumeurs non invasives (*TaG1-G2*) et porteurs de l'allèle à risque du polymorphisme rs798766 (Tableau 24). Néanmoins, aucune association n'a été détectée entre le polymorphisme étudié et le risque de récurrence ($p = 0,6$). Ces résultats sont contradictoires à ceux rapportés par Kiemeny *et al.* (182) qui ont montré que la présence de l'allèle muté chez les patients avec des tumeurs non infiltrantes est associée à un risque plus important de récurrence. Dans notre cas, cette absence d'association peut être due à la faible taille de notre échantillon.

Tableau 24 : Association entre génotypes du polymorphisme rs798766 et risque de récurrence.

<i>patients</i>	<i>R</i>	<i>%</i>	<i>NR</i>	<i>%</i>	<i>OR</i>	<i>IC</i>	<i>p-value</i>
TACC3							
génotype							
CC	58	63,04%	54	65,85%	1		
TT/CT	34	36,96%	28	34,15%	1,13	0,58 – 2,2	0,75
Ta G1-G2							
CC	15	75%	5	25%			
CC	8	53,3%	4	80%	1		
TT/CT	7	46,7%	1	20%	0,3	0,005 - 4,1	0,6

R : récurrence, NR : pas de récurrence.

IV. L'effet combiné des trois polymorphismes étudiés (allèle T du polymorphisme rs798766, *GSTM1* 0/0 et *GSTT1* 0/0) :

La combinaison des trois facteurs (la présence de l'allèle T du polymorphisme rs798766, le génotype *GSTM1* 0/0 et le génotype *GSTT1* 0/0) représente un risque élevé de développer un cancer vésical (OR = 7,1, $p = 0,0003$). L'association de tous ces facteurs à risque au statut tabagique augmente considérablement ce risque (OR = 13,1, $p = 0,0002$) (Tableau 25).

Il est remarquable que le nombre des témoins avec les trois polymorphismes à risque étudiés est très bas (5 témoins seulement), parmi ces derniers seulement 2 sont des consommateurs de tabac. Plusieurs études ont déjà rapporté l'effet additif des facteurs de risque du cancer vésical démontrant que plus le nombre des polymorphismes à risque est important plus le risque de développement d'un cancer vésical est accru, ce risque se trouve augmenté d'avantage avec la consommation du tabac (129, 190).

Tableau 25 : Effet combiné des délétions *GSTM1*, *GSTT1*, de l'allèle [T] du polymorphisme rs798766, de la consommation du tabac et association au risque du cancer vésical.

	<i>Témoins</i>	<i>%</i>	<i>Cas</i>	<i>%</i>	<i>OR</i>	<i>IC</i>	<i>p-value</i>
<i>rs 798766 (CC)/M1+/T1+</i>	52	28,3%	23	13,6%	1		
<i>rs 798766 (CT ou TT)/M1-/T1-</i>	5	2,7%	17	10,1%	7,1	2,1 - 27,7	0,0003
<i>rs 798766 (CT ou TT)/M1-/T1-/ cigarette</i>	2	1,09%	12	7,10%	13,1	2,6 - 130	0,0002

Nous avons voulu à travers cette étude déceler certains facteurs de risque moléculaires ou environnementaux impliqués dans la survenue du cancer vésical.

Notre étude a révélé en premier lieu que ce type de cancer touche préférentiellement les hommes (sex-ratio 12:1) et est typique de la vieillesse puisque la grande majorité des cas (80%) sont diagnostiqués après l'âge de 50 ans. Nos résultats ont montré également que presque 70 % de nos patients sont des fumeurs et que le risque se trouve augmenté avec la durée d'exposition au tabac et la quantité de cigarettes consommées ce qui ramènent des preuves concrètes que le tabagisme est un facteur de risque important dans la survenue et le développement des cancers vésicaux. Par ailleurs, aucune association n'a été démontrée entre le tabac à priser et la carcinogénèse vésicale dans notre population. Les données clinico-pathologiques ont rapporté que la majorité des cas présentent des tumeurs PT1 de grade III, ce qui justifie la fréquence élevée de récurrence (54%).

Notre travail de recherche a démontré que l'absence des Gluthation-S-transférases, par délétion homozygote du gène *GSTM1* et /ou du gène *GSTT1* sont associées à un risque élevé de cancer de la vessie. Leur déficit total ou partiel conduit à un défaut de détoxification des substances carcinogènes, dont l'accumulation est responsable d'un effet génotoxique, favorisant la tumorigénèse. L'association de ces polymorphismes avec les carcinogènes du tabac, augmentent nettement le risque de susceptibilité à ce type de cancer.

Les résultats que nous avons obtenus dans la prospection du polymorphisme rs798766 porté par le gène *TACC3* a montré que l'allèle muté T n'est pas un facteur de risque du cancer vésical. Ceci s'explique par la faible fréquence du génotype muté TT dans notre population d'étude. Il est à noter, que l'effet additif des trois polymorphismes à la fois et la consommation du tabac augmente considérablement le risque du cancer de la vessie.

A partir de tous ces résultats, il paraît évident que le cancer vésical n'est ni le résultat d'une exposition environnementale isolée, ni celui d'une mutation génétique unique mais le résultat de l'effet conjugué de facteurs génétiques et environnementaux.

Les résultats obtenus laissent entrevoir de nombreuses perspectives, il serait donc judicieux de :

- de rechercher un lien éventuel entre le cancer de la vessie et l'exposition professionnelle dont l'objectif est d'avoir une idée sur les secteurs d'activité les plus impliqués dans cette étiologie ainsi que d'identifier les facteurs d'exposition (exposition à quel type de substance, durée d'exposition, intensité, période d'exposition...) dont le but de sensibiliser les institutions professionnelles pour la prise en charge médico-légal des travailleurs exposés ou ayant été exposés à des carcinogènes de vessie.
- d'élargir la taille de l'échantillon afin de pouvoir tirer des conclusions cohérentes sur l'association du polymorphisme rs798766 et la carcinogénèse vésicale.
- d'après la littérature, le polymorphisme rs798766 est porté sur le gène *TACC3* positionné à 70 kb du gène *FGFR3*. Il a été démontré que la présence de l'allèle muté du polymorphisme rs798766 est observée le plus souvent dans des tumeurs avec des mutations activatrices sur le gène *FGFR3* et qu'il est associé à une forte expression de l'ARNm du gène *FGFR3*. Dans ce contexte, au lieu d'explorer les mutations au niveau du gène *FGFR3* impliquées dans l'étiologie des tumeurs de bas grades de la vessie, il serait intéressant d'explorer le SNP rs798766. Ce qui permettrait d'établir un diagnostic des tumeurs non infiltrantes de vessie plus rapide et moins coûteux que celui réalisé par recherches de mutations *FGFR3*.
- Très récemment il a été mis en évidence un gène nommé *FT3* formé de la fusion des deux gènes *FGFR3* et *TACC3* suite à des réarrangements intrachromosomiques au niveau du chromosome 4 et qui a été impliqué dans la carcinogénèse vésicale. Dans ce contexte il serait intéressant de chercher ce gène de fusion dans notre population d'étude et d'explorer son association avec le degré d'agressivité de ce type de cancer.
- d'analyser d'autres polymorphismes génétiques impliqués soit dans le métabolisme des xénobiotiques tels que le gène *NAT2*, soit dans les systèmes de réparation d'ADN ou dans le métabolisme des folates ...

1. **Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
2. **Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
3. **Kherouatou-Chaoui N, Chellat-Rezgoune D, Ribouh A, Hireche A, Tellouche S, Semmame O et al.** Combined Effect of MTHFR Genotypes, Tobacco and Occupational Exposure on Bladder Cancer Susceptibility in Algerian Population. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* 2015;35(2):195-201.
4. **Silverthorn DU, Brun JF.** *Physiologie humaine: Une approche intégrée*: Ed. Pearson; 2007.
5. **Levallois MP.** *Larousse médical*: Larousse; 2003.
6. **Lacombe M.** *Abrégé d'anatomie et de physiologie humaines*: Ed. Lamarre; 1995.
7. **Brooker C, Langlois-Wils I, Lepresle É.** *Le corps humain: Étude, structure et fonction*: Ed. De Boeck Supérieur; 2000.
8. **Lacombe M.** *Abrégé d'anatomie et de physiologie humaines*. Paris: Ed. Lamarre; 2006.
9. **Pan Q, Thariat J, Bogalhas F, Lagrange JL.** Assessment of movements of the different anatomic portions of the bladder, implications for image-guided radiation therapy for bladder cancer. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique.* 2012;16(3):167-78.
10. **urologiefiatte.** 2018 [cited 2018 30/04/2018]. Available from: <http://www.urologiefiatte.com>.
11. **Rullmann-Rauch R.** *Histologie*: Ed. De boeck Supérieur; 2008.
12. **Apodaca G.** The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic (Copenhagen, Denmark).* 2004;5(3):117-28.
13. **Wheater PR, Young B, Heath JW.** *Histologie fonctionnelle*. Bruxelles: Ed. De Boeck Superieur; 2001.
14. **Nguyen SH, Allin-Pfister AC, Bourouina R.** *Manuel d'anatomie et de physiologie*: Ed. Lamarre; 2008.
15. **Bouchelouche K, Turkbey B, Choyke PL.** PET/CT and MRI in Bladder Cancer. *Journal of cancer science & therapy.* 2012;S14(1):7692.
16. **Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A.** Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2015;65(2):87-108.
17. **Siegel R, Naishadham D, Jemal A.** Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2013;63(1):11-30.
18. **Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D.** Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2011;61(2):69-90.
19. **Coulange C, Culine S.** *Cancer de la vessie*: Ed. John Libbey Eurotext; 2003.
20. **Héry M.** *Cancers de la vessie et risques professionnels*: INRS, Institut national de recherche et de sécurité; 2009.
21. **Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F.** GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 2013 [30/05/2016]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/>.
22. **Chen H, Lin YW, Mao YQ, Wu J, Liu YF, Zheng XY et al.** MicroRNA-449a acts as a tumor suppressor in human bladder cancer through the regulation of pocket proteins. *Cancer letter.* 2012;320(1):40-7.

23. **Gandomani H, Tarazoj A, Siri F, Rozveh A, Hosseini S, Borujeni N *et al.*** Essenciels of bladder cancer worldwide: incidence, mortality rate and risk factors. *Biomedical Reserch and Therapy*. 2017;4(9):1638-55.
24. **Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A.** Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
25. **Hamdi Cherif M, Serraino D, Mahnane A, Laouamri S, Zaidi Z, Boukharouba H *et al.*** Time trends of cancer incidence in Setif, Algeria, 1986-2010: an observational study. *BMC cancer*. 2014;14:637.
26. **Hamdi-Cherif M, Bidoli E, Birri S, Mahnane A, Laouamri S, Zaidi Z *et al.*** Le cancer à Sétif, Algérie, 1986–2010. *Journal Africain du Cancer / African Journal of Cancer*. 2014;6(3):166-73.
27. **Globocan 2018** [cited 2018 12/02/2019]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars>.
28. **Ferris J, Garcia J, Berbel O, Ortega JA.** Constitutional and occupational risk factors associated with bladder cancer. *Actas Urologicas Espanolas*. 2013;37(8):513-22.
29. **Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P *et al.*** Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *European Urology*. 2013;63(2):234-41.
30. **Moretti J-L, Weinmann P, Tamgac F, Rigo P.** *Imagerie fonctionnelle par positons en oncologie nucléaire*: Ed. Springer Science & Business Media; 2004.
31. **Fajkovic H, Halpern JA, Cha EK, Bahadori A, Chromecki TF, Karakiewicz PI *et al.*** Impact of gender on bladder cancer incidence, staging, and prognosis. *World Journal of Urology*. 2011;29(4):457-63.
32. **Mahdavifar N, Ghoncheh M, Pakzad R, Momenimovahed Z, Salehiniya H.** Epidemiology, Incidence and Mortality of Bladder Cancer and their Relationship with the Development Index in the World. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2016;17(1):381-6.
33. **Mitra AP, Cote RJ.** Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annual Review of Pathology*. 2009;4:251-85.
34. **Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC.** Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *Jama*. 2011;306(7):737-45.
35. **Kiriluk KJ, Prasad SM, Patel AR, Steinberg GD, Smith ND.** Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urologic Oncology*. 2012;30(2):199-211.
36. **Kouidhi S, Rouissi K, Khedhiri S, Ouerhani S, Cherif M, Benammar-Elgaaied A.** MTHFR gene polymorphisms and bladder cancer susceptibility: a meta-analysis including race, smoking status and tumour stage. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2011;12(9):2227-32.
37. **Matic M, Pekmezovic T, Djukic T, Mimic-Oka J, Dragicevic D, Krivic B *et al.*** GSTA1, GSTM1, GSTP1, and GSTT1 polymorphisms and susceptibility to smoking-related bladder cancer: a case-control study. *Urologic Oncology*. 2013;31(7):1184-92.
38. **Zeeegers MP, Kellen E, Buntinx F, van den Brandt PA.** The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World Journal of Urology*. 2004;21(6):392-401.
39. **Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V.** Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicology Letters*. 2010;193(2):131-7.
40. **Ros MM, Bas Bueno-de-Mesquita H, Büchner F, Aben KK, Kampman E, Egevad L *et al.*** Fluid intake and the risk of urothelial cell carcinomas in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *International Journal of Cancer*. 2011;128(11):2695-708.

41. **Naranmandura H, Carew MW, Xu S, Lee J, Leslie EM, Weinfeld M *et al.*** Comparative toxicity of arsenic metabolites in human bladder cancer EJ-1 cells. *Chemical Research in Toxicology*. 2011;24(9):1586-96.
42. **Chen CH, Dickman KG, Huang C-Y, Moriya M, Shun CT, Tai HC *et al.*** Aristolochic acid-induced upper tract urothelial carcinoma in Taiwan: Clinical characteristics and outcomes. *International Journal of Cancer*. 2013;133(1):14-20.
43. **Pelucchi C, Galeone C, Tramacere I, Bagnardi V, Negri E, Islami F *et al.*** Alcohol drinking and bladder cancer risk: a meta-analysis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2012;23(6):1586-93.
44. **Slattery ML, West DW, Robison LM.** Fluid intake and bladder cancer in Utah. *International Journal of Cancer*. 1988;42:17-22.
45. **Donato F, Boffetta P, Fazioli R, Aulenti V, Gelatti U, Porru S.** Bladder cancer, tobacco smoking, coffee and alcohol drinking in Brescia, northern Italy. *European Journal of Epidemiology*. 1997;13(7):795-800.
46. **Pelucchi C, Negri E, Franceschi S, Talamini R, La Vecchia C.** Alcohol drinking and bladder cancer. *Journal of Clinical Epidemiology*. 2002;55(7):637-41.
47. **Sheweita SA, El-Shahat FG, Bazeed MA, Abu El-Maati MR, O'Connor PJ.** Effects of *Schistosoma haematobium* infection on drug-metabolizing enzymes in human bladder cancer tissues. *Cancer Letters*. 2004;205(1):15-21.
48. **Abd El Hameed AH, Negm OE, El-Gamal OM, Hamouda HE, El Nouby KA, Ismail GM.** Genetic polymorphism of glutathione S-transferases M1 and T1 in Egyptian patients with bilharzial bladder cancer. *Urologic Oncology*. 2010;28(3):296-301.
49. **Quilty PM, Kerr GR.** Bladder cancer following low or high dose pelvic irradiation. *Clinical Radiology*. 1987;38(6):583-5.
50. **Thiede T, Christensen BC.** Bladder tumours induced by chlornaphazine. A five-year follow-up study of chlornaphazine-treated patients with polycythaemia. *Acta Medica Scandinavica*. 1969;185(1-2):133-7.
51. **Vlaovic P, Jewett MA.** Cyclophosphamide-induced bladder cancer. *The Canadian Journal of Urology*. 1999;6(2):745-8.
52. **Piper JM, Matanoski GM, Tonascia J.** Bladder cancer in young women. *American Journal of Epidemiology*. 1986;123(6):1033-42.
53. **An Y, Li H, Wang K, Liu X, Qiu M, Liao Y *et al.*** Meta-analysis of the relationship between slow acetylation of N-acetyl transferase 2 and the risk of bladder cancer. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14:16896-904.
54. **Chirilă D, Popp R, Vesa Ș, Bălăcescu O, Coman I, Constantea N *et al.*** GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Genetic Variants in Multiple Urologic Cancers. *Chirurgia (Bucur)*. 2015;110(3):254-61.
55. **Zhu Z, Zhang J, Jiang W, Zhang X, Li Y, Xu X.** Risks on N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: a meta-analysis. *Onco Targets and Therapy*. 2015;8:3715-20.
56. **Wu H, Wang X, Zhang L, Mo N, Lv Z.** Association between N-acetyltransferase 2 polymorphism and bladder cancer risk: Results from studies of the past decade and a meta-analysis. *Clinical Genitourinary Cancer* 2016;14:122-9.
57. **Moore LE, Baris DR, Figueroa JD, Garcia-Closas M, Karagas MR, Schwenn MR *et al.*** GSTM1 null and NAT2 slow acetylation genotypes, smoking intensity and bladder cancer risk: results from the New England bladder cancer study and NAT2 meta-analysis. *Carcinogenesis*. 2011;32(2):182-9.

