

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI
Un Peuple-Un But-Une Foi

Université des Sciences, des Techniques et des Technologies
de Bamako (USTTB)



Faculté de Médecine et
d'Odontostomatologie



ANNEE UNIVERSITAIRE 2020-2021

N°.....

THESE

**Etude de l'Organisation Nucléaire des Télomères dans les
Cellules Circulantes Urinaires du Cancer de la Vessie**

Présentée et soutenue publiquement le..../... /2021 devant la
Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS)

Par : M. DOUMBIA Ousmane

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine
(Diplôme d'Etat)

JURY

Président : Pr. Boubacar TRAORE

Membre : Pr. Cheick B. TRAORE

Membre : Pr. Honoré J. G. BERTHE

Co-Directeur : Dr. Oumar SAMASSEKOU

Directeur : Pr. Mahamadou TRAORE

DEDICACES

BISMILLAHİ RAHMANI RAHİMİ

Je dédie ce travail :

A Allah,

Le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux, le seigneur de l'univers, qui m'a inspiré et guidé vers les études médicales, je vous dois ce que je suis aujourd'hui louange et gloire pour votre clémence et miséricorde.

A notre Prophète Mohammad S.A.W

Que la paix et le salut d'Allah soit sur lui, à toute sa famille, tous ses compagnons et à tous ceux qui le suivent jusqu'au jour du jugement dernier. « Apprendre du berceau jusqu'à la tombe » tel était l'une de vos paroles qui nous a donné le goût de l'apprentissage et de la recherche perpétuelle du savoir. Nous vous témoignons notre gratitude et notre respect pour ce que vous avez fait pour l'humanité toute entière. Après avoir rendu grâce à Allah et son Prophète ;

A ma maman Aïssata Keïta

La plus gentille de toutes les mamans, je te suis redevable de la chose la plus importante qui soit « la vie ». Autant de phrases expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes ces années, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. Femme dynamique, généreuse, loyale, joviale, sociable, attentionnée, croyante, naturelle et infatigable ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour. Amina !

A mon Père

Les mots me manquent pour exprimer ce que je ressens au plus profond de moi-même. Tu as toujours été à nos côtés, mes frères, mes sœurs et moi. Tu nous as appris à nous battre dans la vie tout en nous inculquant la crainte de Dieu. Saches que mon hommage ne sera jamais à la hauteur de tes efforts que tu as dû consentir pour mon éducation et ma formation. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal. Amina !

A mon oncle Soufiana Keïta

Grace à toi, j'ai appris le sens de l'honneur, la dignité, la tolérance, la probité, le respect de soi et celui des autres, la rigueur et la loyauté. Ta confiance en moi depuis le début, ton soutien moral, affectif et matériel ne m'ont jamais fait défaut. Je te suis reconnaissant de tout cela. Merci Tonton pour ce que tu as fait pour moi. Je resterai toujours un enfant digne de ton appréciation et je me souviendrai toujours de tes sages conseils. Le destin a voulu que tu ne sois sur place pour la récolte des fruits murs de l'arbre que tu as planté. Reçois ici l'expression de ma profonde gratitude.

A mes Tantes Oumou Ouédraogo, Djénébou Sidibé, Farima Camara, Fatoumata Keïta, Assitan Kaba Diakité, Adam Keïta, Saran Fofana, Aoua Sidibé

Il est un devoir pour nous d'être à la hauteur de nos parents et de répondre à leurs attentes dans la plus grande dignité et le plus grand respect.

Ce travail est le résultat de vos précieux soutiens. Que ce travail soit le gage de mon amour et mon affection indéfectible pour vous. Que Dieu renforce les liens sacrés qui nous unissent, qu'il nous aide à œuvrer pour la consolidation des liens familiaux.

Étude de l'Organisation Nucléaire des Télomères dans les Cellules Circulantes Urinaires du Cancer de la Vessie

A mes frères et sœurs Mohamed Doumbia, Youssouf Doumbia, Bengaly Fodé Doumbia,
Mamadou Doumbia, Moussa Doumbia, Salia Doumbia, Hawa Camara

Merci pour votre soutien moral indéfectible et votre disponibilité ; jamais je ne l'oublierai.

REMERCIEMENTS

Au Professeur Mahamadou Traoré

Cher maître,

Je tiens d'abord à vous remercier pour m'avoir fait confiance puis pour m'avoir guidé et conseillé. Votre disponibilité, votre soutien immuable et votre rigueur au travail ont contribué à la réalisation de ce travail. Vous avez été comme un père pour moi et les moments passés avec vous, m'ont été d'une grande utilité. Très cher Maître je ne sais comment vous exprimer toute ma gratitude autrement qu'en vous promettant d'agir comme vous avec des étudiants dans ma situation si un jour l'occasion m'en est donnée.

Au Docteur Guida Landouré

Séduit par vos qualités d'homme de science, votre raisonnement, et votre clairvoyance, vous avez dès lors suscité notre admiration et le désir d'être compté parmi vos élèves. Avec le temps nous découvrîmes un Maître plein d'humanisme, d'humilité, de spiritualité, et d'une simplicité exemplaire. Nous avons appris à vos côtés ce qu'est la rigueur scientifique, la détermination dans le travail, le patriotisme, l'essence de la justice, de la droiture, de l'esprit d'équipe etc. Veuillez trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond attachement. Qu'ALLAH vous donne une longue vie plein de bonheur, de santé et de succès.

Au Docteur Samassékou Oumar

Mes remerciements vont également à votre endroit, Merci Cher maître de m'avoir accepté parmi vos élèves, de m'avoir offert l'opportunité de vous approcher, de découvrir d'autres cieux avec vous, et de vivre ma passion. Durant ces moments grâce à votre compagnie en plus de la génétique médicale, j'ai appris à soigner mon comportement, mon caractère, mes faits et gestes, à me bâtir une personnalité. Aussi, j'ai appris de vous qu'on ne donne son respect qu'à ceux

qui le méritent et surtout de ne pas rabaisser sa personne à cause de mes convictions et de mes croyances. Merci pour toutes ces remarques que vous m'avez faites que ce soit de manière directe ou indirecte, témoin votre désir de nous voir nous améliorer. J'espère pouvoir être à la hauteur de vos attentes.

A mon maître et ami Docteur Mamadou Keïta

Tu es celui qui m'as accueilli à bras ouvert, tu as guidé mes premiers pas dans l'élaboration de ce document. Tu as d'abord su être un maître, ensuite un ami et enfin un conseiller. Tu es dans mes pensées quotidiennes, ton visage et ton sourire me reviennent fréquemment car tu es celui qui m'a initié à la pratique de la recherche. Tu es le tonton dont j'ai toujours rêvé d'avoir et que la vie m'a offert. Tu as toujours été mon premier recours dans l'élaboration de ce travail à chaque fois que je ne comprenais pas quelque chose. Ta modestie, ton humanisme, aussi et surtout ta générosité sont incomparable. Merci pour tout Dr Keïta !

A mes amis Mamoutou Sangaré, Cheik O Samaké, Mohamed Tounkara, Daouda Fomba, Bakary Diabaté dit Diaboss, Abdoulaye Berthé, Dr Cheick O Keïta, Dr Bakary Coulibaly, Dr Moussa Sangaré, Dr Niang Sékou, Dr Kondy Fofana, Dr Mariam Doumbia, Dr Aminata Traore, Dr Souleymane Traore, Dr Mohamed Traore, Dr Hamadoun Kouyaté, Dr Christian Sielèche, Nassarata Sylla, Bintou Coulibaly, Aminata Coulibaly, Aboubacar Franc Dembélé.

Chers ami(e)s JOSEPH DROZ a dit ceci « Un fidèle ami est un soutien précieux dans les jours difficiles ». Je ne me lasserai jamais de vous remercier pour vos encouragements et votre assistance morale. Ce travail est le vôtre. Recevez ici toute ma reconnaissance.

Aux internes

Modibo k Goïta, Amoro Traoré, Christine Ongoïba, Demba Samaké, Bintou Coulibaly.

Je vous remercie pour l'estime et le respect que vous avez manifesté à mon égard. Merci également pour vos conseils, vos encouragements et votre franche collaboration.

A toute l'équipe de Neurogénétique : Pr Guinto Cheick Oumar, Pr Mahamadou Traore, Pr Souleymane Coulibaly, Dr Guida Landouré, Dr Samassékou Oumar, Dr Seybou H Diallo, Dr Coulibaly Thomas, Dr Coulibaly Souleymane dit Papa, Dr Diallo Salimata, Dr Cissé Lassana, Dr Diarra Salimata, Dr. Taméga, Abdoulaye, Dr. Yalcouyé Abdoulaye, Dr. Bocoum Abdoulaye, Dr. Dembélé Mohamed Emile, Dr. Fousseyni Kané, Dr. Oumou Traoré, Dr Cheick O Sidibé, Salia Bamba, Kadidiatou Diallo, Issouf Ballo, Soumaila Niaré, Boubacar Karambé, Modibo Goita, Amoro Traoré, Demba Samaké, Christine Ongoiba, Bintou Coulibaly, Moussa Aly Sangaré, Aïssata Touré, Linda Fotsa, Samuel Ephrata Mefoung, Ibrahim Guindo, Mahamadou Kotioumbé.

A vos côtés, j'ai compris que tout seul on va vite mais ensemble on va plus loin. Avec vous j'ai su cultiver l'esprit d'équipe et le sens de la collaboration. Ces années passées à vos côtés ont été riches en enseignement. Je vous remercie infiniment.

A tout le personnel du service de neurologie CHU du Point G

A tout le personnel du service d'urologie CHU du Point G

A tout le personnel du service d'urologie CHU de Kati

A mes camarades de la 10^{ème} promotion du numerus clausus

Ce travail n'est que la somme de tant d'efforts durant ce long et dur trajet. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

A la Pharmacie Koulouba

Vous m'avez accueilli à bras ouvert, nourri, logé, protégé tout au long de mon cursus universitaire et vous avez supporté toutes mes humeurs sans jamais vous plaindre de moi.

Recevez ici l'expression de ma profonde gratitude.

A mes enseignants de l'école primaire « Ahmed Baba », du secondaire le lycée « Prosper Kamara » et de la FMOS

Ce travail est aussi le vôtre. Merci pour la qualité de l'enseignement reçu. Veuillez recevoir toute ma reconnaissance et ma gratitude.

A tous les personnels du CSREF CIII, de la Clinique « Kalalé », Clinique « Siramanan »

A tous mes patients, plus particulièrement à ceux inclus dans le protocole de recherche de H3Africa.

Qu'Allah Azawadjal vous donne la force et le courage nécessaire de continuer à vous battre et d'aller de l'avant. Sachez que tant qu'il y'a la vie, il y'a de l'espoir.

Enfin à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à ma formation et à la réalisation de ce présent document, je vous dis merci.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maitre et Président du jury

Pr. Boubacar TRAORE

- Professeur titulaire de Parasitologie- Mycologie
- Doyen de la faculté de pharmacie
- Responsable du laboratoire immunogénétique (LIG)
- Enseignant-chercheur

Cher maitre,

Vous nous faites honneur en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations, cela témoigne encore de l'intérêt que vous portez à notre formation.

Vous êtes pour nous, le modèle scientifique par excellence. Votre humanisme et votre empathie forcent le respect et l'admiration pour vos élèves que nous sommes. Cher maitre, permettez-nous de vous exprimer notre sincère et profonde gratitude.

Qu'Allah vous donne une longue vie. Amina !

A notre maître et juge

Pr. Cheick Bougadari TRAORE

- Professeur titulaire en Anatomie et Cytologie Pathologiques à la F.M.O.S.
- Chef de service du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU du Point G
- Chef de département d'enseignement de recherche (DER) des Sciences fondamentales à la F.M.O.S.
- Praticien Hospitalier au CHU du Point G
- Collaborateur sur le projet du dépistage du cancer du col de l'utérus et du registre national des cancers au Mali
- Président de la Société Malienne de Pathologie (S. M.P)

Cher Maître,

Nous sommes très sensibles de l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de siéger dans ce jury. Votre simplicité, votre souci de transmettre vos connaissances et votre rigueur scientifique font qu'il est agréable d'apprendre à vos côtés. Ce travail est surtout le vôtre. Nous gardons de vous l'image d'un grand maître dévoué et serviable. Qu'il nous soit permis de vous adresser nos sincères remerciements.

A notre Maître et Juge

Pr. Honoré Jean Gabriel BERTHE

- Maître de conférences en urologie à la FMOS
- Coordinateur du D.E.S d'urologie à la FMOS
- Praticien hospitalier au CHU du Point G
- Membre fondateur de l'AMU Mali
- Secrétaire général du bureau de l'AMU Mali

Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger dans ce jury

Nous vous remercions de votre disponibilité et votre esprit de collaboration, qui nous ont beaucoup marqué. Nous profitons de ce passage pour vous remercier pour le support matériel mis à notre disposition pour la réalisation de ce travail.

Vos qualités scientifiques incontestables font de vous un juge idéal pour ce travail auquel vous avez déjà beaucoup apporté.

Permettez-nous-en ce moment solennel de vous exprimer nos sincères remerciements.

A notre Maître et Co-directeur de Thèse

Dr. SAMASSEKOU Oumar

- Spécialiste en génétique médicale et pathologie moléculaire
- Maître-Assistant en génétique et génomique à la F.M.O.S.
- Membre fondateur de la Société Malienne de Génétique Humaine
- Membre de la Société Africaine de Génétique Humaine
- Membre du consortium Human Hereditary and Health in Africa (H3Africa)

Cher maître,

Vous nous avez toujours manifesté un attachement et une sympathie auxquels nous n'avons jamais su répondre en totalité. L'intégrité, l'assiduité, le courage, le sens élevé de la responsabilité, le souci du travail bien fait sont des qualités que vous incarnez et qui ont forcé notre admiration. Vous nous avez inculqué le savoir-faire et le savoir être. Votre simplicité, votre modestie, votre dynamisme, votre générosité envers les patients démunis, votre esprit d'équipe, votre attachement à la recherche scientifique font de vous un modèle à suivre pour nous la jeune génération.

Nous ne pourrions jamais vous remercier assez pour tout ce que vous avez fait pour nous. Nous avons appris à vos côtés ce que sont la rigueur scientifique et la détermination dans le travail.

Tout au long de votre enseignement nous avons été fascinés par votre sens élevé de la pédagogie mêlé à votre modestie pour rendre plus digeste ce que vous transmettez.

L'amabilité et la spontanéité avec lesquelles vous avez dirigé ce travail nous honorent.

Trouvez ici l'expression de nos remerciements les plus distingués.