58. **Antonova O, Toncheva D, Grigorov E.** Bladder cancer risk from the perspective of genetic polymorphisms in the carcinogen metabolizing enzymes. *Journal of BUON*. 2015;20:1397-406.
59. **Monica S, Satya NS, Sandeep KB, Gopal G, Singh R.** Polymorphisms in the XPC gene affect urinary bladder cancer risk: a case-control study, meta-analyses and trial sequential analyses. *Scientific Reports*. 2016;6(27018):1-11.
60. **Xu H, Feng Y, Jial Z, Yang J, Lu X, Li J et al.** Association between ERCC1 rs3212986 and ERCC2 rs13181 gene polymorphisms in NER pathway and the risk of bladder cancer in a Chinese population. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2016;9(2):2295-300.
61. **Peng Y, Li L, Huang M, Duan C, Zhang L, Chen J.** Angiogenin interacts with ribonuclease inhibitor regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in bladder cancer cells. *Cellular Signalling*. 2014;26(12):2782-92.
62. **Li S, Peng Q, Chen YC, You J, Chen Z, Deng Y et al.** DNA Repair Gene XRCC1 Polymorphisms, Smoking, and Bladder Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2013;8(9):73448.
63. **Lin J, Spitz M, Wang Y, Schabath M, Gorlov I, Hernandez L et al.** Polymorphisms of folate metabolic genes and susceptibility to bladder cancer: a case-control study. *Carcinogenesis*. 2004;25(9):1639-47.
64. **Tiguert R, Ravery V, Gheiler E, Grignon D, Gudziak M, Wood D et al.** Les cancers primitifs à petites cellules de la vessie. *Progrès en Urology*. 1999;9(2):256-60.
65. **Prasad SM, Decastro G, Steinberg GD, Medscape.** Urothelial carcinoma of the bladder: definition, treatment and future efforts. *Nature Reviews Urology*. 2011;8(11):631-42.
66. **Pointreau Y, Klotz S, Denis F, Durdax C.** [Bladder cancer]. *Cancer radiothérapie : journal de la Société Française de Radiothérapie Oncologique*. 2010;14 Suppl 1:S189-97.
67. **NCCN.** National Comprehensive Cancer Network NCCN Clinical Practice Guidelines bladder cancer 2015 [updated 2.2015; cited 2018 30/04/2018]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx.
68. **InfoCancer.** Tumeurs de la vessie, les différents stades 2016 [cited 2018 30/04/2018]. Available from: <http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/rein-et-voies-urinaires/cancer-vessie/formes-de-la-maladie/les-differents-stades.html>.
69. **Clark P, Agarwal N, Biagioli M, Eisenberger M, Greenberg R, Herr H et al.** bladder cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2013;11:446-75.
70. **Reszka E, Jablonowski Z, Wieczorek E, Jablonska E, Krol MB, Gromadzinska J et al.** Polymorphisms of NRF2 and NRF2 target genes in urinary bladder cancer patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2014;140(10):1723-31.
71. **Irani J, Bernardini S, Bonnal JL, Chauvet B, Colombel M, Davin JL et al.** Urothelial tumors. *Progrès en Urologie* 2007;17(6):1065-98.
72. **Knowles MA.** Molecular pathogenesis of bladder cancer. *International Journal of Clinical Oncology*. 2008;13(4):287-97.
73. **Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Hafermann MD et al.** Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *The Journal of Urology*. 1983;130(6):1083-6.
74. **Kaubisch S, Lum BL, Reese J, Freiha F, Torti FM.** Stage T1 bladder cancer: grade is the primary determinant for risk of muscle invasion. *The Journal of Urology*. 1991;146(1):28-31.
75. **Newman LH, Tannenbaum M, Droller MJ.** Muscle-invasive bladder cancer: does it arise de novo or from pre-existing superficial disease? *Urology*. 1988;32(1):58-62.

76. **Vaidya A, Soloway MS, Hawke C, Tiguert R, Civantos F.** De novo muscle invasive bladder cancer: is there a change in trend? *The Journal of Urology*. 2001;165(1):47-50.
77. **Reszka E.** Selenoproteins in bladder cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2012;413(9-10):847-54.
78. **Van der Meijden AP.** Bladder cancer. *BMJ (Clinical research ed)*. 1998;317(7169):1366-9.
79. **Pfister C, Roupret M, Neuzillet Y, Larré S, Pignot G, Quintens H et al.** Recommandations en oncurologie 2013 DU CCAFU : Tumeurs de la vessie. *Progrès en Urologie*. 2013;23:105-25.
80. **Descotes J, Hubert J, Lemaitre L.** Apport de l'imagerie dans les tumeurs de vessie. *Progrès en Urologie*. 2003;13:947-68.
81. **Jichlinski P, Marti A, Leisinger HJ.** La cystoscopie en fluorescence dans le cancer de la vessie, quel avenir? *Annales d'urologie*: Ed. Elsevier; 2002.
82. **Kim YJ, Byun SJ, Ahn H, Kim CS, Hong BS, Yoo S et al.** Comparison of outcomes between trimodal therapy and radical cystectomy in muscle-invasive bladder cancer: a propensity score matching analysis. *Oncotarget*. 2017; 8(40) : 68996-69004.
83. **Orre M, Latorzeff I, Flechon A, Roubaud G, Brouste V, Gaston R et al.** Adjuvant radiotherapy after radical cystectomy for muscle-invasive bladder cancer: A retrospective multicenter study. *PloS one*. 2017;12(4):e0174978.
84. **Chauvet B, Davin J, Alfonsi M, Berger C, Vincent P, Reboul F.** Traitement conservateur des cancers de vessie par radiothérapie et chimiothérapie concomitante: résultats et perspectives. *Cancer/Radiothérapie*. 1998;2(5):499-504.
85. **Housset M.** Chimioradiothérapie concomitante des cancers infiltrants de la vessie. *Cancer/Radiothérapie*. 1998;2(6):713-7.
86. **Smith K, Fennelly JA, Neal DE, Hall RR, Harris AL.** Characterization and quantitation of the epidermal growth factor receptor in invasive and superficial bladder tumors. *Cancer research*. 1989;49(21):5810-5.
87. **Villares GJ, Zigler M, Blehm K, Bogdan C, McConkey D, Colin D et al.** Targeting EGFR in bladder cancer. *World Journal of Urology*. 2007;25(6):573-9.
88. **Pruthi RS, Nielsen M, Heathcote S, Wallen EM, Rathmell WK, Godley P et al.** A phase II trial of neoadjuvant erlotinib in patients with muscle-invasive bladder cancer undergoing radical cystectomy: clinical and pathological results. *BJU international*. 2010;106(3):349-54.
89. **Peyromaure M, Scotte F, Amsellem-Ouazana D, Vieillefond A, Oudard S, Beuzeboc P.** Trastuzumab (Herceptin) in metastatic transitional cell carcinoma of the urinary tract: report on six patients. *European Urology*. 2005;48(5):771-5.
90. **Hussain MH, MacVicar GR, Petrylak DP, Dunn RL, Vaishampayan U, Lara PN, Jr et al.** Trastuzumab, paclitaxel, carboplatin, and gemcitabine in advanced human epidermal growth factor receptor-2/neu-positive urothelial carcinoma: results of a multicenter phase II National Cancer Institute trial. *Journal of Clinical Oncology* : 2007;25(16):2218-24.
91. **Lae M, Couturier J, Oudard S, Radvanyi F, Beuzeboc P, Vieillefond A.** Assessing HER2 gene amplification as a potential target for therapy in invasive urothelial bladder cancer with a standardized methodology: results in 1005 patients. *Annals of Oncology*. 2010;21(4):815-9.
92. **Qing J, Du X, Chen Y, Chan P, Li H, Wu P, et al.** Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t(4;14)-positive multiple myeloma in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(5):1216-29.

93. Reznikoff CA, Sarkar S, Julicher KP, Burger MS, Puthenveetil JA, Jarrard DF *et al.* Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. *Urologic Oncology*. 2000;5(5):191-203.
94. Gong M, Dong W, An R. Glutathione S-transferase T1 polymorphism contributes to bladder cancer risk: a meta-analysis involving 50 studies. *DNA and Cell Biology*. 2012;31(7):1187-97.
95. Yu C, Hequn C, Longfei L, Long W, Zhi C, Feng Z *et al.* GSTM1 and GSTT1 polymorphisms are associated with increased bladder cancer risk: Evidence from updated meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(2):3246-58.
96. Goebell PJ, Knowles MA. Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. *Urologic Oncology*. 2010;28(4):409-28.
97. Jacobs BL, Lee CT, Montie JE. Bladder cancer in 2010: how far have we come? *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2010;60(4):244-72.
98. Soultzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Letters*. 2002;179(2):175-83.
99. Hernandez S, Lopez-Knowles E, Lloreta J, Kogevinas M, Jaramillo R, Amoros A *et al.* FGFR3 and Tp53 mutations in T1G3 transitional bladder carcinomas: independent distribution and lack of association with prognosis. *Clinical Cancer Research* 2005;11(15):5444-50.
100. Daizumoto K, Yoshimaru T, Matsushita Y, Fukawa T, Uehara H, Ono M *et al.* A DDX31/Mutant-p53/EGFR Axis Promotes Multistep Progression of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cancer Research*. 2018;78(9):2233-47.
101. Hamosh A. Bladder cancer. Phenotype-Gene Relationships: OMIM; 2016 [cited 2018 30/03/2018]. Available from <https://www.omim.org/entry/109800?search=109800&>.
102. Elhawary NA, Nassir A, Saada H, Dannoun A, Qoqandi O, Alsharif A *et al.* Combined Genetic Biomarkers Confer Susceptibility to Risk of Urothelial Bladder Carcinoma in a Saudi Population. *Disease Markers*. 2017;2017:14745-60.
103. Juanpere N, Agell L, Lorenzo M, de Muga S, Lopez-Vilaro L, Murillo R *et al.* Mutations in FGFR3 and PIK3CA, singly or combined with RAS and AKT1, are associated with AKT but not with MAPK pathway activation in urothelial bladder cancer. *Human Pathology*. 2012;43(10):1573-82.
104. Buday L, Downward J. Many faces of Ras activation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008;1786(2):178-87.
105. Zhu D, Xing D, Shen X, Liu J. A method to quantitatively detect H-ras point mutation based on electrochemiluminescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;324(2):964-9.
106. Hartz A. Fibroblast Growth Factor Receptor 3; FGFR3: OMIM; 2015 [cited 2018 30/03/2018]. Available from: <https://www.omim.org/entry/134934>.
107. Neuzillet Y, Paoletti X, Ouerhani S, Mongiat-Artus P, Soliman H, de The H *et al.* A Meta-Analysis of the Relationship between FGFR3 and TP53 Mutations in Bladder Cancer. *PloS one*. 2012;7(12):e48993.
108. NCBI. Genome Data Viewer, gene TACC3 2018 [14/06/2018]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?context=gene&acc=10460>.
109. Meng XY, Shi MJ, Chen JF, Liao Y, Hu BW, Hireche A. Association between the TACC3 rs798766 Polymorphism and Risk of Urinary Bladder Cancer: A Synthesis Based on Current Evidence. *Disease Markers*. 2017;2017:7850708.
110. NCBI. LitVar (TACC3) 2018 [14/05/2018]. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/LitVar/#>.

- 111. NCBI. Protein transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 [Homo sapiens] 2018** [14/05/2018]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_006333.1.
- 112. Lin ZR, Wang MY, He SY, Cai ZM, Huang WR.** TACC3 transcriptionally upregulates E2F1 to promote cell growth and confer sensitivity to cisplatin in bladder cancer. *Cell Death & Disease*. 2018;9(2):72.
- 113. Wang M, Chu H, Yan F, Qin C, Li P, Yuan L *et al.*** Chromosome 4p16.3 variant modify bladder cancer risk in a Chinese population. *Carcinogenesis*. 2011;32(6):872-5.
- 114. Sarkar S, Ryan EL, Royle SJ.** FGFR3-TACC3 cancer gene fusions cause mitotic defects by removal of endogenous TACC3 from the mitotic spindle. *Open Biology*. 2017;7(8) : 170080.
- 115. Lombardi B, Ashford P, Moya-Garcia AA, Rust A, Crawford M, Williams SV *et al.*** Unique signalling connectivity of FGFR3-TACC3 oncoprotein revealed by quantitative phosphoproteomics and differential network analysis. *Oncotarget*. 2017;8(61):102898-911.
- 116. NCBI. GSTM1 glutathione S-transferase mu 1 [Homo sapiens (human)] expression NCBI: NCBI; 2017** [19/10/2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2944?report=expression>.
- 117. Safarinejad MR, Safarinejad S, Shafiei N, Safarinejad S.** Association of genetic polymorphism of glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with bladder cancer susceptibility. *Urologic Oncology*. 2013;31(7):1193-203.
- 118. Coles BF, Morel F, Rauch C, Huber WW, Yang M, Teitel CH *et al.*** Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenetics*. 2001;11(8):663-9.
- 119. Henriquez-Hernandez LA, Navarro P, Luzardo OP, Alvarez-Leon EE, Boada LD, Zumbado M *et al.*** Polymorphisms of glutathione S-transferase mu and theta, MDR1 and VEGF genes as risk factors of bladder cancer: a case-control study. *Urologic Oncology*. 2012;30(5):660-5.
- 120. NCBI. GSTM1 glutathione S-transferase mu 1 [Homo sapiens (human)] NCBI 2017** [19/10/2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2944>.
- 121. Gtex. Gene expression for GSTM1 (ENSG00000134184.8) 2018** [16/05/2018]. Available from: <https://www.gtexportal.org/home/gene/GSTM1>.
- 122. NCBI. GSTM1 [Homo sapiens] protein NCBI 2017** [19/10/2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAG46666.1>.
- 123. NCBI. glutathione S-transferase M1 transcript variant 2 [Homo sapiens]: NCBI; 2017** [19/10/2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAT06768.1>.
- 124. NCBI. SNP GSTM1 2017** [21/10/2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=GSTM1>.
- 125. Hollman AL, Tchounwou PB, Huang HC.** The Association between Gene-Environment Interactions and Diseases Involving the Human GST Superfamily with SNP Variants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2016;13(4):379.
- 126. Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR.** Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(6):3517-27.