A notre Maître et Directeur de Thèse

Pr. TRAORE Mahamadou

- Professeur honoraire de génétique à la Faculté de Pharmacie de l'USTTB
- Co-investigateur de l'étude sur les pathologies neurologiques héréditaires au Mali
- Président et membre fondateur de la Société Malienne de Génétique Humaine
- Membre du consortium Human Hereditary and Health in Africa (H3Africa)
- Membre de la Société Africaine de Génétique Humaine
- Membre de la Société Malienne de Neurosciences

Cher maître,

Dès nos premiers cours de génétique, votre particularité nous a séduit et a dès lors, suscité en nous le désir d'être compté parmi vos élèves. Grâce à la confiance que vous avez eue en nous en nous confiant ce travail, notre rêve s'est réalisé. Ceci nous a permis de comprendre auprès de vous, la délicatesse du geste et de la parole (Ethique) dans ce métier. En plus de l'enseignement scientifique remarquable reçu, vous avez fixé en nous, à jamais, quatre vertus qui nous paraissent indispensables à une vie socioprofessionnelle active et bien remplie : la persévérance, la conviction dans tout ce que l'on fait, la franchise et par-dessus tout, l'humilité. Tout au long de ce travail nous avons été émus par votre disponibilité, votre modestie, votre sens de responsabilité, votre gentillesse, votre patience, votre rigueur scientifique, vos qualités humaines et pédagogiques qui font de vous un modèle à suivre. A votre côté nous avons été à l'école de la vie et de la science. Vous nous avez enseigné tel qu'un père enseigne ses enfants sans oublier toute la générosité qui va avec.

Cher Maître, nous sommes fiers d'avoir été un de vos élèves et nous manifesterons le désir de continuer à demeurer auprès de vous pour apprendre la science.

Soyez rassuré, cher Maître de notre entière disponibilité et de notre profonde gratitude.

Qu'Allah vous garde encore longtemps auprès de nous et en bonne santé pour que nous puissions continuer à bénéficier de vos enseignements.

TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION.....	1
2	OBJECTIFS	3
2.1	Objectif général	3
2.2	Objectifs spécifiques.....	3
3	GENERALITES	4
3.1	Rappels anatomiques et physiologiques	4
3.2	Cancer de la vessie	5
3.2.1	Définitions	5
3.2.2	Épidémiologie	5
3.2.3	Facteurs de risque.....	7
3.2.4	Diagnostic.....	7
3.2.4.1	Circonstances de découverte	7
3.2.4.2	Clinique	7
3.2.4.3	Classification	8
3.2.4.4	Stadification :.....	9
3.2.4.5	Grade : La classification selon l'OMS 1973 vs 2016.....	10
3.2.5	Traitements :.....	11
3.2.5.1	Traitement pour les TVNIM.....	11
3.2.5.2	Traitement pour les TVIM.....	11
3.2.6	Évolution et Pronostic	12
3.3	L'instabilité génomique dans le cancer de la vessie.....	13
3.3.1	Phase précoce de la maladie.....	14
3.3.2	Phase progressive de la maladie.....	15
3.3.3	Phase invasive et métastatique de la maladie.....	15
3.4	Télomères	15
3.4.1	Définition	15
3.4.2	Structure	16
3.4.3	Fonction des télomères.....	19
3.4.4	La longueur des télomères.....	19
3.4.5	Organisation nucléaire des télomères.....	20

3.4.6	Télomères dans le cancer	20
3.4.7	Dysfonctionnement des télomères dans le cancer de vessie	21
3.4.8	Étude de l'organisation nucléaire des télomères	22
3.4.8.1	FISH quantitative en tri dimension.....	22
3.4.8.1.1	Définition :.....	22
3.4.8.1.2	But :.....	22
3.4.8.1.3	Principe :	23
3.4.8.1.4	Avantages et limites	23
3.4.8.1.5	Étapes	23
3.4.8.1.5.1	Échantillons	23
3.4.8.1.5.2	FISH 3D télomères	24
3.4.8.1.5.3	Microscopie en 3D	25
3.4.8.1.5.4	Analyse d'image :.....	27
3.4.8.2	Paramètres de l'organisation nucléaire des télomères :.....	28
3.4.8.2.1	Le nombre de télomères :.....	28
3.4.8.2.2	L'intensité des télomères :	28
3.4.8.2.3	Les agrégats télomériques :.....	28
3.4.8.2.4	La distribution nucléaire des télomères	29
3.4.8.2.5	La position des télomères.....	29
3.4.8.2.6	Le volume nucléaire.....	29
4	METHODOLOGIE	31
4.1	Cadre d'étude.....	31
4.2	Type et période de l'étude	31
4.3	Population d'étude.....	31
4.3.1	Critère d'inclusion.....	31
4.3.2	Critère de non inclusion :	31
4.4	Collecte des données	31
4.4.1	Les données cliniques.....	31
4.4.2	Considérations éthiques.....	32
4.4.3	Traitement des cellules urinaires.....	32
4.4.3.1	Recueil des urines	32
4.4.3.2	Fixation des cellules exfoliantes urothéliales :	32
4.4.3.3	Étalement	33
4.4.4	Protocole de la technique 3D-FISH télomère	33

4.4.4.1	Les solutions	33
4.4.4.2	Procédure	34
4.4.5	Acquisition d'images au microscope	35
4.4.6	Sélection des cellules	36
4.4.7	Traitement d'images	36
4.4.8	Analyse par TeloView™	36
4.5	Analyses statistiques	37
5	RESULTATS	41
5.1	Données Cliniques :	41
5.1.1	Sexe	41
5.1.2	Age	41
5.1.3	Motif de consultation	42
5.1.4	L'aspect macroscopique des urines	42
5.1.5	Types histologiques	43
5.1.6	Types histologiques et antécédents de schistosomiase :	43
5.1.7	Taux de survie des patients	44
5.2	Données sur la mise au point de la technique 3D FISH :	46
5.3	Données sur l'organisation nucléaire des télomères	52
5.3.1	Paramètres télomériques	52
	Tableau X : Répartition des paramètres télomériques des patients pris globalement en fonction du type cellulaire	52
5.3.2	Nombre de signaux télomériques	53
5.3.3	Intensité des signaux télomériques	54
5.3.4	Nombre d'agrégats télomériques	55
5.3.5	Indice de distribution nucléaire des télomères :	56
5.3.6	Distance des télomères à partir du centre du noyau	57
5.3.7	Volume nucléaire :	58
5.3.8	Hétérogénéité cellulaire	59
	59
5.4	Corrélation entre les données cliniques et télogénomiques	61
5.4.1	Description clinique et télogénomique des patients	61
5.4.2	Résumé des données cliniques et télogénomique des patients	109
6	COMMENTAIRES ET DISCUSSION	112

7	CONCLUSION	116
8	RECOMMANDATIONS	117
9	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	118
10	ANNEXES.....	154

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Classification TNM	10
Tableau II: Répartition des patients en fonction du sexe.	41
Tableau III: Répartition des patients en fonction de l'aspect macroscopique des urines.	42
Tableau IV: Répartition des patients en fonction du type histologique et l'antécédent de schistosomiase.	43
Tableau V: Probabilité de décès.	45
Tableau VI: Degré de digestion nucléaire en fonction de la concentration et du temps de traitement par la pepsine.	46
Tableau VII: Qualité de l'hybridation en fonction de la température et du temps d'hybridation avec la sonde télomérique.	47
Tableau VIII: Rapport intensité du signal télomérique sur bruit de fond en fonction de la température et du temps de lavage de la solution de lavage 1X.	48
Tableau IX: Caractéristiques de l'imagerie cellulaire	49
Tableau X : Répartition des paramètres télomériques des patients pris globalement en fonction du type cellulaire.	52
Tableau XI: Répartition des paramètres télomériques de P1 en fonction du type cellulaire..	64
Tableau XII: Répartition des paramètres télomériques de P2 en fonction du type cellulaire.	70
Tableau XIII: Répartition des paramètres télomériques de P3 en fonction du type cellulaire.	75
Tableau XIV: Répartition des paramètres télomériques de P4 en fonction du type cellulaire.	79
Tableau XV: Répartition des paramètres télomériques de P5 en fonction des 2 catégories de cellules.....	84