- 127. Benjemana K.** Etude du polymorphisme des enzymes de détoxification des xénobiotiques dans le cancer du nasopharynx. Thèse de Doctorat: Université Mentouri Constantine; 2008.
- 128. Lin HJ, Han CY, Bernstein DA, Hsiao W, Lin BK, Hardy S.** Ethnic distribution of the glutathione transferase Mu 1-1 (GSTM1) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 1994;15(5):1077-81.
- 129. Rouissi K, Ouerhani S, Hamrita B, Bougatef K, Marrakchi R, Cherif M *et al.*** Smoking and polymorphisms in xenobiotic metabolism and DNA repair genes are additive risk factors affecting bladder cancer in Northern Tunisia. *Pathology Oncology Research*. 2011;17(4):879-86.
- 130. Rouissi K, Ouerhani S, Marrakchi R, Ben Slama MR, Sfaxi M, Ayed M *et al.*** Combined effect of smoking and inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 on bladder cancer in a Tunisian population. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2009;190(2):101-7.
- 131. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL *et al.*** Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & American Society of Preventive Oncology*. 2001;10(12):1239-48.
- 132. Gaspar PA, Hutz MH, Salzano FM, Hill K, Hurtado AM, Petzl-Erler ML *et al.*** Polymorphisms of CYP1a1, CYP2e1, GSTM1, GSTT1, and TP53 genes in Amerindians. *American Journal of Physical Anthropology*. 2002;119(3):249-56.
- 133. NCBI. GSTM1 [Homo sapiens] protein 2017** [27/10/2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAG46666.1>.
- 134. NCBI. structure summary MMDb (structure protein GSTM1) 2017** [27/10/2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/2F3M>.
- 135. Coggan M, Whitbread L, Whittington A, Board P.** Structure and organization of the human theta-class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. *The Biochemical Journal*. 1998;334 (3):617-23.
- 136. NCBI. Homo sapiens glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1), transcript variant 2017** [28/10/2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>.
- 137. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM *et al.*** Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *The Biochemical Journal*. 1994;300 (1):271-6.
- 138. NCBI. glutathione S-transferase theta-1 isoform a [Homo sapiens] 2017** [04/11/2017]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000844.2.
- 139. Gtex. Gene expression for GSTT1 (ENSG00000184674.8) 2017** [04/11/2017]. Available from: <https://www.gtexportal.org/home/gene/GSTT1>.
- 140. Cabello MJ, Grau L, Franco N, Orenes E, Alvarez M, Blanca A *et al.*** Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes in bladder cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2011;13(1):29-40.
- 141. Moore LE, Pfeiffer RM, Poscablo C, Real FX, Kogevinas M, Silverman D *et al.*** Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *The Lancet Oncology*. 2008;9(4):359-66.
- 142. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold spring harbor laboratory press; 1989.
- 143. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human

- nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988;16(3):1215.
144. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT *et al.*** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-91.
 145. **Tracy TE, Mulcahy LS.** A simple method for direct automated sequencing of PCR fragments. *BioTechniques*. 1991;11(1):68-75.
 146. **Poitras E, Houde A.** La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*. 2002; 2(2):2-11.
 147. **Mackay IM, Arden KE, Nitsche A.** Real time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*. 2002;30:1292-305.
 148. **Vega FMDL, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH.** Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan® SNP Genotyping Assays and the SNPlex™ Genotyping System. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005;573(1):111-35.
 149. **Kellen E, Zeegers M, Paulussen A, Vlietinck R, Vlem EV, Veulemans H *et al.*** Does occupational exposure to PAHs, diesel and aromatic amines interact with smoking and metabolic genetic polymorphisms to increase the risk on bladder cancer?; The Belgian case control study on bladder cancer risk. *Cancer Letters*. 2007;245(1-2):51-60.
 150. **Khaled HM, Bahnassi AA, Zekri AR, Kassem HA, Mokhtar N.** Correlation between p53 mutations and HPV in bilharzial bladder cancer. *Urologic Oncology*. 2003;21(5):334-41.
 151. **Kim EJ, Jeong P, Quan C, Kim J, Bae SC, Yoon SJ *et al.*** Genotypes of TNF-alpha, VEGF, hOGG1, GSTM1, and GSTT1: useful determinants for clinical outcome of bladder cancer. *Urology*. 2005;65(1):70-5.
 152. **Salah N, Harir S, Zeggai F, Sellam NM, Merabent S, Moullessehouli M.** Cancers urologiques en Algérie : profil histopathologique à propos de 348 cas. *Journal Africain du Cancer / African Journal of Cancer*. 2015;7(2):126-31.
 153. **Li P, Chen J, Miyamoto H.** Androgen Receptor Signaling in Bladder Cancer. *Cancers*. 2017;9(2):20.
 154. **Lombard AP, Mudryj M.** The emerging role of the androgen receptor in bladder cancer. *Endocrine Related Cancer*. 2015;22(5):265-77.
 155. **Kang HW, Song PH, Ha YS, Kim WT, Kim YJ, Yun SJ *et al.*** Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms: susceptibility and outcomes in muscle invasive bladder cancer patients. *European Journal of Cancer*. 2013;49(14):3010-9.
 156. **Beebe-Dimmer JL, Iyer PT, Nriagu JO, Keele GR, Mehta S, Meliker JR *et al.*** Genetic variation in glutathione S-transferase omega-1, arsenic methyltransferase and methylene-tetrahydrofolate reductase, arsenic exposure and bladder cancer: a case-control study. *Environmental Health*. 2012;11:43.
 157. **Benchekroun A, El Alj HA, Essayegh H, Iken A, Nouini Y, Lachkar A *et al.*** Tumeurs infiltrantes de vessie : étude rétrospective à propos de 225 cas. *Annales d'urologie* 2003;37:279-83.
 158. **BEN BAHRIA-SEDIKI I.** Recherche de biomarqueurs pronostiques dans le cancer de la vessie dans la population Tunisienne . Thèse de doctorat : Université de Tunis El Manar.; 2016.
 159. **Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L *et al.*** Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*. 2005;66:4-34.
 160. **Martinache G, Zerbib M, Descazeaud A, Debre B, Peyromaure M.** PTa bladder tumours: prognostic factors of recurrence and progression. *Progrès en Urologie*. 2008;18:35.

161. **Diaoa B, Amath T, Fall b, Fall PA, Diémé MJ, Steevy NN *et al.*** Les cancers de vessie au Sénégal: particularités épidémiologiques, cliniques et histologiques. *Progrès en Urologie*. 2008;18:445-8.
162. **Koffi A, Kodjo T, Tchou D, Abdel-Kadre A, Gado NK.** Tumeurs de la vessie au Togo : aspects épidémiologiques et diagnostiques. À propos de 36 cas observés au CHU de Lomé. *Annales de Pathologie*. 2010;30:68-9.
163. **Letašiová S, Medve'ová A, Šovčíková A, Dušinská M, Volkovová K, Mosoiu C *et al.*** Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. *Environmental Health*. 2012;11(Suppl 1).
164. **Zeegers MP, Tan FE, Dorant E, van Den Brandt PA.** The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer*. 2000;89(3):630-9.
165. **Alberg AJ, Hébert JR.** Cigarette smoking and bladder cancer: a new twist in an old saga? *Journal of the National Cancer Institute*. 2009; 101(22): 1525–26.
166. **Kiriluk KJ, Prasad SM, Patel AR, Steinberg GD, Smith ND.** Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urologic Oncology*. 2012;30:199-211.
167. **Escudero DO, Shirodkar SP, Lokeshwar VB.** Bladder carcinogenesis and molecular pathways in Bladder Tumors. Ed: Springer. 2011:23-41.
168. **Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P *et al.*** Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *International Journal of Cancer*. 2000;86(2):289-94.
169. **Bjerregaard BK, Raaschou-Nielsen O, Sorensen M, Frederiksen K, Christensen J, Tjonneland A *et al.*** Tobacco smoke and bladder cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *International Journal of Cancer*. 2006;119(10):2412-6.
170. **Boffetta P, Hecht S, Gray N, Gupta P, Straif K.** Smokeless tobacco and cancer. *The Lancet Oncology*. 2008;9(7):667-75.
171. **Torti FM, Lum BL, Aston D, MacKenzie N, Faysel M, Shortliffe LD *et al.*** Superficial bladder cancer: the primacy of grade in the development of invasive disease. *Journal of Clinical Oncology*. 1987;5(1):125-30.
172. **Wu XR.** Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(9):713-25.
173. **Irani J, Bernardini S, Bonnal JL, Chauvet B, Colombel M, Davin JL *et al.*** Tumeurs urothéliales : recommandations du Comité de cancérologie de l'Association française d'urologie. *Progrès en Urologie*. 2004;14:959-96.
174. **Altayli E, Gunes S, Yilmaz AF, Goktas S, Bek Y.** CYP1A2, CYP2D6, GSTM1, GSTP1, and GSTT1 gene polymorphisms in patients with bladder cancer in a Turkish population. *International Urology and Nephrology*. 2009;41(2):259-66.
175. **Rouissi K, Ouerhani S, Oliveira E, Marrakchi R, Cherni L, Ben Othman F *et al.*** Polymorphisms in one-carbon metabolism pathway genes and risk for bladder cancer in a Tunisian population. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2009;195(1):43-53.
176. **Fatma Bc, Aida T, Maurice JA, Saguem S.** Glutathione S-transferase M1 and T1, CYP1A2-2467T/delT polymorphisms and non small-cell lung cancer risk in Tunisian sample. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2012;13(3):307-12.
177. **Goerlitz D, El Daly M, Abdel-Hamid M, Saleh DA, Goldman L, El Kafrawy S *et al.*** GSTM1, GSTT1 null variants, and GPX1 single nucleotide polymorphism are not associated with bladder cancer risk in Egypt. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2011;20(7):1552-4.

178. Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS *et al.* Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis*. 1995;16(5):1243-5.
179. Zhang R, Xu G, Chen W, Zhang W. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer risk: a meta-analysis of 26 studies. *Molecular Biology Reports*. 2011;38(4):2491-7.
180. Saad AA, O'Connor PJ, Mostafa MH, Metwalli NE, Cooper DP, Povey AC *et al.* Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms and bladder cancer risk in Egyptians. *The International Journal of Biological Markers*. 2005;20(1):69-72.
181. Song DK, Xing DL, Zhang LR, Li ZX, Liu J, Qiao BP. Association of NAT2, GSTM1, GSTT1, CYP2A6, and CYP2A13 gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of bladder cancer in Central China. *Cancer Detection and Prevention*. 2009;32(5-6):416-23.
182. Kiemeny LA, Sulem P, Besenbacher S, Vermeulen SH, Sigurdsson A, Thorleifsson G *et al.* A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nature Genetics*. 2010;42(5):415-9.
- 183.NCBI. dbSNP Short Genetic Variations 2018 [08/03/2018]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=798766.
- 184.NCBI. 1000 Genomes Browser 2018 [08/03/2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>.
185. Figueroa JD, Koutros S, Colt JS, Kogevinas M, Garcia-Closas M, Real FX *et al.* Modification of Occupational Exposures on Bladder Cancer Risk by Common Genetic Polymorphisms. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015;107(11).
186. Wang M, Wang M, Zhang W, Yuan L, Fu G, Wei Q *et al.* Common genetic variants on 8q24 contribute to susceptibility to bladder cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis*. 2009;30(6):991-6.
187. Yeh CW, Huang SS, Lee RP, Yung BY. Ras-dependent recruitment of c-Myc for transcriptional activation of nucleophosmin/B23 in highly malignant U1 bladder cancer cells. *Molecular pharmacology*. 2006;70(4):1443-53.
188. Li Y, Liu H, Lai C, Du X, Su Z, Gao S. The Lin28/let-7a/c-Myc pathway plays a role in non-muscle invasive bladder cancer. *Cell and Tissue Research*. 2013;354(2):533-41.
- 189.Yates DR, Roupret M, Drouin SJ, Audouin M, Cancel-Tassin G, Comperat E *et al.* Genetic polymorphisms on 8q24.1 and 4p16.3 are not linked with urothelial carcinoma of the bladder in contrast to their association with aggressive upper urinary tract tumours. *World Journal of Urology*. 2013;31(1):53-9.
190. Wang M, Chu H, Lv Q, Wang L, Yuan L, Fu G *et al.* Cumulative effect of genome-wide association study-identified genetic variants for bladder cancer. *International Journal of Cancer*. 2014;135(11):2653-60.

Annexes

ANNEXE 2 :

Consentement pour la participation à une étude scientifique

Intitulé de l'étude : Étude génétique du cancer de la vessie

Je, soussigné(e), (Nom et prénom) :.....né(e)le.....
demeurant à.....

déclare avoir été informé(e), de la nature, des objectifs et du déroulement de l'étude scientifique concernant le cancer de la vessie. A cet effet, je donne mon accord pour la participation à cette étude et je permets, l'utilisation de mon ADN extrait à partir du sang prélevé.

J'ai compris que ma participation est totalement volontaire. Je peux refuser de participer ou me retirer de l'étude à tout moment.

J'accepte que mes échantillons biologiques soient conservés et utilisés à des fins de recherche médicale et /ou biologique, seulement dans le cadre de la maladie désignée ci-dessus. J'ai compris que les résultats de l'analyse génétique me seront transmis si je désire et resteront confidentiels. Je peux à tout moment demander la destruction de mon ADN.

Lieu, date	Signature du patient (e)
Signature du médecin traitant	Signature du chercheur

ANNEXE 3 :

Protocole d'extraction de l'ADN (méthode au NaCl)

(Miller *et al.*, 1988)

1. Dans un tube de 50 ml, ajouter 40 ml de solution SLR (Solution de Lyse des globules Rouges, 10 mM Tris, pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl) pour 10 ml de sang total (recueilli dans un tube avec anticoagulant) et le mettre dans de la glace pendant 20 min.
2. Centrifuger à 2500 tpm à 4°C, puis éliminer le surnageant.
3. Répéter les étapes de lyse des globules rouges (rajout de 40 ml de SLR, centrifugation et élimination du surnageant) jusqu'à éclaircissement du culot de globules blancs.
4. Resuspendre le culot de globules blancs dans 2 ml de solution SLB (Solution de Lyse des globules Blancs, 10 mM Tris, pH 7,6, 10 mM EDTA, pH 8,0, 10 mM NaCl).
5. Rajouter 200 µl de l'SDS 10% et 10 µl de Protéinase K (20 mg/ml) (Sigma®).
6. Incuber sous agitation à 37°C pendant toute une nuit.
7. Ajouter 600 µl de NaCl 6M et agiter vigoureusement.
8. Centrifuger à 5000 tpm pendant 15 min à 4°C.
9. Transférer le surnageant dans un tube de 50 ml.
10. Ajouter 2,5 volumes d'Ethanol absolu glacial.
11. Mélanger doucement par retournement jusqu'à formation d'une méduse d'ADN.
12. Transférer la méduse d'ADN à l'aide d'une pipette Pasteur dans un microtube de 1,5 ml.
13. Rincer la méduse dans 1 ml d'Ethanol à 70%, puis éliminer ce liquide.
14. Sécher l'ADN à 37°C pendant 30 min ou à température ambiante.
15. Resuspendre l'ADN dans de l'eau ultra-pure.