Tableau XVI: Répartition des paramètres télomériques de P6 en fonction du type cellulaire.	88
Tableau XVII: Répartition des paramètres télomériques de P7 en fonction du type cellulaire.	92
Tableau XVIII: Répartition des paramètres télomériques de P8 en fonction du type cellulaire.	97
Tableau XIX: Répartition des paramètres télomériques de P9 en fonction du type cellulaire.	102
Tableau XX : Répartition des paramètres télomériques de P10 en fonction du type cellulaire.	106
Tableau XXI : Résumé des données cliniques des patients.....	109
Tableau XXII: Comparaison entre les paramètres de l'organisation nucléaire des télomères des cellules normales et ceux des cellules cancéreuses.....	110

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de la vessie.	4
Figure 2: Différentes couches tissulaires de la vessie.	5
Figure 3: Classification selon l'OMS 1973 vs 2016.....	11
Figure 4: Instabilité chromosomique numérique et structurale.....	14
Figure 5: Représentation des différents chromosomes et leurs télomères.	15
Figure 6: Représentation de l'ADN télomérique d'un vertébré.	16
Figure 7: Boucles et protéines télomériques.	17
Figure 8: Chromatine télomérique.	18
Figure 9: Organisation 3D nucléaire des télomères.	20
Figure 10 : Représentation des plans focaux.....	27
Figure 11: Territoire télomérique dans le noyau.....	29
Figure 12: Paramètres de l'organisation nucléaire des télomères.....	30
Figure 13: Représentation schématique de la méthode statistique pour calculer l'index d'hétérogénéité cellulaire.....	40
Figure 14: Répartition des patients en fonction de l'âge.....	41
Figure 15: Répartition des patients en fonction du motif de consultation	42
Figure 16: Répartition des patients en fonction du type histologique.....	43
Figure 17: Diagramme de Kaplan Meier.	44
Figure 18: Image microscope à l'objectif 10X.	50
Figure 19: Image microscopique à l'objectif 40X.	51
Figure 20: Représentation du nombre des signaux télomériques par le diagramme de boîte à moustaches.	53
Figure 21: Représentation de l'intensité des signaux télomériques par le diagramme de boîte à moustaches.	54

Figure 22: Représentation du nombre médian d'agrégats télomériques par cellule par le diagramme en Barres.....	55
Figure 23: Représentation de l'indice de distribution nucléaire des télomères par le diagramme en Barres.....	56
Figure 24: Représentation de la relative distance des télomères à partir du centre nucléaire par le diagramme en Barres.....	57
Figure 25: : Représentation du volume nucléaire par le diagramme en Barres.....	58
Figure 26 : Diagramme de dispersion cellulaire.....	59
Figure 27 : Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P1.....	62
Figure 28 : Diagramme de dispersion cellulaire.....	65
Figure 29 : Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P2.....	68
Figure 30: Diagramme de dispersion cellulaire.....	71
Figure 31 : Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P3.....	73
Figure 32 : Diagramme de dispersion cellulaire.....	76
Figure 33: Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P4.....	78
Figure 34: Diagramme de dispersion cellulaire.....	80
Figure 35: Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P5.....	82
Figure 36 : Diagramme de dispersion cellulaire.....	85
Figure 37: Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P6.....	87
Figure 38 : Diagramme de dispersion cellulaire.....	89
Figure 39: Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P7.....	91
Figure 40: Diagramme de dispersion cellulaire.....	93
Figure 41 : Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P8.....	95
Figure 42: Diagramme de dispersion cellulaire.....	98
Figure 43 : Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P9.....	100

Figure 44: Diagramme de dispersion cellulaire.	103
Figure 45: Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P10.	105
Figure 46: Diagramme de dispersion cellulaire.	107
Figure 47: Résumé des paramètres télomériques des patients	111

LISTE DES ABREVIATIONS

°C : degré Celsius

µL : Microlitre

µm³ : Micromètre cube

2D : Di-dimensionnelle

3D : Tri-dimensionnelle

AFU : Association Française d'Urologie

AT : Agrégat télomérique

ATCD : Antécédent

C : Cytidine

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

Cy3 : Teinture de cyanure 3

DAPI: 4',6'-diamidino-2-phénylindole

G: Guanine

g: gramme

G0 : Période G0 du cycle cellulaire

G1 : Période G1 du cycle cellulaire

G2 : Période G2 du cycle cellulaire

gr : gravité

H₂O : Eau distillée

IC : Instabilité chromosomique

IH : Index d'hétérogénéité

IRM : Image à Résonance Magnétique

Kb : Kilobase

mL : Millilitre

mm : millimètre

nm : nanomètre

PBS : Phosphate Buffer Saline

PNA : Acide Nucléique Peptidique

POT1 : Homologue 1 de la protection des télomères

RB : Rétinoblastome

RTUV : Résection Transurétrale de la vessie

SD : Déviation standard

T : Tumeur

TBS : Tris Buffer Saline

TDM : Tomodensitométrie

TERF1 : Facteur 1 de liaison aux répétitions télomériques

TERF2 : Facteur 2 de liaison aux répétitions télomériques

TIN2 : Facteur 2 d'interaction nucléaire de TERF-1

Tis : Tumeur in Situ

TPPI : Protéine du gène de l'ACD (adrenocortical dysplasia)

TVIM : Tumeur de vessie infiltrant le muscle

TVNIM : Tumeur de vessie non infiltrant le muscle

UIV : Urographie intraveineuse

1 INTRODUCTION

Le cancer est dû à une transformation de cellules ayant la capacité de proliférer excessivement. Ces cellules dérégées finissent parfois par former une masse qui a la potentialité de se métastaser à différentes parties du corps humain. En outre, ces cellules ont la caractéristique d'être une population hétérogène présentant un génome remanié ou des caryotypes complexes (1). Les décisions thérapeutiques pour les patients cancéreux reposent principalement sur des paramètres cliniques et pathologiques. Certains de ces paramètres pathologiques tels que la taille de la tumeur, le type histologique, le grade tumoral, et les données sur la constitution moléculaire de la tumeur permettent de déterminer le pronostic et de planifier les stratégies thérapeutiques (chirurgie, chimiothérapie, thérapie ciblée etc.) (2).

L'instabilité génomique est une des caractéristiques des cellules tumorales. Elle est reconnue comme une source de variation génétique, favorisant l'adaptation tumorale à un nouvel environnement (3). En effet, l'instabilité génomique est la cause fondamentale de la progression tumorale et son évaluation procure des indices probants pour déterminer la nature génomique ou biologique de la tumeur. La détermination de l'organisation nucléaire des télomères est une approche très précise dans l'évaluation de l'instabilité génomique des cellules tumorales à partir des préparations pathologiques. L'altération de l'organisation nucléaire des télomères a été démontrée comme facteurs de pronostic ou même de réponse thérapeutique dans plusieurs pathologies cancéreuses (4-7).

Le cancer de la vessie est le cancer d'origine urologique le plus fréquemment diagnostiqué dans les centres hospitaliers au Mali et présente un des pires pronostics de tous les cancers. Un dépistage rapide et l'utilisation de biomarqueurs de pronostic pourraient améliorer la survie des patients atteints de ce cancer. Bien que des avancées majeures ont été réalisées dans la compréhension génomique du cancer de la vessie, des biomarqueurs en font défaut comme

indicateurs de pronostic ou de réponse thérapeutique. Il est donc nécessaire d'explorer des approches génomiques innovantes telles que l'évaluation de l'organisation nucléaire des télomères pour trouver des biomarqueurs de pronostic dans le cancer de la vessie. Cette étude nous permettra d'évaluer pour la première fois l'organisation nucléaire des télomères dans le cancer de la vessie et de décrire les caractéristiques de cette organisation qui pourraient être utilisées comme éléments de pronostic dans ce cancer.