ANNEXE 4 :

Estimation qualitative et semi-quantitative de l'ADN extrait par électrophorèse sur gel d'agarose

1. Préparer un gel d'agarose à 1% dans du tampon TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM Acide borique, 2 mM EDTA, pH 8,0) supplémenté de 0,5 µg/ml de Bromure d'éthidium (Sigma®).
2. Préparer les échantillons à déposer : 1 µl ADN génomique + 9 µl H₂O + 5 µl Bleu de dépôt (0,05% Bleu de bromophénol, 60% Glycérol).
3. Préparer la gamme de concentration à partir d'un ADN λ (50 ng/µl, Pharmacia®) : 100 ng, 200 ng et 400 ng.
4. Déposer les échantillons et la gamme dans les puits du gel.
5. Lancer l'électrophorèse dans du tampon TBE 1X pendant 30 min à 100 V.
6. Visualiser l'ADN sous rayons UVs.

ANNEXE 5 :

Révélation des produits d'amplification de la PCR multiplex par électrophorèse sur gel d'agarose

1. Préparer un gel d'agarose à 1,5% dans du tampon TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM Acide borique, 2 mM EDTA, pH 8,0) supplémenté de 1 µl sybersafe (Thermo Fisher®).
2. Préparer les échantillons à déposer : 15 µl produit PCR + 5 µl Blue/orange 6X loading Dye de Promega.
3. Préparer le marqueur de taille : 1 µl de marqueur de taille (100-base pair ladder, BioLabs®) + 9 µl H₂O + 5 µl Blue/orange.
4. Déposer les échantillons et le marqueur de taille dans les puits du gel.
5. Lancer l'électrophorèse dans du tampon TBE 1X pendant 30 à 40 min à 100 V.
6. Visualiser les produits d'amplification sous rayons UVs.

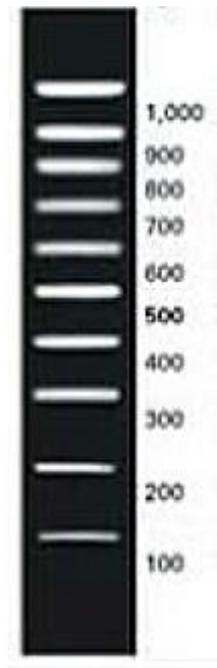


Figure1 : profil de migration sur gel d'agarose d'un marqueur de taille 100 pb.

Publications

POLYMORPHIC DELETIONS OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES M1, T1 AND BLADDER CANCER RISK IN ALGERIAN POPULATION**AHMED HIRECHE^{1*}, NAOUEL CHAOUI-KHEROUATOU¹, ASMA RIBOUH¹, NOUREDDINE ABADI², MING-JUN SHI³, DALILA SATTI¹**¹Department of Animal Biology, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, University Constantine 1, Constantine 25000, Algeria.²Laboratory of Biology and Molecular Genetic, University Constantine 3, Constantine 25000, Algeria. ³Laboratory of Molecular Oncology, UMR 144, Institut Curie, 75005 Paris, France. Email: hireche.ahmed@yahoo.fr

Received: 07 March 2018, Revised and Accepted: 12 April 2018

ABSTRACT

Objective: *Glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1)* and *GST theta 1 (GSTT1)* genes are two xenobiotic metabolizing genes in Phase II of the detoxification process. The polymorphisms of *GSTM1*, *GSTT1* genes, and smoking are involved in many cancers such as bladder cancer. Our aim was to assess the role of smoking status and *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes in bladder cancer development in Algerian population.

Methods: The current case-control study included 175 bladder cancer patients and 188 controls matched for age, gender, and ethnic origin. The *GSTM1* and *GSTT1* genotypes were determined by multiplex polymerase chain reaction using blood genomic DNA. Possible associations of stage and grade with the obtained genotypes were also tested.

Results: A significant associations were observed between bladder cancer risk and tobacco smoke (p value: $p=1.21E-08$), *GSTM1* null genotype ($p=0.018$), *GSTT1* null genotype ($p=0.009$), and *GSTM1/GSTT1*-double null genotype ($p=0.001$). The combined effect of smoking and testing deletions increased the risk of bladder cancer and the most important risk was observed among smokers carrying *GSTM1/GSTT1*-double null genotype ($p=1.09E-05$). No significant association was shown between stage and grade of bladder cancer and the testing genotypes.

Conclusion: This study indicated that smoking, *GSTM1* null, *GSTT1* null, and *GSTM1/GSTT1*-double null genotypes individually represent a risk factor for bladder cancer in Algerian population. The interaction smoking gene increased the risk considerably. In fact, it is suggested that patients with cigarette smoking habit and combined *GSTM1* and *T1* genes deletion might be at increased risk of bladder cancer.

Keywords: *Glutathione S-transferase mu 1*, *Glutathione S-transferase theta 1*, Smoking, Bladder cancer.

© 2018 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i5.25673>

INTRODUCTION

Cancer is currently estimated to be a major cause of deaths worldwide [1]. Urothelial bladder cancer is one of the commonly occurring cancers [2]. It is the 7th most commonly diagnosed cancer in males and the 17th in females worldwide. Global estimates suggest that there are annually 330-400 bladder cancer cases with 123,100 related deaths in the world [3].

In North African men, bladder cancer is the most common cancer after liver and lung cancers, accounting an annual estimated incidence of 11,225 with 5489 deaths [3]. Between 2006 and 2010, the incidence for Algerian men were 10.3/100,000 person-years, this represents 9.1% of the global cancer incidence in Algeria [4].

Bladder cancer can be muscle-invasive or non-invasive and classified as high-grade or low-grade tumor, respectively [5]. The risk of this disease increases with advancing age and most cases are diagnosed above 65 years of age [6]. The incidence is 5-7 times higher in males than in females in Algeria and North Africa [3,4].

It is admitted that the primary prevention of this deadly disease needs first of all understanding the etiology and determining the risk factors.

Smoking is the most well-established risk factor for bladder cancer in both sexes [5,7], with the risk among smokers reported to be approximately fourfold that among non-smokers [7].

The combustion of tobacco releases at least at 69 known carcinogens which have been directly implicated as mutagens causing bladder cancer [8,9].

Following smoking, occupational exposure to aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are other important risk factors [10]. Increasing evidence suggests a significant influence of genetic polymorphism of xenobiotic-metabolizing enzymes which could increase susceptibility to various environmental and clinical conditions. The balance between activation and detoxification of carcinogens affects the amount of DNA damage that occurs in cells [11].

A large family of enzymes has been encoded by glutathione-S-transferases (GSTs) multigene and plays a vital role in the mechanism of cellular detoxification [9,12]. Until now, human cytosolic GST superfamily contains at least 16 genes subdivided into eight distinct classes designated as: (pi), (alpha), (sigma), (mu), (theta), (kappa), (omega), and (zeta), which are encoded by the *GSTA*, *GST mu (GSTM)*, *GSTK*, *GSTO*, *GSTP*, *GSTS*, *GST theta (GSTT)*, and *GSTZ* genes [11]. They catalyze different reactions with bladder cancer carcinogens such as aminobiphenyls and PAHs [13]. Functional polymorphisms have been identified in the *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and *GSTA1* [11,14]. In recent years, studies of *GSTs* have revealed new roles for some of the members of this family. It has been demonstrated that *GSTs* of classes (alpha), (mu), and (pi) are involved in cell proliferation, differentiation, and control of cell death through interactions with special signaling proteins [15].

It was reported that both *GSTM1* and *GSTT1* genes exhibit deletion polymorphisms. Homozygous deletions of these genes resulted in null genotypes which results in a lack of enzyme activity [9,12]. This information suggests that these mutations may interfere and affect the susceptibility to many malignant tumors as cervical, laryngeal, oral, and bladder cancer [9,12].

Positive association of *GSTM1* and *GSTT1* deletion polymorphism and bladder carcinoma was found among many populations [16]. However, data related to a genetic status of *GSTM1* and *GSTT1* and their association to bladder cancer is not available in Algerian population. Therefore, the aim of this current study was first to examine the association between *GSTM1* and *GSTT1* genes variants and bladder cancer risk through a case-control study in Algerian population. Then, we evaluated the differential as well as the combined effect of selected variants according to tobacco smoking in the onset and development of bladder carcinoma. Finally, we tried to establish an association between these two studied genes and clinicopathologic characteristics of bladder cancer.

METHODS

Subjects

The study population consisted of 175 patients with bladder cancer and 188 healthy controls. Cases were recruited between September 2014 and May 2016 from Central Hospital University of Tizi-Ouzou (Urology department) and Daksi renal Clinic of Constantine (Urology department). All were from North of Algeria, aged between 22 and 90 years. More than 92% of them were men. All patients were confirmed by clinical histopathology and staged according to the tumor/node/metastasis staging system of the Union International Contre le Cancer (UICC; 1997). Tumors were graded according to the World Health Organization 1973 classification.

The control group consisted of unrelated healthy subjects without a history of malignant disease who were approximately matched for gender proportion, geographic origin, and age range, to those in the case group. A detailed questionnaire was elaborated and used to obtain study information's, and under informed consent, peripheral blood samples were collected into tubes with EDTA (pH 8).

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes using sodium chloride (NaCl) method. The quality and quantity of DNA were determined, respectively, by agarose gel electrophoresis and spectrophotometric analysis using nanodrop. DNA was diluted to 10 ng/ml and stored at -20°C for further use as a template.

Genotyping of the *GSTM1* and *GSTT1* using multiplex polymerase chain reaction (PCR)

The screening of *GSTM1* and *GSTT1* genes was performed by multiplex PCR methodology. Briefly, the PCR was carried out in 25 μl mixture containing 50 ng of DNA using DNA Polymerase Kit: HotStarTaq DNA polymerase-QIAGEN (4 μl buffer $\times 1$, 8 mM of deoxynucleosides S-triphosphates, 2 U/ μl Taq polymerase, and 2.5 mM of each primer).

The paired primers for *GSTM1* were:

5'-GAATCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' and 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGT GG-3' [12].

The paired primers for *GSTT1* were:

5'-TTCCTTACTGGTCTCACATCTC-3' and 5'-TCACCGGATCATGGCCACCA-3' [12].

The paired primers for β -globulin were:

5'-ACACAAGTGTCTCACTAGC-3' and 5'-CAACTTCATCCACGTTACCC-3' [12].

β -globulin was used as an internal control, confirming successful PCR amplification to ensure that the *GSTM1 null* and *GSTT1 null* were due to the deletion allele of the *GSTs* and not because of the failure of the PCR.

Cycling conditions were as follows: Initial preheat 95°C for 10 min, 35 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 45 s, and 72°C for 1 min. The final extension was done at 72°C for 10 min. The amplified products were subjected to electrophoresis on 2% agarose gel, stained with ethidium

bromide, and visualized under ultraviolet light. The *GSTM1* fragment was 230 bases pairs (bp), the *GSTT1* was 480 bp, and the β -globulin fragment was 110 bp in size.

Statistical analysis

Relative risks were estimated by calculating the odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) at the 0.05 significance level. OR were calculated using R software version 3.2.3. $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Characteristics of the study population

Relevant characteristics of cases and controls are given in Table 1. There are more male than female cases (92.6% vs. 7.4%) with a sex ratio of 12:1. The mean age of bladder cancer patients and controls were similar, 60.77 ± 13.21 years (range 22-90) and 59.56 ± 14.02 years (range 22-89), respectively. 80% of bladder cancer patients were more than 50 years of age. Smoking was more widespread among patients with bladder cancer 122/175 (69.7%) than controls 74/188 (39.4%) which it recalled that they had been taken randomly ($p = 1.21 \times 10^{-8}$). Of the 175 cancer patients, 16% had tumors with Grade I, 25.1% Grade II, and 58.9% Grade III. 19.4% had a Ta stage, 48.6% had a T1, 23.4% had a T2, and 8.6% had a T3 stage or more.

GSTs genotypes, bladder cancer susceptibility, and interactions with smoking

GSTs genotypes frequencies and their relation to bladder cancer risk

GSTM1 null genotype (M1-) was more frequent than *GSTT1 null* genotype (T1-). Their frequencies were 57.1% and 39.4%, respectively, in bladder cancer patients compared to 44.7% and 26.6% respectively in healthy controls (Table 2). These results show a significant association between the *GSTM1 null* genotype and risk of bladder cancer ($p = 0.018$). *GSTT1 null* genotype was also associated with greater risk toward this type of cancer ($p = 0.009$).

Combined *GSTM1* and *GSTT1* genotypes and bladder cancer risk

The analysis of combined *GSTM1* and *GSTT1* genotypes revealed that all combinations were significantly associated with increased bladder cancer risk. As presented in Table 2, our results show clearly that the combinations between *GSTM1* and *GSTT1* genotypes increase the OR values and decrease the p value. The highest OR was observed for *GSTM1/GSTT1*-double null genotype (OR=2.9; CI: 1.44-6; $p = 0.001$).

Association of *GSTs* genotypes and smoking status with bladder cancer risk

The stratification of patients and controls according to *GSTs* genotypes and tobacco status is depicted in Table 2. The results indicated any statistically significant association between *GSTM1 null*, *GSTT1 null* genotypes, or possible combined *GSTM1/GSTT1* genotypes with bladder cancer risk among never smoker group.

However, among current or prior smokers group, all tested genotypes were revealed as risk genotypes except for combined *GSTM1 positive/GSTT1 positive* ($p = 0.17$).

It is important to note that the interaction of smoking and one *GSTs null* genotypes increase the risk considerably, (OR=6.7; CI: 2.8-16.8; $p = 1.33 \times 10^{-6}$) for *GSTM1 null* genotype and (OR=6.9; CI: 2.3-22.7; $p = 0.0001$) for *GSTT1 null* genotype. Smokers with *GSTM1/GSTT1*-double null genotypes have a most important risk for developing bladder cancer (OR=7.9; CI: 2.8-24.4; $p = 1.09 \times 10^{-5}$) when compared to a reference group of non-smokers with the *GSTM1 positive/GSTT1 positive*.

Relationship between *GSTs* genotypes and clinicopathological parameters

The associations of *GSTM1*, *GSTT1*, or combined *GSTM1/GSTT1* genotypes with tumor grades or stages of bladder cancer were not seen (data not shown).

Table 1: Characteristics of the study population

Parameters	Controls (%)	Cases (%)	OR	CI	p value
Gender					
Male	169 (89.9)	162 (92.6)	-	-	0.37
Female	19 (10.1)	13 (7.4)	-	-	
Age (years)					
<50	43 (22.9)	35 (20)	-	-	0.5
≥50	145 (77.1)	140 (80)	-	-	-
Mean age (range)	59.56±14.02 (22-89)	60.77±13.21 (22-90)	-	-	-
Smoking status					
Never smoker	114 (60.6)	53 (30.2)	-	-	-
Current or prior smoker	74 (39.4)	122 (69.7)	3.55	229-5.48	1.21E-08**
Grade					
G1	-	28 (16)	-	-	-
G2	-	44 (25.1)	-	-	-
G3	-	103 (58.9)	-	-	-
TNM stage					
Ta	-	34 (19.4)	-	-	-
T1	-	85 (48.6)	-	-	-
T2	-	41 (23.4)	-	-	-
T3 or more	-	15 (8.6)	-	-	-
Recurrences					
No	-	83 (47.4)	-	-	-
Yes	-	92 (52.6)	-	-	-
Cystectomy after Evolution	-	9 (5.1)	-	-	-

** : P<0.01. TNM: Tumor/node/metastasis, OR: Odds ratios, CI: Confidence intervals

Table 2: *GSTM1*, *GSTT1* genotypes, and combined genes-smoking effect on bladder cancer susceptibility

Genotypes	Controls (%)	Cases (%)	OR	CI 95%	p value
<i>GSTM1</i>					
M1+	104 (55.3)	75 (42.9)	-	-	-
M1-	84 (44.7)	100 (57.1)	1.65	1.09-2.5	0.018
<i>GSTT1</i>					
T1+	138 (73.4)	106 (60.6)	-	-	-
T1-	50 (26.6)	69 (39.4)	1.8	1.15-2.8	0.009**
<i>GSTM1/GSTT1</i>					
M1+/T1+	76 (40.4)	40 (22.9)	-	-	-
M1+/T1-	28 (14.9)	35 (20)	2.36	1.2-4.67	0.004**
M1-/T1+	62 (33)	66 (37.7)	2.02	1.2-3.39	0.007**
M1-/T1-	22 (11.7)	34 (19.4)	2.9	1.44-6	0.001**
<i>GSTM1</i> -smoking					
Never smoker					
M1+	58 (30.9)	28 (16)	-	-	-
M1-	56 (29.8)	25 (14.3)	0.9	0.45-1.86	0.87
Current or prior smoker					
M1+	46 (24.5)	47 (26.9)	2.1	1.1-4.1	0.01**
M1-	28 (14.9)	75 (42.9)	5.5	2.84-10.9	3.87E-08**
<i>GSTT1</i> -smoking					
Never smoker					
T1+	81 (43.1)	31 (17.7)	-	-	-
T1-	33 (17.6)	22 (12.6)	1.7	0.8-3.6	0.1
Current or prior smoker					
T1+	57 (30.3)	75 (42.9)	3.4	2-6	6.96E-06**
T1-	17 (9)	47 (26.9)	7.1	3.4-15.4	6.3E-09**
<i>GSTM1/GSTT1</i> -smoking					
Never smoker					
M1+/T1+	38 (20.2)	14 (8)	-	-	-
M1+/T1-	20 (10.6)	14 (8)	1.88	0.7-5.2	0.2
M1-/T1+	43 (22.9)	18 (10.3)	1.1	0.5-2.8	0.8
M1-/T1-	13 (6.9)	7 (4)	1.4	0.4-5	0.56
Current or prior smoker					
M1+/T1+	38 (20.2)	26 (14.9)	1.8	0.8-4.4	0.17
M1+/T1-	8 (4.3)	21 (12)	6.9	2.3-22.7	0.0001**
M1-/T1+	19 (10.1)	48 (27.4)	6.7	2.8-16.8	1.33E-06**
M1-/T1-	9 (4.8)	27 (15.4)	7.9	2.8-24.4	1.09E-05**

GSTM1 positive (M1+), *GSTM1* null (M1-), *GSTT1* positive (T1+), and *GSTT1* null (T1-), (**): P<0.01. *GSTM1*: Glutathione S-transferase mu 1, *GSTT1*: Glutathione S-transferase theta 1, OR: Odds ratios, CI: Confidence intervals

DISCUSSION

We have undertaken this current study to investigate the combined effect of *GSTM1*, *GSTT1* genes polymorphism, and smoke on bladder cancer susceptibility in Algerian population.

Our case-control study revealed, first in bladder cancer group that the incidence is 12 times higher in males than in females (sex ratio 12:1). This difference in incidence is greater than those reported in previous studies among North Africans [3] and Algerian population [4]. We have also shown that cigarette smoking was a significant risk factor for bladder cancer risk (OR=3.55; CI: 2.9–5.48; $p=1.21E-08$). More than 50% of our cases are smokers. A similar observation was made by Burger *et al.* [8]. Several previous studies in the world demonstrated the increased risk of bladder cancer in smokers [5,7,16,17].

Bladder cancer is the result of the variable combination of two determinants: Endogenous or constitutional factors and exogenous or environmental factors [6]. Genetic differences between detoxification systems may cause an increase in susceptibility to environmentally induced bladder cancer [18]. Thus, the GSTs are multigene family-related isozymes that involved in the detoxification of carcinogens, including PAHs present in tobacco smoke [6,9,12,19]. It was noted that *GSTM1 null* genotype is the most important factor for the reduction of total GST activity [20]. The polymorphism in the *GSTT1* gene loci is also caused by a gene deletion and leads to a virtual absence of enzyme activity in individuals with the null genotype [11]. *GSTM1* and *GSTT1* gene polymorphisms have been associated with a wide variety of cancers including bladder cancer [9].

It is reported that the prevalence of *GSTM1 null* genotype varies widely from 31% to 88% in relation to ethnic origin [21]. This frequency in our studied population was 44.7% for healthy controls and 57.1% for cases which approach substantially to that given for Tunisian and Egyptian populations [22-24]. Deletion of *GSTT1* loci was higher in bladder cancer patients than in controls (39.4% vs. 26.6%, respectively). These proportions were so different to that compared to other ethnic groups [25].

To investigate the impact of metabolic polymorphism in modulating bladder cancer risk susceptibility, we have compared genotypic frequencies of studied genes between individuals carrying the wild-type (*GSTM1* positive, *GSTT1* positive) and individuals at risk (*GSTM1 null*, *GSTT1 null*).

Our results indicate that in Algerian population the *GSTM1 null* genotype confers statistically a significant correlation for overall risk for bladder cancer (OR=1.65; CI: 1.09–2.5; $p=0.018$). This finding is consistent with combined results of 26 studies represented in the meta-analysis of Zhang *et al.* [26], including 5029 bladder cancer cases and 6680 controls. Other more recent studies carried out in India and Pakistan have given the same result [16,27]. Among all studied ethnic groups, the association between *GSTM1 null* genotype and risk of bladder cancer was observed in Asians and Caucasians [26]. Conversely, in Tunisian and Egyptian populations results suggested that this polymorphism had no effect on risk of bladder carcinogenesis [24,28-30]. Moreover, only one Egyptian study recorded this association, but it presented a limitation of effective which was too low [31].

We also investigated the association of *GSTT1* and bladder cancer. As for the *GSTM1 null* genotype, statistical test shows an association between the *GSTT1 null* genotype and urinary bladder cancer (OR=1.8, CI: 1.15–2.8; $p=0.009$). Our results were in agreement with a number of other studies presented in a meta-analysis of Gong *et al.* [19] who reported this association in Caucasians. However, no dramatically increased risk was found for other populations including North Africans [12,19,24,28,29,32], except for the study of Saad *et al.* [30] who suggested an increased risk with *GSTT1 null* genotype in the Egyptian population.

Patients with combined homozygous deletion (*GSTM1 null/GSTT1 null*) have a greater risk (OR=2.9; CI: 1.44–6; $p=0.001$) compared to those harboring only one deletion. This is in accordance to the results mentioned in the meta-analyses of Gong *et al.* [19]. This observation can be explained by the fact that the presence of the combined homozygous deletion of *GSTM1* and *GSTT1* genes is associated with reduction or complete loss of the enzyme activity [12,13]. In this context, we can suggest that the double mutated genotype may play an important role in the susceptibility of bladder cancer.

In this study, we have also compared genotypic frequencies of studied genes combined with smoking status between non-smokers carrying wild type as a reference group and individuals at risk: Smokers with one or two genetic risk factors. About *GSTM1 null* genotype, we found that risk is present only in smokers. However, for *GSTT1 null* genotype, the risk is most important in smokers than no smokers group.

The simultaneous association of both null *GSTM1* and *GSTT1* genotypes with cigarette smoke status gives a highest probability to develop bladder cancer.

This combination smoking gene is biologically plausible because *GSTM1* and *GSTT1* genes are involved in Phase II detoxification of carcinogens PAHs found in cigarette smoke. Anyone of the two null *GSTM1* or *GSTT1* genotypes causes reductions of enzymatic activity [12,13].

Among non-smokers group, the exposure to these carcinogens is much less important than in smokers group. Therefore, the null genotypes of *GSTM1* and *GSTT1* genes will have a less dangerous effect on non-smokers group. However, in smokers, continuous exposure makes the process of detoxification that involves interventions of enzymes encoded by *GSTM1* and (or) *GSTT1* genes very important. Rouissi *et al.* [29] have noted an increased risk after the combination of many factors including *GSTM1 null*, *GSTT1 null* genotypes, and smoking. We concluded that the simultaneous association of risk factors gives a high probability to develop bladder cancer as shown by increased OR value presented in our study (OR=7.9).

On the other hand, the results of this current study indicate that there were no statistically significant associations between the clinical stages and histological grades of tumors and the frequencies of genotypes. Our findings concur with many previously published studies [11,20,32].

CONCLUSION

In conclusion, our data suggest in Algerian population that *GSTM1 null* and *GSTT1 null* genotypes increase the risk for urinary bladder carcinoma. The combination of the two gene polymorphisms represents a greater risk. A strong association was found between genetic deletions of *GSTM1*, *GSTT1*, and bladder cancer among smokers. The most important risk was shown in smokers carrying double deletions of studied genes. An absence of association between GSTs genotypes, stage, and grade of tumors was registered. However, owing to the relatively smaller sample size, further studies on larger series of patients are required to confirm the present findings.

ACKNOWLEDGMENTS

The author's knowledge Pr. Nacer Balasla (Department of Urology, University Hospital of Tizi-Ouzou) and Pr. Abderrezak Dahdouh, Pr. Taoufik Djaghri (Department of Urology and renal transplantation, Daksi renal Clinic of Constantine) for their support. We would also like to thank Pr. François Radvanyi and all the staff of the Laboratory of Molecular Oncology, Institut Curie, Paris, France, for their help and assistance.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All of the authors mentioned in the article have contributed to this research work. A Hireche: Protocol/project development, data collection or management, data analysis, and Manuscript writing/

editing. N Chaoui-Kherouatou: Protocol/project development, data analysis, Manuscript writing/editing, and final correction of the manuscript. A Ribouh: Protocol/project development and data collection or management. N Abadi: Protocol/project development. MJ Shi: Data analysis. D Satta: Protocol/project development and final correction of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

REFERENCES

- Saka S, Singh AN, Sharma N. Potential anti-cancer superfoods: A minireview. *Int J Curr Pharm Res* 2016;8:19-21.
- Gupta M, Dahiya J, Marwaha RK, Dureja H. Therapies in cancer treatment: An overview. *Int J Pharm Pharm Sci* 2015;7:1-9.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr/>. [Last accessed on 2016 may 30].
- Hamdi Cherif M, Serraino D, Mahnane A, Laouamri S, Zaidi Z, Boukharouba H, et al. Time trends of cancer incidence in Setif, Algeria, 1986-2010: An observational study. *BMC Cancer* 2014;14:637.
- Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 2011;306:737-45.
- Ferris J, Garcia J, Berbel O, Ortega J A. Constitutional and occupational risk factors associated with bladder cancer. *Actas Urol Esp* 2013;37:513- 22.
- Kiriluk KJ, Prasad SM, Patel AR, Steinberg GD, Smith ND. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urol Oncol* 2012;30:199-211.
- Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2013;63:234-41.
- Matic M, Pekmezovic T, Djukic T, Mimic-Oka J, Dragicevic D, Krivic B, et al. GSTA1, GSTM1, GSTP1, and GSTT1 polymorphisms and susceptibility to smoking-related bladder cancer: A case-control study. *Urol Oncol* 2013;31:1184-92.
- Mitra AP, Cote RJ. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;4:251-85.
- Safarinejad MR, Safarinejad S, Shafiei N, Safarinejad S. Association of genetic polymorphism of glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with bladder cancer susceptibility. *Urol Oncol* 2013;31:1193- 203.
- Abd El Hameed AH, Negm OE, El-Gamal OM, Hamouda HE, El Nouby KA, Ismail GM, et al. Genetic polymorphism of glutathione S-transferases M1 and T1 in egyptian patients with bilharzial bladder cancer. *Urol Oncol* 2010;28:296-301.
- Song DK, Xing DL, Zhang LR, Li ZX, Liu J, Qiao BP, et al. Association of NAT2, GSTM1, GSTT1, CYP2A6, and CYP2A13 gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of bladder cancer in central china. *Cancer Detect Prev* 2009;32:416-23.
- Coles BF, Morel F, Rauch C, Huber WW, Yang M, Teitel CH, et al. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenetics* 2001;11:663-9.
- Khan AR, Taneja P. Cationic peptide lactoferricin B inhibits glutathione S-transferase P1 from human placenta and breast cancer cell line MDA-MB-231 preventing anticancer drug antimetabolism. *Int J Pharm Pharm Sci* 2015;7:238-41.
- Malik SS, Nawaz G, Masood N. Genotypes of GSTM1 and GSTT1: Useful determinants for clinical outcome of bladder cancer in Pakistani population. *Egypt J Med Hum Genet* 2016. DOI:10.1016/j.ejmhg.2016.03.001.
- Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: A pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 2000;86:289-94.
- Altayli E, Gunes S, Yilmaz AF, Goktas S, Bek Y. CYP1A2, CYP2D6, GSTM1, GSTP1, and GSTT1 gene polymorphisms in patients with bladder cancer in a turkish population. *Int Urol Nephrol* 2009;41:259- 66.
- Gong M, Dong W, An R. Glutathione S-transferase T1 polymorphism contributes to bladder cancer risk: A meta-analysis involving 50 studies. *DNA Cell Biol* 2012;31:1187-97.
- Henriquez-Hernandez LA, Navarro P, Luzardo OP, Alvarez-Leon EE, Boarda LD, Zumbado M. Polymorphisms of glutathione S-transferase mu and theta, MDR1 and VEGF genes as risk factors of bladder cancer: A case-control study. *Urol Oncol* 2012;30:660-5.
- Lin HJ, Han CY, Bernstein DA, Hsiao W, Lin BK, Hardy S, et al. Ethnic distribution of the glutathione transferase mu 1-1 (GSTM1) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 1994;15:1077-81.
- Rouissi K, Ouerhani S, Oliveira E, Marrakchi R, Cherni L, Ben Othman F, et al. Polymorphisms in one-carbon metabolism pathway genes and risk for bladder cancer in a Tunisian population. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;195:43-53.
- Fatma B, Aida T, Maurice JA, Saguem S. Glutathione S-transferase M1 and T1, CYP1A2-2467T/delT polymorphisms and non small-cell lung cancer risk in Tunisian sample. *Egypt J Med Hum Genet* 2012;13:307- 12.
- Goerlitz D, El Daly M, Abdel-Hamid M, Saleh DA, Goldman L, El Kafrawy S, et al. GSTM1, GSTT1 null variants, and GPX1 single nucleotide polymorphism are not associated with bladder cancer risk in Egypt. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20:1552-4.
- Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, et al. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* 1995;16:1243-5.
- Zhang R, Xu G, Chen W, Zhang W. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer risk: A meta-analysis of 26 studies. *Mol Biol Rep* 2011;38:2491-7.
- Sharma N, Singh A, Singh N, Behera D, Sharma S. Genetic polymorphisms in GSTM1, GSTT1 and GSTP1 genes and risk of lung cancer in a north indian population. *Cancer Epidemiol* 2015;39:947-55.
- Rouissi K, Ouerhani S, Marrakchi R, Ben Slama MR, Sfaxi M, Ayed M, et al. Combined effect of smoking and inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 on bladder cancer in a Tunisian population. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;190:101-7.
- Rouissi K, Ouerhani S, Hamrita B, Bougateg K, Marrakchi R, Cherif M, et al. Smoking and polymorphisms in xenobiotic metabolism and DNA repair genes are additive risk factors affecting bladder cancer in northern Tunisia. *Pathol Oncol Res* 2011;17:879-86.
- Saad AA, O'Connor PJ, Mostafa MH, Metwalli NE, Cooper DP, Povey AC, et al. Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms and bladder cancer risk in Egyptians. *Int J Biol Markers* 2005;20:69-72.
- Anwar WA, Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Mostafa HM, Au WW. Genetic polymorphism of GSTM1, CYP2E1 and CYP2D6 in Egyptian bladder cancer patients. *Carcinogenesis* 1996;17:1923-9.
- Kang HW, Song PH, Ha YS, Kim WT, Kim YJ, Yun SJ, et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms: Susceptibility and outcomes in muscle invasive bladder cancer patients. *Eur J Cancer* 2013;49:3010-9.