2 OBJECTIFS

2.1 Objectif général

Étudier l'organisation nucléaire des télomères dans les cellules circulantes urinaires des patients souffrant du cancer de la vessie

2.2 Objectifs spécifiques

- Décrire les caractéristiques cliniques du cancer de la vessie
- Faire la mise au point de la technique 3D-FISH télomère sur des cellules circulantes urinaires dans le cancer de la vessie
- Évaluer les paramètres de l'organisation nucléaire des télomères des cellules normales et cancéreuses
- Corréler les données cliniques à celles de l'organisation nucléaire des télomères

3 GENERALITES

3.1 Rappels anatomiques et physiologiques

La vessie est un lieu de stockage provisoire des urines, située dans la cavité pelvienne (derrière le pubis). Chez l'homme, elle est située au-dessus du plancher pelvien et de la prostate, en avant et au-dessus du rectum et des vésicules séminales. Chez la femme, elle est placée au-dessus du plancher pelvien et en avant de l'utérus et du vagin (8) (Figure 1).

La vessie est constituée de 4 tuniques : l'urothélium, le tissu conjonctif, le muscle lisse appelé muscle détrusor et la couche graisseuse (Figure 2). Au niveau de la jonction entre l'urètre et la vessie, ce muscle forme le sphincter interne de l'urètre et le sphincter externe de l'urètre.

Elle a une fonction de réservoir et d'évacuation. C'est une poche rétractile, plus ou moins sphérique. La capacité normale de la vessie est d'environ 300 millilitres et sa capacité maximale est de l'ordre de 2 litres. Vue sa fonction de réservoir et d'évacuation de l'urine, la vessie est permanemment en contact avec les agents toxiques et infectieux qui peuvent entrainer des pathologies inflammatoires, infectieuses ou tumorales.

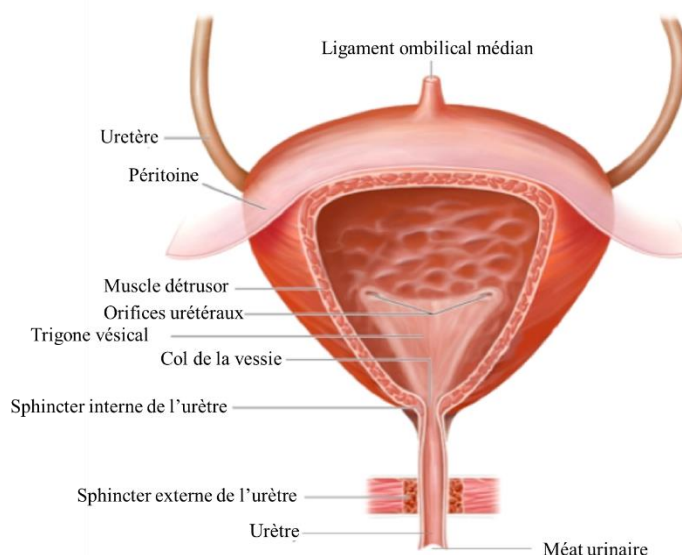


Figure 1 : Structure de la vessie.

Cette figure a été adaptée à partir de l'image se trouvant sur la page web :

<https://quizlet.com/450813591/structure-de-la-vessie-diagram/>

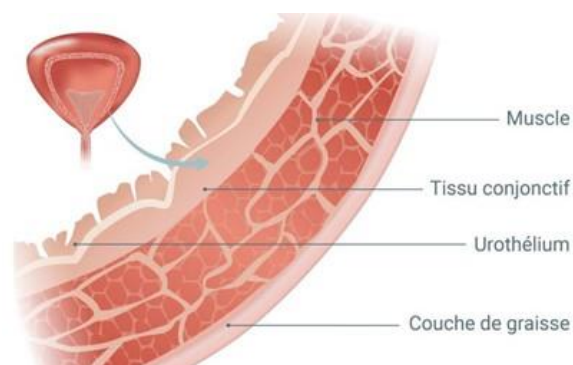


Figure 2: Différentes couches tissulaires de la vessie.

Cette figure a été tirée de la page web ayant la référence : (9).

3.2 Cancer de la vessie

3.2.1 Définitions

➤ La vessie est un réservoir musculo-muqueux située en position retro péritonéale dans lequel l'urine qui s'écoule par les uretères s'accumule et séjourne entre les mictions (8).

➤ Le cancer est une croissance anormale de cellules qui est due à de multiples changements dans l'expression des gènes conduisant à une rupture de l'équilibre entre la prolifération cellulaire et la mort cellulaire. Ce phénomène entraîne la formation d'une population de cellules qui peuvent envahir des tissus voisins et se métastaser à des sites éloignés, causant une morbidité et, en l'absence de traitement, le décès du patient (10,11).

Ainsi, nous pouvons définir le cancer de la vessie comme étant une néoformation tissulaire maligne développée aux dépens des tuniques constitutives de la vessie. C'est une tumeur solide.

3.2.2 Épidémiologie

Une tumeur de la vessie est diagnostiquée ou traitée chez 2,7 millions de personnes chaque année dans le monde et apparaît dans la plupart des cas après 60 ans (12,13) .

Le cancer de la vessie représente le deuxième cancer urologique après celui de la prostate (14) et occupe 10^{ème} rang de cancer le plus fréquent avec 1.650.000 cas dans le monde (approximativement 1 300 000 d'hommes et 350 000 femmes) (15). Les taux d'incidence et de mortalité sont respectivement de 9,6% et 3,2% pour 100.000 hommes, et le sexe ratio homme/femme est estimé à 4:1 (16,17).

Au plan mondial, en 2018, 549.000 nouveaux cas de cancer de la vessie ont été diagnostiqués

avec 200 000 cas de décès. Les taux d'incidence les plus élevés se trouvent en Europe, en Amérique du Nord et en Afrique du Nord (15).

En 2018, la France a enregistré environ 13 100 nouveaux cas de cancer de la vessie dont 80% étaient de sexe masculin (18). Il occupait la 4^{ème} place en termes d'incidence et le 7^{ème} des décès de tous les cancers confondus.

Aux USA en 2018, il a été enregistré environ 81 190 nouveaux cas de cancer de vessie pour les deux sexes confondus (62 380 chez les hommes et 18 810 chez les femmes). Le nombre de décès était estimé à 17 240 cas soit 12 520 cas chez les sujets de sexe masculin et 4 720 cas chez les sujets de sexe féminin (13).

En Afrique, selon GLOBOCAN, la prévalence du cancer de la vessie en 2018 était estimée à 4% des cancers avec 28 954 nouveaux cas et 16 464 cas de décès (15). Le carcinome à cellule transitionnelle représente plus de 90% des cancers de vessie dans les pays occidentaux contrairement aux pays d'Afrique de l'est et du Moyen Orient où le carcinome épidermoïde est plus représenté avec une fréquence entre 66 à 77% (19).

D'après une étude de méta-analyse du cancer de la vessie en Afrique, l'incidence cumulée serait 7,0 pour 100 000 chez les hommes et 1,8 pour 100 000 chez les femmes (20). Également, l'incidence était plus élevée en Afrique du Nord dans les deux sexes comparativement à l'Afrique sub-saharienne (20). Selon toujours cette même étude, le taux d'incidence en Afrique a significativement augmenté chez les hommes de 5,6 pour 100 000 (1990) à 8,5 pour 100 000 (2010) (20).