Review Article

Association between the TACC3 rs798766 Polymorphism and Risk of Urinary Bladder Cancer: A Synthesis Based on Current Evidence

Xiang-Yu Meng,¹ Ming-Jun Shi,^{2,3} Jia-Feng Chen,¹ Yi Liao,⁴ Bang-Wang Hu,¹ and Ahmed Hireche^{2,3}

¹Center for Evidence-Based and Translational Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, China

²Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR 144, 75005 Paris, France

³Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, CNRS, UMR 144, 91405 Orsay, France

⁴Department of Oncology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, China

Correspondence should be addressed to Xiang-Yu Meng; mengxy_whu@163.com

Received 7 February 2017; Accepted 30 April 2017; Published 5 June 2017

Academic Editor: Paola Gazzaniga

Copyright © 2017 Xiang-Yu Meng et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. A possible association between the TACC3 rs798766 polymorphism and urinary bladder cancer risk has been indicated in published literature. We performed this meta-analysis as a synthesis of all relevant data to summarize currently available evidence and to provide estimation with increased precision. **Methods.** EMBASE, PubMed, Google Scholar, and Wanfang Data were searched. “rs798766” and “urinary bladder cancer” were used as the search terms. A total of 6 eligible studies were identified, in which 8194 cases and 50,165 controls were investigated. Meta-analysis was performed using extracted data. Subgroup analysis by ethnicity was also performed. Population attributable risk (PAR) was calculated. **Results.** We found a significant association between rs798766[T] and increased risk of bladder cancer, allelic[T] OR = 1.27, 95%CI = 1.20–1.33. Subgroup analysis by ethnicity revealed similar results, allelic[T] OR = 1.24, 95%CI = 1.17–1.32 in Caucasian subjects and allelic[T] OR = 1.33, 95%CI = 1.21–1.46 in Asian subjects. PAR based on pooled allelic ORs and the frequency of the risk allele in control subjects was 4.63% in the overall population and 3.92% in Asians and 4.36% in Caucasians. **Conclusion.** rs798766 is associated with increased risk of bladder cancer, and no ethnic difference was found.

1. Introduction

Urinary bladder cancer (UBC) is one of the most common malignancies worldwide [1]. Clinical epidemiological studies have identified many risk factors correlated with the development of UBC, among which tobacco smoking and exposure to certain carcinogens are considered most significant [2, 3]. Interestingly, not all exposed individuals develop UBC, suggesting that individual features, possibly genetic susceptibility, may also take part in the carcinogenesis of UBC.

As revealed in some genome-wide association studies (GWAS) [4–7], which were conducted exclusively in Caucasian subjects, dozens of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified as being associated with risk of UBC. And among which, five SNPs had also been subsequently

validated in Asians, that is, rs9642880 and rs2294008 on chromosome 8q24, rs710521 on 3q28, rs2853669 on 5p15.33, and rs798766 on 4p16.3.

The rs798766 polymorphism is one of the latest found biallelic marker of C/T variation, and the C is the common allele while the T is the risk allele. It is located in the 5th intron of TACC3, 70 kb away from FGFR3. Both the two genes, TACC3 and FGFR3, were reported to have an important role in the transformation of UBC [8, 9]. And the long-range regulation of a SNP to an adjacent gene was also possible [10]. Thus, it is rational to associate rs798766 with UBC both in clinical investigations and in a hypothetical mechanism. As considerable evidence is available but no synthesis has been performed, we conducted the present study, a meta-analysis aimed to summarize

TABLE 1: Basic characteristics of included studies.

First author	Year	Study design	Genotyping method	Case (n)	Control (n)	T allele Fre (ctrl)	HWE	Allelic[T] OR	95% CILL	95% CIUL	Race
Wu [7]	2010	Synthesis of 11 case-control sets	SNP array, PCR	4580	45269	0.19	In	1.24	1.17	1.32	Caucasian
Figueroa [16]	2011	Case-control	TaqMan	815	1141	0.118	In	1.32	1.09	1.59	Asian
Ma [17]	2012	Case-control	iPLEX	176	959	0.11	In	1.64	1.19	2.27	Asian
Wang [19]	2013	Case-control	TaqMan	1210	1008	0.11	In	1.31	1.09	1.57	Asian
Wang [20]	2014	Case-control	TaqMan	1050	1404	0.12	In	1.24	1.05	1.46	Asian
Wang [21]	2015	Case-control	TaqMan	363	384	0.11	In	1.53	1.13	2.08	Asian

Fre (ctrl): risk allele frequency among control subjects; HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium; OR: odds ratio; CILL: confidence interval lower limit; CIUL: confidence interval upper limit.

currently available evidence and to provide estimation with increased precision, in terms of the association between rs798766[T] and risk of UBC.

2. Methods

2.1. Search Strategy. A comprehensive literature search was conducted in EMBASE, PubMed, Google Scholar, and Wanfang Data up to January 2016. “rs798766” and “urinary bladder cancer” were used as the search terms. No limitations of publication language were defined. A reference list of retrieved articles was checked for potential relevant publications.

2.2. Selection Criteria. Eligible studies were selected according to the following criteria: (a) the association between rs798766 polymorphism and bladder cancer was evaluated; (b) the study has a case-control design; and (c) adjusted allelic odds ratios (ORs) and corresponding 95% confidence intervals (CIs) were provided. The study with more information was considered where multiple reports based on overlapped population were identified. Reviews, editorials, comments, or animal studies were excluded.

2.3. Data Extraction. Two investigators independently extracted data from the eligible studies. Collected information included the following: name of the first author, year of publication, race of subjects (Caucasian or Asian), genotyping method, total number of cases and controls, frequency of risk allele in controls, Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) status in both cases and controls, study design, and values of ORs and 95% CIs.

2.4. Statistical Analysis. Allelic ORs and upper and lower limits of corresponding 95% CIs were transformed to the logarithmic scale, and the standard error of natural logarithmic OR (logOR) was calculated as $se \log OR = \ln(UL_{OR}) - \ln(LL_{OR}) / 2 \times 1.96$, with UL_{OR} and LL_{OR} representing the upper and lower limits of the 95% confidence interval. Between-study heterogeneity was evaluated using Cochran’s Q test and the I^2 statistic. No significant heterogeneity was assumed if the P value of Cochran’s Q test was not less than 0.1 and I^2 statistic not bigger than 50% [11], and a fixed-effects model assuming a common overall effect size would be used [12], according to which the pooled logOR was calculated as the mean based on individual logORs weighted by corresponding variance, that is, the

squared selogOR; otherwise, a random-effects model with DerSimonian-Laird estimator for tau-squared would be considered [13]. Subgroup analysis stratified by ethnicity of subjects with similar approach was performed. To test whether there exists a significant difference between the pooled results of Asians and Caucasians, a Z -test was performed. A forest plot was drawn as a visualization of meta-analysis. Begg’s funnel plot and Egger’s linear regression test were used to examine publication bias [14, 15]. A P value less than 0.05 was considered significant.

Risk allele frequency (RAF) among all the controls for Asian, Caucasian, and overall subjects were calculated as the average weighted by control sample size of individual studies, that is, pooled $RAF_{control} = \sum_1^k RAF_i \times n_i / \sum_1^k n_i$, with k indicating the number of all the included studies and RAF_i and n_i representing the RAF and sample size of the control group in the i th individual study. Estimated population attributable risk (PAR%) for rs798766[T] was calculated as $PAR\% = \text{pooled } RAF_{control} \times (OR_{pooled} - 1) / \text{pooled } RAF_{control} \times (OR_{pooled} - 1) + 1 \times 100\%$, with pooled $RAF_{control}$ representing the frequency of the risk allele in control subjects and the OR_{pooled} the pooled allelic odds ratio.

All the statistical analyses were performed using R 3.1.2 and the analysis package meta.

3. Results

3.1. Study Selection and Characteristics of Included Studies. Eight studies were retrieved after initial search [4, 16–22]. The full texts of all the eight studies were reviewed, and finally, 6 studies [4, 17–21] met all the selection criteria and 16 independent case-control sample sets containing 8194 cases and 50,165 controls were included in the present study.

The basic characteristics of all the included studies are shown in Table 1. No deviation from HWE was detected in any of the studies.

3.2. Quantitative Synthesis. No significant heterogeneity was detected for both the overall meta-analysis and subgroup analysis ($I^2 = 0$, $P > 0.1$ for both), and a fixed-effects model was used. We found a significant association between the frequency of rs798766[T] and increased risk of UBC, with allelic[T] OR = 1.27 and 95%CI = 1.20–1.33. Subgroup analysis by ethnicity revealed similar results, with allelic[T] OR = 1.24 and 95%CI = 1.17–1.32 in Caucasian subjects

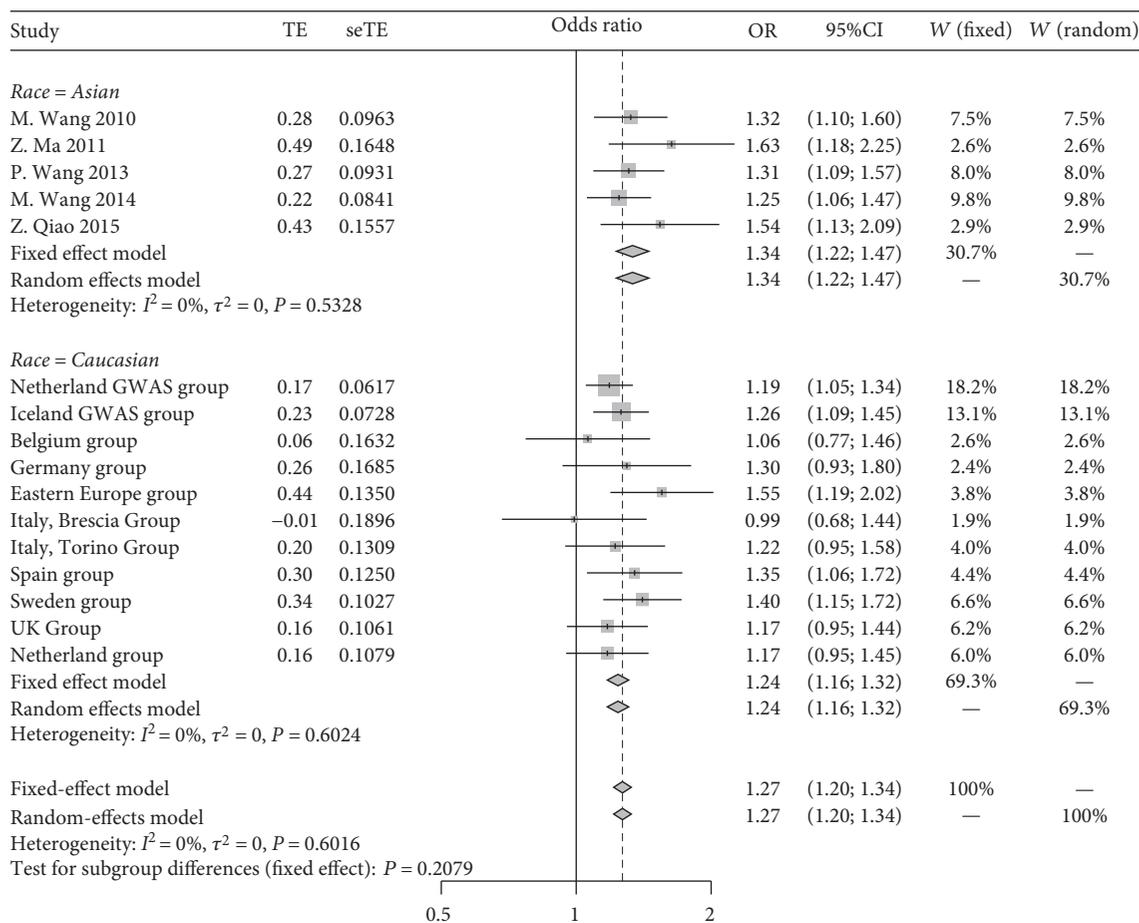


FIGURE 1: Forest plot showing meta-analysis based on 16 independent case-control sample sets. Subgroup analysis stratified by race.

and allelic[T] OR = 1.33 and 95%CI = 1.21–1.46 in Asian subjects. The forest plot is shown in Figure 1.

The result of Z-test for testing the difference between Asians and Caucasians revealed no significant ethnic difference in terms of the pooled allelic ORs ($P = 0.21$).

3.3. Publication Bias. Since Begg's funnel plot was symmetric (Figure 2) and Egger's test was nonsignificant ($P = 0.37$), no evidence of publication bias was found.

3.4. RAF among Controls and PAR. As shown in Table 2, the pooled RAFs in controls were 0.12, 0.19, and 0.18 for Asians, Caucasians, and overall population, respectively. The PAR% based on pooled allelic ORs and the frequency of the risk allele rs798766[T] in control subjects was 4.63% in the overall population and 3.92% in Asians and 4.36% in Caucasians.

4. Discussion

Diseases, particularly complex ones such as UBC, have been considered as a consequence of the interaction between external risk factors and intrinsic susceptibility. In the past decades, epidemiological studies had identified many external risk factors as contributory to the carcinogenesis and progression of UBC [23–26]. On the other hand, GWAS studies have investigated genetic susceptibility to UBC. Thanks to

those genome-wide association studies, several SNPs have been conferred significant susceptibility to urinary bladder cancer, such as rs9642880 at 8q24.21 (30 kb upstream from MYC), rs710521 at 3q28 (near TP63), rs2294008 at 8q24.2 (in PSCA), rs2736098 at 5p15.33 (in TERT), and rs798766 at 4q16.3 (on the 5th intronic region of TACC3).

To the best of our knowledge, this study is the first that systematically summarized current evidence regarding rs798766 and risk of developing UBC and confirmed the positive association that the frequency of risk allele rs798766[T] would increase risk of UBC, with substantially increased reliability (no heterogeneity was found; P values of the association for overall, Asians, and Caucasians were 1.81×10^{-19} , 1.45×10^{-9} , and 9.58×10^{-12} , resp.). Besides, no ethnic difference was found with respect to this issue. The only limitation of our study is a lack of multiplicative risk assessment and cumulative effect of the focused SNP rs798766 together with other most related SNPs and even some external risk factors. This is mainly because of the design or selective result reported in included studies. Yet, it should be emphasized that those results are pretty crucial for an individual. A study exploring the associations between 7 SNPs and risk of UBC demonstrated that individuals with multiple risk alleles had a higher risk of bladder cancer, compared to those with 0–4 risk alleles of 7 variants ($P = 3.166 \times 10^{-13}$) [19].

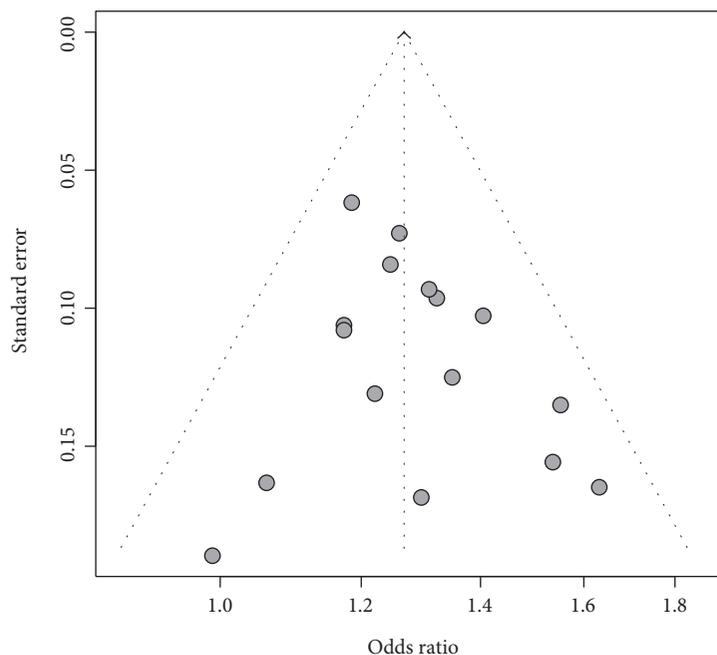


FIGURE 2: Funnel plot for meta-analysis based on 16 independent sample sets. No publication bias revealed.

TABLE 2: Pooled RAF in controls and PAR%.

	Number of control	Pooled RAF	Pooled OR	PAR%
Asian	4896	0.12	1.33	3.92
Caucasian	45269	0.19	1.24	4.36
Overall	50165	0.18	1.27	4.63

RAF: risk allele frequency; PAR: population attributable risk.

rs798766 is located in the 5th intron of TACC3, 70 kb away from FGFR3. TACC3 encodes the transforming acidic coiled-coil-containing protein 3, which is an important factor in the complex process of regulating microtubule dynamics during cell division [27]. Researchers have revealed a possible association between dysregulation of TACC3 and carcinogenesis. For instance, there are reports that upregulated TACC3 was detected in glioblastoma, non-small-cell lung cancer, non-Hodgkin's lymphoma, and multiple myeloma patients [28–31]. However, no evidence showing a possible correlation between TACC3 and rs798766 in UBC was reported. It is also well known that the constantly activated FGFR3 by point mutation can stimulate cell proliferation and plays an oncogenic role in bladder cancer [8, 32]. Kiemeny et al. [4] reported that the frequency of risk allele rs798766[T] in bladder Ta tumors with a high protein level of FGFR3 was 0.30 compared to 0.17 in those with a low level (OR 2.18, $P = 0.073$), and Figueroa et al. [16] had also identified a statistically significant association between the rs798766[T] and increased FGFR3 expression both at the protein and mRNA level ($P < 0.05$). And very recently, the role of oncogenic gene FGFR3-TACC3 fusion has been discovered in UBC, in cervical cancer, in lung cancer, and in nasopharyngeal carcinoma [9, 33–35].

However, it should be noted that, to date, there is no evidence from functional studies exploring the potential

molecular interactions among rs798766, TACC3, and FGFR3, and only very few articles proposed some plausible hypotheses. Although the association has been confirmed, the underlying mechanism has never been fully elucidated. For all of the above, we suppose that there mainly exist three possible explanations on the tight linkage between rs798766 and UBC. Firstly, we assume that the increased frequency of rs798766[T] may implicate directly to the regulatory region and enhance the promoter activity of FGFR3, triggering subsequent overexpression of FGFR3 gene which ultimately induces the transformation to tumor. Secondly, the increased frequency of rs798766[T] may accelerate the tumor formation through upregulating the expression of TACC3 which increases the microtubule dynamic stability and massively promotes cell division, possibly enhanced by simultaneously stimulated FGFR3 activation. Thirdly, a possible role of MYC signaling pathways in UBC development has been suggested [36, 37], and interestingly, we noted that in almost all the relevant GWAS studies where a significant correlation between the rs798766[T] with bladder cancer indicated, similar findings pertaining to rs9642880[T] (30 kb upstream from MYC and exerts a long-range regulation for MYC [10]) were reported. So it seems rational to suppose that the rs798766[T] might also be involved in MYC-related pathways, manipulated by some unknown regulatory networks. Whatever the real story is, further functional studies are needed to verify these hypotheses.

In summary, this meta-analysis suggests that the TACC3 rs798766 polymorphism is significantly associated with increased risk of urinary bladder cancer. No significant ethnic difference is found in subgroup analysis. However, it is highly recommended to carry out further functional studies to clarify the mechanism behind this association.

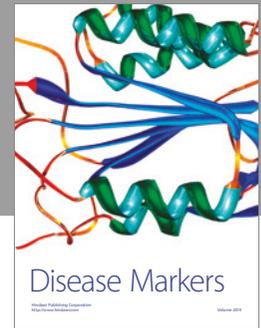
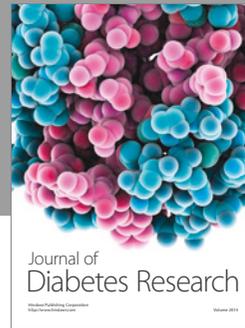
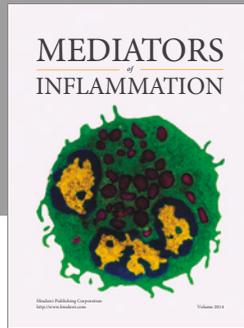
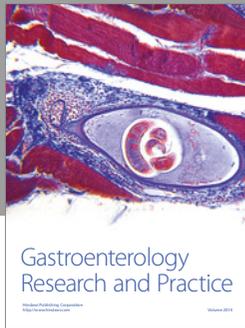
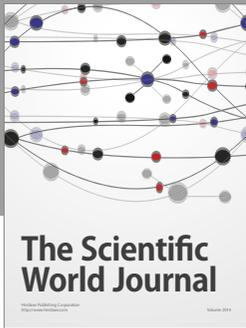
Conflicts of Interest

The authors declare no financial support and no conflict of interest.

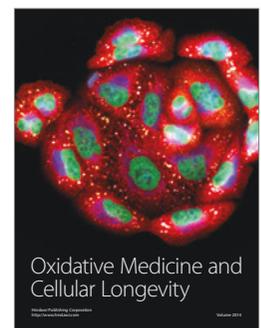
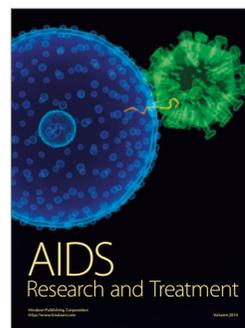
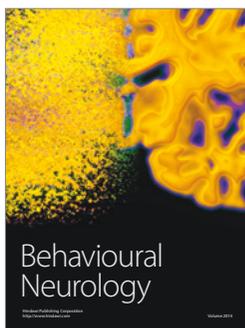
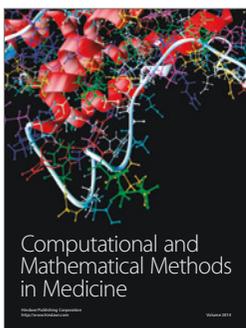
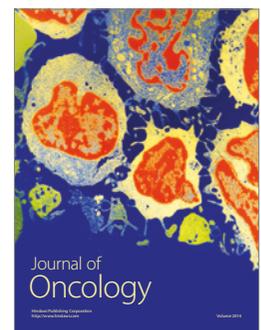
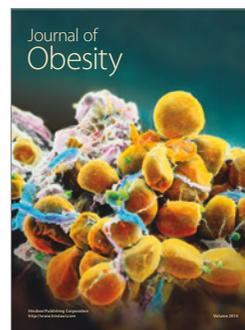
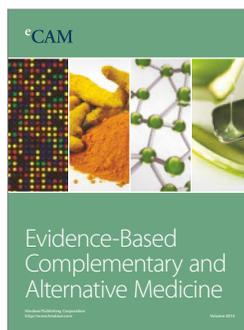
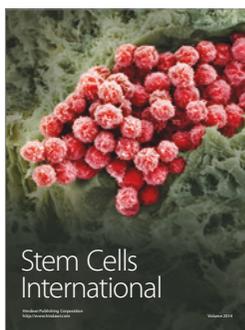
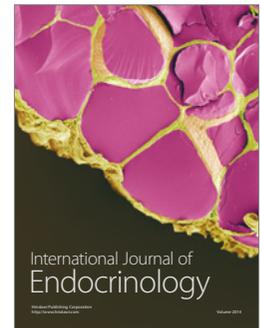
References

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit et al., "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *International Journal of Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359–E386, 2015.
- [2] M. G. Cumberbatch, M. Rota, J. W. Catto, and C. La Vecchia, "The role of tobacco smoke in bladder and kidney carcinogenesis: a comparison of exposures and meta-analysis of incidence and mortality risks," *European Urology*, vol. 70, no. 3, pp. 458–466, 2016.
- [3] M. Rota, C. Bosetti, S. Boccia, P. Boffetta, and C. La Vecchia, "Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons and respiratory and urinary tract cancers: an updated systematic review and a meta-analysis to 2014," *Archives of Toxicology*, vol. 88, no. 8, pp. 1479–1490, 2014.
- [4] L. A. Kiemeny, P. Sulem, S. Besenbacher et al., "A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer," *Nature Genetics*, vol. 42, no. 5, pp. 415–419, 2010.
- [5] L. A. Kiemeny, S. Thorlacius, P. Sulem et al., "Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer," *Nature Genetics*, vol. 40, no. 11, pp. 1307–1312, 2008.
- [6] T. Rafnar, P. Sulem, S. N. Stacey et al., "Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types," *Nature Genetics*, vol. 41, no. 2, pp. 221–227, 2009.
- [7] X. Wu, Y. Ye, L. A. Kiemeny et al., "Genetic variation in the prostate stem cell antigen gene PSCA confers susceptibility to urinary bladder cancer," *Nature Genetics*, vol. 41, no. 9, pp. 991–995, 2009.
- [8] D. Cappellen, C. De Oliveira, D. Ricol et al., "Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas," *Nature Genetics*, vol. 23, no. 1, pp. 18–20, 1999.
- [9] S. V. Williams, C. D. Hurst, and M. A. Knowles, "Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer," *Human Molecular Genetics*, vol. 22, no. 4, pp. 795–803, 2013.
- [10] M. Wang, W. Zhang, L. Yuan, G. Fu, Q. Wei, and Z. Zhang, "Common genetic variants on 8q24 contribute to susceptibility to bladder cancer in a Chinese population," *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 6, pp. 991–996, 2009.
- [11] J. P. Higgins and S. G. Thompson, "Quantifying heterogeneity in a meta-analysis," *Statistics in Medicine*, vol. 21, no. 11, pp. 1539–1558, 2002.
- [12] N. Mantel and W. Haenszel, "Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 22, no. 4, pp. 719–748, 1959.
- [13] R. DerSimonian and N. Laird, "Meta-analysis in clinical trials," *Controlled Clinical Trials*, vol. 7, no. 3, pp. 177–188, 1986.
- [14] C. B. Begg and M. Mazumdar, "Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias," *Biometrics*, vol. 50, no. 4, pp. 1088–1101, 1994.
- [15] M. Egger, G. Davey Smith, M. Schneider, and C. Minder, "Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test," *BMJ*, vol. 315, no. 7109, pp. 629–634, 1997.
- [16] J. D. Figueroa, S. Koutros, J. S. Colt et al., "Modification of occupational exposures on bladder cancer risk by common genetic polymorphisms," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 107, no. 11, 2015.
- [17] Z. Ma, Q. Hu, Z. Chen et al., "Systematic evaluation of bladder cancer risk-associated single-nucleotide polymorphisms in a Chinese population," *Molecular Carcinogenesis*, vol. 52, no. 11, pp. 916–921, 2013.
- [18] Z. Qiao, R. Wang, W. Xie, Y. Sun, C. Wu, and H. Hu, "Association between polymorphism of rs798766 and urothelial bladder cancer risk from Han population of Tianjin," *Journal of Tianjin Medical University*, vol. 21, no. 3, pp. 208–211, 2015.
- [19] M. Wang, H. Chu, Q. Lv et al., "Cumulative effect of genome-wide association study-identified genetic variants for bladder cancer," *International Journal of Cancer*, vol. 135, no. 11, pp. 2653–2660, 2014.
- [20] M. Wang, H. Chu, F. Yan et al., "Chromosome 4p16.3 variant modify bladder cancer risk in a Chinese population," *Carcinogenesis*, vol. 32, no. 6, pp. 872–875, 2011.
- [21] P. Wang, D. Ye, J. Guo et al., "Genetic score of multiple risk-associated single nucleotide polymorphisms is a marker for genetic susceptibility to bladder cancer," *Genes, Chromosomes & Cancer*, vol. 53, no. 1, pp. 98–105, 2014.
- [22] D. R. Yates, M. Roupret, S. J. Drouin et al., "Genetic polymorphisms on 8q24.1 and 4p16.3 are not linked with urothelial carcinoma of the bladder in contrast to their association with aggressive upper urinary tract tumours," *World Journal of Urology*, vol. 31, no. 1, pp. 53–59, 2013.
- [23] F. Cantiello, A. Cicione, A. Salonia et al., "Association between metabolic syndrome, obesity, diabetes mellitus and oncological outcomes of bladder cancer: a systematic review," *International Journal of Urology*, vol. 22, no. 1, pp. 22–32, 2015.
- [24] M. Keimling, G. Behrens, D. Schmid, C. Jochem, and M. F. Leitzmann, "The association between physical activity and bladder cancer: systematic review and meta-analysis," *British Journal of Cancer*, vol. 110, no. 7, pp. 1862–1870, 2014.
- [25] N. Malats and F. X. Real, "Epidemiology of bladder cancer," *Hematology/Oncology Clinics of North America*, vol. 29, no. 2, pp. 177–189, 2015, vii.
- [26] C. Xu, X. T. Zeng, T. Z. Liu et al., "Fruits and vegetables intake and risk of bladder cancer: a PRISMA-compliant systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies," *Medicine (Baltimore)*, vol. 94, no. 17, article e759, 2015.
- [27] I. Peset and I. Vernos, "The TACC proteins: TACC-ling microtubule dynamics and centrosome function," *Trends in Cell Biology*, vol. 18, no. 8, pp. 379–388, 2008.
- [28] C. K. Jung, J. H. Jung, G. S. Park, A. Lee, C. S. Kang, and K. Y. Lee, "Expression of transforming acidic coiled-coil containing protein 3 is a novel independent prognostic marker in non-small cell lung cancer," *Pathology International*, vol. 56, no. 9, pp. 503–509, 2006.
- [29] B. C. Parker, M. J. Annala, D. E. Cogdell et al., "The tumorigenic FGFR3-TACC3 gene fusion escapes miR-99a regulation in glioblastoma," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 123, no. 2, pp. 855–865, 2013.
- [30] I. H. Still, P. Vince, and J. K. Cowell, "The third member of the transforming acidic coiled coil-containing gene family, TACC3, maps in 4p16, close to translocation breakpoints in multiple myeloma, and is upregulated in various cancer cell lines," *Genomics*, vol. 58, no. 2, pp. 165–170, 1999.
- [31] R. Yao, Y. Natsume, Y. Saiki et al., "Disruption of Tacc3 function leads to in vivo tumor regression," *Oncogene*, vol. 31, no. 2, pp. 135–148, 2012.