Selon le registre du cancer au Mali datant de 2010, le cancer de la vessie était le 3^{ème} cancer chez l'homme, le 5^{ème} chez la femme et le 5^{ème} pour les deux sexes (21).

Au Mali en 2014, sur un total de 2000 cas de cancer tous confondus chez les hommes, ceux de la vessie représentaient 262 cas, soit un taux de 13,1% selon l'OMS (22). Le cancer de la vessie était en 2015 la 3^{ème} cause d'hospitalisation après l'adénome de la prostate et la lithiase urinaire dans le service d'urologie du CHU du Point G (23). De janvier 2015 à décembre 2016, une étude menée par Badiaga et al. a trouvé parmi **1343** patients hospitalisés dans le service d'urologie du CHU du Point G, **185** patients (102 Hommes et 83 Femmes) présentaient une tumeur de vessie soit un taux de 14% (24). Le séjour hospitalier des patients a varié de 06 jours à 02 mois et durant ce séjour 62 décès soit 34% de l'effectif ont été enregistrés. Le taux actuel de cancer de la vessie est sous-estimé dans les pays en développement dont le Mali en raison de la faible couverture sanitaire, de l'analphabétisme, du contexte socioculturel et de la pauvreté. Toutefois, selon Globocan 2020, il s'agissait du 6^{ème} cancer parmi les autres cancers

en termes d'incidence (703 nouveaux cas soit un taux de 5,0%), de prévalence (1048 cas soit un taux de 5,18%), et de mortalité (426 décès soit un taux de 4,2%).

3.2.3 Facteurs de risque

Certains facteurs de risque sont associés au développement du cancer de la vessie. Les plus courants sont entre autres : l'infection à Schistosomiase, le style de vie comme le tabagisme (25,26), l'âge, le sexe (27), la susceptibilité génétique (ATCD familial) (28,29) et certains nutriments (26). Les amines aromatiques, l'exposition aux produits chimiques, les métiers à risque (peintre, travailleurs de l'industrie chimique, mécaniciens d'auto, chauffeur de camion, ou coiffeurs) sont aussi incriminés (29). Les autres facteurs de risque sont : les infections du tractus urinaire, le diabète, et certains médicaments (29).

3.2.4 Diagnostic

Il est basé sur l'interrogatoire, l'examen clinique et les examens complémentaires.

3.2.4.1 Circonstances de découverte

L'hématurie macroscopique, classiquement terminale, constitue le signe clinique le plus fréquent (11). Dans 4 à 20% des cas, on retrouve des signes d'irritation vésicale tels que la pollakiurie, l'impériosité urinaire, ou des brûlures mictionnelles. En absence d'infection urinaire, un carcinome vésical pourrait être suspecté en présence de ces symptômes.

Une tumeur de la vessie peut également être découverte de façon fortuite lors d'un examen d'imagerie (échographie, UIV, TDM), ou au cours d'exploration endoscopique portant sur la vessie (lithiase vésicale par exemple).

Enfin, une tumeur vésicale peut se révéler lors des manifestations métastatiques ou d'envahissement locorégional.

3.2.4.2 Clinique

➤ Interrogatoire :

Elle précise l'âge du patient, son adresse, sa profession, son habitude de vie (tabagisme, alcoolisme etc.), ses antécédents de pathologies urologiques.

Elle recherchera également :

-Des signes d'irritation vésicale comme la pollakiurie nocturne ou diurne, isolée ou associée à des brûlures mictionnelles, la dysurie voire la rétention d'urine par caillottage ou par infiltration de la base vésicale par la tumeur.

-Des signes de complication tumorale qui peuvent être des douleurs hypogastriques, lombaires, anales ou des coliques néphrétiques causées par obstruction des méats urétéraux.

➤ Examen physique :

Il est peu contributif en cas de tumeur de vessie non infiltrant le muscle (TVNIM). Dans la majorité des cas, les patients ne présentent qu'une hématurie isolée ou associée à des signes irritatifs.

En cas de tumeur infiltrant le muscle (TVIM), peuvent apparaître des signes d'extension locorégional ou à distance qui doivent être recherchés systématiquement par un examen clinique général et urologique complet.

Les touchers pelviens (toucher rectal chez l'homme et toucher vaginal chez la femme) sont systématiques.

Ils recherchent une infiltration du plancher pelvien, surtout lorsque la tumeur est de siège trigonal avec un envahissement locorégional important.

Le reste de l'examen recherchera un globe vésical (sur caillots sanguins), un contact lombaire (hydronéphrose obstructive), ou des signes de métastases (nodules hépatiques, ganglions, œdèmes des membres inférieurs).

➤ **Examens paracliniques**

La cystoscopie est considérée comme l'« Étalon d'or » dans le diagnostic initial du cancer de la vessie (27). La cystoscopie doit décrire toutes les caractéristiques macroscopiques de la tumeur (site, taille, nombre et apparence) et les anomalies de la muqueuse (29). L'échographie, la UroTDM et l'IRM sont d'importance capitale pour le bilan d'extension et assurer une meilleure prise en charge. Le diagnostic définitif est basé sur la cytologie et/ou l'examen anatomopathologique.

3.2.4.3 Classification

Il existe deux types de tumeurs de la vessie par rapport au degré d'infiltration du muscle « le détrusor ». Ainsi, on a les tumeurs de vessie n'infiltrant pas le muscle (stade Ta à T1) portant la dénomination TVNIM. Ce sont des tumeurs de stade précoce impliquant seulement la paroi interne de la vessie (29). Alors que celles avec infiltration tumorale du détrusor sont appelées TVIM. Le terme tumeur superficielle de vessie ne doit plus être employé selon les recommandations françaises du comité de cancérologie de l'AFU (30).

Il existe plusieurs types histologiques de tumeurs de la vessie. Elles sont entre autres :

- Le carcinome urothélial, aussi appelé carcinome transitionnel, qui représente plus de 90 % de tous les cancers de la vessie (31).
- Le carcinome épidermoïde (4 à 6 %) (32), associé souvent à une inflammation ou à une infection urinaire chronique.
- L'adénocarcinome de la vessie qui représente 0,5 à 2% de tous les cancers de la vessie (33).

- Le carcinome à petites cellules de la vessie (< 0,5 %), sarcome des tissus mous de la vessie (< 0,1%) etc. (33).

Par contre au Mali, un pays endémique de la schistosomiase, le carcinome épidermoïde occupe la première place des types histologiques avec 74-80% (21,34). Le carcinome urothélial arrive en 2^{ème} position avec 15-20% (21,34). Cette tendance est observée dans les régions où la bilharziose est endémique.

3.2.4.4 Stadification :

1. Le stade d'une tumeur fait référence au degré d'envahissement du muscle de l'organe en question par la tumeur. Bien que le stade Tis (stade plus précoce) ne se soit pas répandu dans les couches plus profondes de la vessie, il a le potentiel de le faire et peut devenir particulièrement agressif s'il n'est pas traité(28).