- [32] I. Bernard-Pierrot, A. Brams, C. Dunois-Larde et al., "Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b," *Carcinogenesis*, vol. 27, no. 4, pp. 740–747, 2006.
- [33] M. Capelletti, M. E. Dodge, D. Ercan et al., "Identification of recurrent FGFR3-TACC3 fusion oncogenes from lung adenocarcinoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 20, no. 24, pp. 6551–6558, 2014.
- [34] B. A. Carneiro, J. A. Elvin, S. D. Kamath et al., "FGFR3-TACC3: a novel gene fusion in cervical cancer," *Gynecologic Oncology Reports*, vol. 13, pp. 53–56, 2015.
- [35] L. Yuan, Z. H. Liu, Z. R. Lin, L. H. Xu, Q. Zhong, and M. S. Zeng, "Recurrent FGFR3-TACC3 fusion gene in nasopharyngeal carcinoma," *Cancer Biology & Therapy*, vol. 15, no. 12, pp. 1613–1621, 2014.
- [36] Y. Li, H. Liu, C. Lai, X. Du, Z. Su, and S. Gao, "The Lin28/let-7a/c-Myc pathway plays a role in non-muscle invasive bladder cancer," *Cell and Tissue Research*, vol. 354, no. 2, pp. 533–541, 2013.
- [37] C. W. Yeh, S. S. Huang, R. P. Lee, and B. Y. Yung, "Ras-dependent recruitment of c-Myc for transcriptional activation of nucleophosmin/B23 in highly malignant U1 bladder cancer cells," *Molecular Pharmacology*, vol. 70, no. 4, pp. 1443–1453, 2006.



Hindawi
Submit your manuscripts at
<https://www.hindawi.com>



Résumés

RESUME

Le cancer de la vessie représente le 9^{ème} cancer en termes d'incidence mondiale et le 2^{ème} cancer du tractus génito-urinaire chez l'homme, après le cancer de la prostate. C'est une maladie multifactorielle due à l'interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux. La susceptibilité individuelle par rapport au risque du cancer de la vessie est modulée par le polymorphisme génétique porté par certains gènes dont les gènes codant pour les enzymes de détoxification. Parmi ces gènes les Glutathion S-transférase mu1 (*GSTM1*) et Glutathion S-transférase theta1 (*GSTT1*) impliqués dans la phase II de détoxification de plusieurs xénobiotiques et dont les délétions représentent des facteurs de risque incriminés dans plusieurs cancers. Un autre polymorphisme rs798766 a été récemment impliqué dans l'étiologie du cancer vésical. Il est porté sur le gène *TACC3* (transforming acidic coiled-coil-containing protein 3), jouant un rôle dans l'organisation et la stabilité des fuseaux mitotiques lors des divisions cellulaires.

Objectifs : Notre travail vise à analyser premièrement l'impact de la consommation du tabac sous ses deux formes (fumé ou prisé) sur la survenue du cancer vésical. De chercher, dans un deuxième temps, une éventuelle association entre le risque de ce type de cancer et les délétions des gènes de détoxification *GSTM1* et *GSTT1* ainsi que d'explorer l'implication de l'allèle à risque du polymorphisme rs798766 dans la carcinogénèse vésicale. L'effet combiné des polymorphismes étudiés ainsi que la stratification des génotypes selon le statut tabagique, les paramètres clinico-pathologiques et la récurrence ont été également testés.

Méthodes : Cette étude cas-témoins inclus 175 malades atteints d'un cancer vésical et 188 témoins appariés avec les malades selon l'âge, le sexe et l'origine ethnique. Les génotypes des gènes *GSTM1* et *GSTT1* sont déterminés par PCR multiplex en utilisant de l'ADN extrait de sang périphérique. Les génotypes du polymorphisme rs798766 sont déterminés par la technique TaqMan et séquençage. La comparaison des fréquences alléliques et génotypiques entre les deux groupes a été établie par le calcul de l'odds ratio avec un intervalle de confiance à 95%.

Résultats : Des associations statistiquement significatives ont été observées entre : la consommation de tabac (*p-value* : $p = 1,21E-08$), le génotype *GSTM1 nul* ($p = 0,018$), le génotype *GSTT1 nul* ($p = 0,009$), le génotype double délété *GSTM1/GSTT1* ($p = 0,001$) et le risque du cancer vésical. Le risque augmente considérablement chez les fumeurs possédant le génotype double délété *GSTM1/GSTT1* ($p = 1,09E-05$). L'effet combiné statut tabagique, génotype *GSTM1nul/GSTT1nul* et allèle T du polymorphisme rs798766 confère un risque accru d'atteinte par ce type de cancer. Cependant, aucune association n'a été démontrée entre le cancer

vésical et le polymorphisme rs798766 seul ni entre le stade, le grade et la récurrence du cancer de la vessie et les génotypes testés.

Conclusion : Cette étude montre que le tabagisme, le génotype *GSTM1nul*, le génotype *GSTT1nul* ainsi que le génotype double délété *GSTM1nul/GSTT1nul* représentent individuellement un facteur de risque du cancer vésical dans la population Algérienne. L'interaction gène-tabac augmente considérablement ce risque. Les fumeurs possédant une double délétion des gènes de détoxification et l'allèle T du polymorphisme rs798766 présentent un risque accru d'atteinte par ce type de cancer.

Mots clés : *GSTM1*, *GSTT1*, rs798766, tabac, cancer de la vessie.

ABSTRACT

Bladder cancer is the ninth most common cancer in the world and the second urological malignancy in men after prostate cancer. It is a multifactorial disease due to the interaction between genetic factors and environmental factors. The individual susceptibility to the risk of bladder cancer is modulated by the genetic polymorphism carried by certain genes including genes coding for detoxifying enzymes. Among these genes Glutathione S-transferase mu1 (*GSTM1*) and Glutathione S-transferase theta1 (*GSTT1*) involved in phase II of detoxification of several xenobiotics. Deletions of these genes are associated with increased risk of several cancers. Another polymorphism rs798766 has been recently implicated in the etiology of bladder cancer. It is located on the *TACC3* gene (transforming acidic coiled-coil-containing protein 3), which emerged as an important factor in mitotic spindles organization and stability during cell divisions.

Objectives: Our work aims to analyze first the impact of tobacco consumption with its two forms (smoked or sniffed) on the occurrence of bladder cancer. Then, to investigate the relationship between the risk of bladder cancer and the null genotypes of *GSTM1* and *GSTT1* and smoking status in Algerian population. Finally, to explore the involvement of the mutated allele of rs798766 polymorphism in bladder carcinogenesis. The combined effect of all studied polymorphisms as well as the stratification of the genotypes according to the smoking status, the clinicopathological parameters and the recurrence was also tested.

Methods: This case-control study included 175 patients with bladder cancer and 188 controls matched for age, sex, and ethnicity. The *GSTM1* and *GSTT1* genotypes were determined by multiplex PCR using blood genomic DNA. The genotypes of the rs798766 polymorphism are determined by the TaqMan technique and sequencing. The comparison of allelic and genotypic frequencies between the two groups was established by calculating the odds ratio with a 95% confidence interval.

Results: A significant association were observed between bladder cancer risk and tobacco smoke ($p=1.21E-08$), *GSTM1* null genotype ($p=0.018$), *GSTT1* null genotype ($p=0.009$) and both null *GSTM1* and *GSTT1* genotypes ($p=0.001$). The risk increases significantly among smokers carrying both null *GSTM1* and *GSTT1* genotypes ($p=1.09E-05$).The combined effect of smoking status, *GSTM1*null/*GSTT1*null genotype and the mutated allele of rs798766 polymorphism confers the most increased risk of bladder cancer. However, no significant association was shown between bladder cancer and rs798766 polymorphism alone or between stage, grade and bladder cancer recurrence and the testing genotypes.

Conclusion: This study indicated that smoking, *GSTM1 null*, *GSTT1 null* genotypes and combined *GSTM1null/GSTT1null* individually represent a risk factor of bladder cancer in Algerian population. The interaction smoking-gene increased the risk considerably. The combined *GSTM1null/GSTT1null* with cigarette smoking habit is a most important risk factor for bladder cancer found in our study. Smokers with a double deletion of the detoxification genes and the T allele of the rs798766 polymorphism present an increased risk of this cancer.

Keywords: *GSTM1*, *GSTT1*, rs798766, Smoking, Bladder cancer.

ملخص:

يعتبر سرطان المثانة تاسع السرطانات شيوعا وثاني سرطانات المسالك التناسلية والبولية بعد سرطان البروستات. عدت عوامل من المحيط بالإضافة الى عوامل وراثية تتدخل في تكون هذا السرطان. من بين هذه العوامل الوراثية المتدخلة في زيادة القابلية الفردية للإصابة بسرطان المثانة التذبذبات في انتاج انزيمات إزالة السموم من عائلة الغلوتاثيون-اس ترانسفيراز (*GSTM1* و *GSTT1*) خصوصا ومن بين اهم الطفرات على مورثات هذه الانزيمات فقدان المنطقة الحاملة لهذه المورثات. من بين الطفرات المسببة لسرطان المثانة أيضا لدينا الطفرة rs798766 على المورثة *TACC3* حيث ان هذه المورثة تلعب دورا هاما في تنظيم المغزل الا لوني اثناء الانقسام الخلوي.

الهدف:

هذا العمل يهدف أولا الى دراسة تأثير استهلاك التبغ بشكله على ظهور سرطان المثانة. ثانيا قمنا بدراسة وجود علاقة بين تشكل هذا السرطان و محو المورثات (*GSTM1* و *GSTT1*). بالإضافة الى علاقة الطفرة rs798766 بسرطان المثانة. وبعد ذلك قمنا بدراسة التأثير المشترك للعوامل السابقة معا وعلاقة هذه العوامل بطور، رتبة السرطان وخطر الانتكاسة بعد العلاج.

الطرق المتبعة:

اجرية هذه الدراسة على 175 مصاب بسرطان المثانة بالإضافة الى 188 شخص بصحة جيدة وفي تجانس مع المصابين من حيث الجنس والسن. تم تحديد النمط الوراثي بالنسبة للمورثات (*GSTM1* و *GSTT1*) و *TACC3* لكل المشاركين في هذه الدراسة.

النتائج:

استهلاك التبغ بالإضافة الى محو المورثات (*GSTM1* و *GSTT1*) يعتبر كل واحد منهم عامل خطر لتشكيل سرطان المثانة كما ان وجود أكثر من عامل من هذه العوامل يرفع نسبة الخطر. الطفرة rs798766 لا تمثل عامل خطر لهذا السرطان. كما ان كل الأنماط الوراثية المدروسة ليس لها أي علاقة مع طور ورتبة السرطان بالإضافة الى نسبة الانتكاسات.

خلاصة:

هذه الدراسة تبين ان استهلاك التبغ ومحو المورثات (*GSTM1* و *GSTT1*) عوامل تزيد من خطر الإصابة بسرطان المثانة كما ان اشتراك عدة عوامل يرفع من نسبة الخطر. الأشخاص المستهلكون للتبغ والفاقدون للمورثات (*GSTM1* و *GSTT1*) بالإضافة الى امتلاكهم النمط [T] للطفرة rs798766 يمتلكون قابلية كبيرة للإصابة بسرطان المثانة.

كلمات المفتاح:

سرطان المثانة، تبغ، مورثات، طفرة وراثية.

Année universitaire : 2017-2018

Présentée par : HIRECHE AHMED

ÉTUDE GÉNÉTIQUE DU CANCER DE LA VESSIE

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3^{ème} cycle

RESUME

Le cancer de la vessie représente le 9^{ème} cancer en termes d'incidence mondiale et le 2^{ème} cancer du tractus génito-urinaire chez l'homme, après le cancer de la prostate. C'est une maladie multifactorielle due à l'interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux. La susceptibilité individuelle par rapport au risque du cancer de la vessie est modulée par le polymorphisme génétique porté par certains gènes dont les gènes codant pour les enzymes de détoxification. Parmi ces gènes les Glutathion S-transférase mu1 (*GSTM1*) et Glutathion S-transférase theta1 (*GSTT1*) impliqués dans la phase II de détoxification de plusieurs xénobiotiques et dont les délétions représentent des facteurs de risque incriminés dans plusieurs cancers. Un autre polymorphisme rs798766 a été récemment impliqué dans l'étiologie du cancer vésical. Il est porté sur le gène *TACC3* (transforming acidic coiled-coil-containing protein 3), jouant un rôle dans l'organisation et la stabilité des fuseaux mitotiques lors des divisions cellulaires.

Objectifs : Notre travail vise à analyser premièrement l'impact de la consommation du tabac sous ses deux formes (fumé ou prisé) sur la survenue du cancer vésical. De chercher, dans un deuxième temps, une éventuelle association entre le risque de ce type de cancer et les délétions des gènes de détoxification *GSTM1* et *GSTT1* ainsi que d'explorer l'implication de l'allèle à risque du polymorphisme rs798766 dans la carcinogénèse vésicale. L'effet combiné des polymorphismes étudiés ainsi que la stratification des génotypes selon le statut tabagique, les paramètres clinico-pathologiques et la récurrence ont été également testés.

Méthodes : Cette étude cas-témoins inclus 175 malades atteints d'un cancer vésical et 188 témoins appariés avec les malades selon l'âge, le sexe et l'origine ethnique. Les génotypes des gènes *GSTM1* et *GSTT1* sont déterminés par PCR multiplex en utilisant de l'ADN extrait de sang périphérique. Les génotypes du polymorphisme rs798766 sont déterminés par la technique TaqMan et séquençage. La comparaison des fréquences alléliques et génotypiques entre les deux groupes a été établie par le calcul de l'odds ratio avec un intervalle de confiance à 95%.

Résultats : Des associations statistiquement significatives ont été observées entre : la consommation de tabac (*p-value* : $p = 1,21E-08$), le génotype *GSTM1 nul* ($p = 0,018$), le génotype *GSTT1 nul* ($p = 0,009$), le génotype double délété *GSTM1/GSTT1* ($p = 0,001$) et le risque du cancer vésical. Le risque augmente considérablement chez les fumeurs possédant le génotype double délété *GSTM1/GSTT1* ($p = 1,09E-05$). L'effet combiné statut tabagique, génotype *GSTM1nul/GSTT1nul* et allèle T du polymorphisme rs798766 confère un risque accru d'atteinte par ce type de cancer. Cependant, aucune association n'a été démontrée entre le cancer vésical et le polymorphisme rs798766 seul ni entre le stade, le grade et la récurrence du cancer de la vessie et les génotypes testés.

Conclusion : Cette étude montre que le tabagisme, le génotype *GSTM1nul*, le génotype *GSTT1nul* ainsi que le génotype double délété *GSTM1nul/GSTT1nul* représentent individuellement un facteur de risque du cancer vésical dans la population Algérienne. L'interaction gène-tabac augmente considérablement ce risque. Les fumeurs possédant une double délétion des gènes de détoxification et l'allèle T du polymorphisme rs798766 présentent un risque accru d'atteinte par ce type de cancer.

Mots clés : *GSTM1*, *GSTT1*, rs798766, tabac, cancer de la vessie.

Laboratoire de recherche :

Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire (Université Constantine 3).

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Université des Frères Mentouri, Constantine 1).