Tableau I: Classification TNM (30)

Stade T	Description	Dénomination
pTa	Tumeur papillaire de grade variable sans infiltration de la lamina propria	
pTis	Tumeur plane de haut grade sans infiltration - carcinome in situ	TVNIM
pT1	Tumeur papillaire de grade variable avec infiltration de la lamina propria mais sans infiltration du muscle	
pT2	Tumeur envahissant la musculature	
pT2a	Tumeur envahissant la musculature superficielle (moitié interne)	
pT2b	Tumeur envahissant la musculature profonde (moitié externe)	
pT3	Tumeur envahissant le tissu péri-vésical	
pT3a	Atteinte microscopique	
pT3b	Atteinte macroscopique (masse extra-vésicale)	TVIM
pT4	Tumeur envahissant l'une ou l'autre des structures suivantes : prostate, vésicule séminale, utérus, vagin, paroi pelvienne ou paroi abdominale	
pT4a	Prostate, vésicules séminales, vagin ou utérus	
pT4b	Paroi pelvienne ou paroi abdominale	

N: ganglions lymphatiques régionaux; Nx: renseignements insuffisants pour classer l'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux;

N0: pas d'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux;

N1: atteinte d'un seul ganglion lymphatique pelvien (hypogastrique, obturateur, iliaque externe ou pré-sacré); N2: atteinte de multiples ganglions lymphatiques pelviens (hypogastrique, obturateur, iliaque externe ou pré-sacré);

N3: atteinte d'un (ou plusieurs) ganglion(s) lymphatique(s) iliaque(s) primitif(s);

M: métastase à distance; M0: absence de métastase à distance; M1: métastase(s) à distance

3.2.4.5 Grade : La classification selon l'OMS 1973 vs 2016

Le grade d'une tumeur est le degré de différenciation des cellules tumorales par rapport aux cellules normales présentes dans cette tumeur. Moins les cellules sont différenciées, plus la tumeur est agressive. La classification de l'OMS qui catégorisait seulement en tumeurs de G1, G2 et G3 a été davantage stratifiée en tumeur de faible potentiel de malignité, de bas grade et haut grade comme indiqué par la représentation schématique ci-dessous (30).

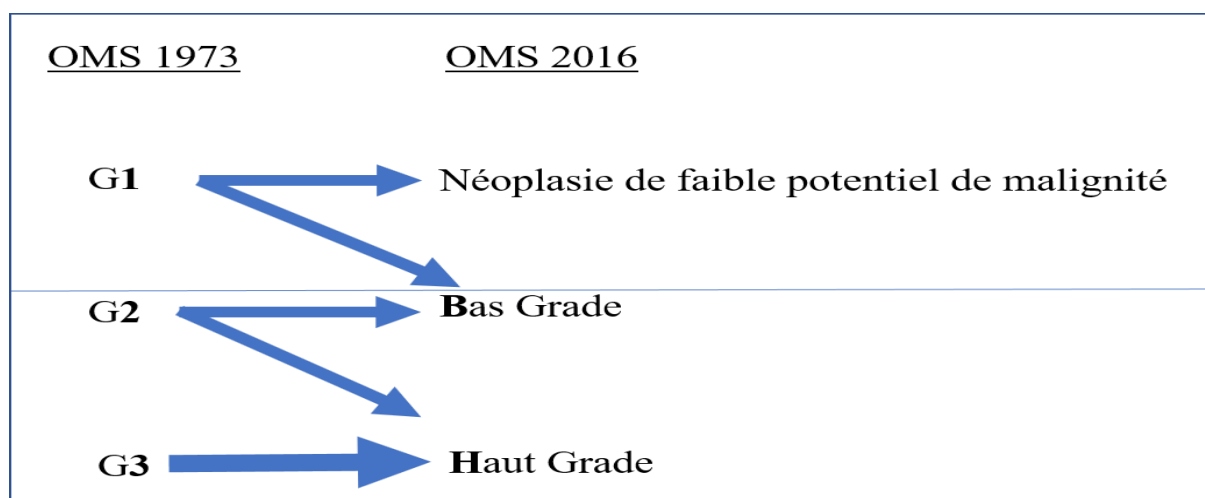


Figure 3: Classification selon l'OMS 1973 vs 2016

Cette figure a été adaptée à partir de la référence (30).

3.2.5 Traitements :

La prise en charge de la tumeur de la vessie est pluridisciplinaire. Les décisions thérapeutiques tiennent compte du degré de malignité de la tumeur (le type histologique, le stade et le grade).

3.2.5.1 Traitement pour les TVNIM

Dans la gestion du cancer de la vessie, les principaux objectifs du traitement sont :

- Traiter définitivement les tumeurs superficielles avec une RTUV ;
- Prévenir la récurrence de la maladie ou sa progression à un stade plus avancé ;
- Éviter la perte de la vessie ;
- Améliorer la qualité de vie et la survie.

Les TVNIM (stades Ta-T1 et Tis) est géré avec une combinaison de chirurgie (RTUV), chimiothérapie et immunothérapie intra vésicale (29).

3.2.5.2 Traitement pour les TVIM

Les deux principaux choix de traitement de la TVIM (stade T2 à T3 et Tis) sont la cystectomie radicale (ablation complète de la vessie) ou la RTUV, associés à la radiothérapie concomitante et la chimiothérapie systémique (thérapie multimodale) (28). Le but du traitement multimodal est de préserver la vessie et améliorer la qualité de vie du patient (28).

3.2.6 Évolution et Pronostic

Le cancer de la vessie peut évoluer rapidement. Cependant, s'il est diagnostiqué et traité à un stade précoce, il y a de fortes chances de guérison et de meilleurs résultats pour les patients.

Sans aucun traitement, environ 54% des patients au stade Tis progressent vers une TVIM (29). Cependant, jusqu'à 20% des patients initialement diagnostiqués avec Tis, peuvent avoir une invasion non reconnue au-delà de la lamina propria, et ne pas répondre au traitement intra vésical (35).

La cystectomie réalisée avant la progression (TVNIM) donne un taux de survie de 90% à 5 ans et 30 à 50% des cas évoluent vers la maladie musculaire invasive. Bien que la plupart des cas TVNIM ne mettent pas la vie en danger, il existe un taux de récurrence à 3 ans allant jusqu'à 70% et environ 15 à 30% de progression vers le stade invasif, en particulier chez les fumeurs (28,35). La TVNIM à haut risque est couramment traitée par le Bacille Calmette Guérin (BCG) intra vésical, mais ce traitement échoue chez environ 50% des patients après 5 ans. La chimio-hyperthermie (CHT) entraîne une survie spécifique de la maladie à 5 ans comparable à celle de la cystectomie radicale dans le traitement de certains patients atteints de TVNIM à haut risque après l'échec du BCG (36).

Chez les patients avec une TVNIM et ayant subi une cystectomie radicale, le taux de survie à 5 ans sans symptômes dépasse 80% (29). Le bénéfice potentiel d'une cystectomie radicale doit être mis en balance avec les risques notamment un taux de mortalité de 1 à 3%, un taux de complications supérieures à 30%, la morbidité associée à la perte de vessie (l'impact sur la qualité de vie), l'image corporelle (l'impact d'une stomie), et la fonction sexuelle et urinaire, en particulier chez le patient plus jeune (29,37). Il faut également tenir compte des facteurs qui affectent le bien être du patient (les comorbidités notamment l'insuffisance rénale, le diabète et les problèmes cardiaques). L'évaluation de l'état de santé du patient pour la chirurgie radicale est impérative pour prédire des résultats de santé favorables (29).

Bien que les hommes soient plus susceptibles de développer un cancer de la vessie que les femmes, le diagnostic chez elles se fait à un stade plus avancé avec un taux de survie plus bas (28).

Le traitement de référence pour les TVIM est la cystectomie radicale qui ne fournit que 5 ans de survie chez environ 50% des patients. La chimiothérapie en néo-adjuvant et en adjuvant associée à radiothérapie sont très fortement recommandées surtout lorsqu'il y a des métastases, présentes chez 10 à 15% des patients au moment du diagnostic (37). Le taux de survie à 5 ans pour les patients atteints d'un cancer métastatique de la vessie est de 10% (27).

La prise en charge des malades souffrant de cancer de la vessie pose d'énormes difficultés. La base moléculaire du processus néoplasique du cancer de la vessie est encore mal comprise. Une bonne compréhension de cette base moléculaire à travers l'étude des caractéristiques essentielles à la carcinogenèse comme l'instabilité génomique aiderait à mieux comprendre cette pathologie et d'en dégager de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques afin de réduire la mortalité et la morbidité de ce cancer.

3.3 L'instabilité génomique dans le cancer de la vessie

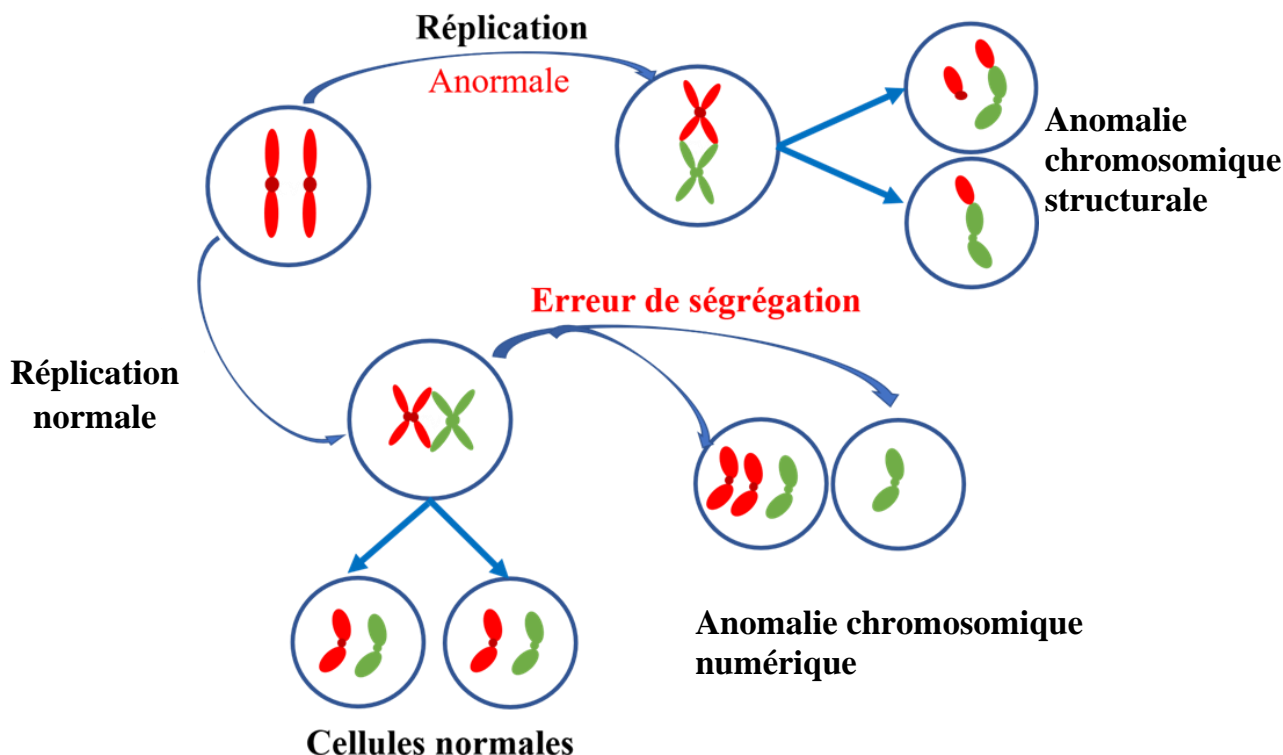
L'instabilité génomique est définie comme étant un remaniement dynamique du génome. Cette instabilité se retrouve le plus souvent au niveau chromosomique (instabilité chromosomique) qu'au niveau des nucléotides (instabilités des microsatellites) dans le cancer de la vessie (38). Étant donné que l'instabilité génomique est un processus dynamique qui se définit dans le temps, il est souvent difficile de l'évaluer chez un patient à un instant précis c'est-à-dire au moment du diagnostic. Néanmoins, la signature génomique des cellules cancéreuses d'une tumeur peut permettre d'évaluer l'hétérogénéité tumorale et par conséquent l'instabilité génomique (39–41).

La dynamique évolutive des anomalies chromosomiques et l'altération de l'organisation nucléaire des télomères sont parmi les processus pathologiques les plus associés à l'instabilité génomique (41). Dans ce présent travail, nous étudierons l'altération de l'organisation nucléaire des télomères dans le cancer de la vessie, mais avant nous ferons un rappel sur les principales anomalies chromosomiques observées dans ce cancer.

Le cancer de la vessie est caractérisé par des anomalies chromosomiques récurrentes qui peuvent être utilisées comme biomarqueurs pour la détection précoce de cette pathologie. En effet, le panel de consensus international sur les marqueurs des tumeurs de la vessie recommande le test d'hybridation *in situ* en fluorescence multicolore pour quantifier le nombre de copies des chromosomes 3, 7 et 17, et du locus 9p21 dans les cellules urothéliales exfoliées.

Ce test a été approuvé par l'agence américaine des médicaments (FDA) en tant que test de diagnostic du cancer de la vessie (42).

Figure 4: Instabilité chromosomique numérique et structurale.



Cette figurée a été adaptée de la référence (43). L'instabilité chromosomique numérique et structurale survient lors d'erreurs de ségrégation chromosomique mitotique. Une duplication ou une ségrégation chromosomique dysfonctionnelle au cours de la mitose peut conduire à des gains ou des pertes de chromosomes (instabilité chromosomique numérique) et/ou aux altérations de la structure des chromosomes (instabilité chromosomique structurale). Ces altérations de structures peuvent entraîner des translocations, les délétions, des inversions chromosomiques. Les altérations numériques et structurales des chromosomes prédisposent à d'autres anomalies chromosomiques ultérieures en augmentant ainsi l'instabilité chromosomique. L'instabilité chromosomique est un concept induit par l'aneuploïdie (44).

3.3.1 Phase précoce de la maladie

La perte du chromosome 9 est l'anomalie chromosomique la plus observées au cours de l'évolution du cancer de la vessie et c'est la seule anomalie chromosomique identifiée aux stades (T0 et T1) précoces de la tumeur (45). Il a été indiqué que la perte totale du chromosome 9 représente un événement initiateur dans la formation de tumeurs de la vessie. En effet, la délétion du chromosome 9 entraînent la perte des gènes qui régulent l'expression des gènes

RBI et *TP53* qui sont connus pour leur rôle essentiel dans le maintien de la stabilité du génome en tant que gènes suppresseurs de tumeurs (45).

3.3.2 Phase progressive de la maladie

Durant cette phase, plusieurs études ont observé la délétion du chromosome 8 notamment la région 8p21–22 dans 25–50% des cas de cancer de la vessie (45–47) et cette délétion ont été significativement corrélées à la progression du cancer (47,48).

3.3.3 Phase invasive et métastatique de la maladie

La délétion du bras chromosomique 3p a été associée à des tumeurs invasives et on la retrouve dans environ 25% des cas de cancer de la vessie (49,50). La perte d'autres chromosomes, concomitamment à la perte du chromosome 9, ont été observée (45). Par exemple, la perte du chromosome 17 observée dans 60% des cas de cancer de la vessie et a été associée à un stade avancé de la maladie (45). La délétion du bras chromosomique 3p ainsi que celle du chromosome 17 ont été associée à un stade avancé de la maladie (49,50).

3.4 Télomères

3.4.1 Définition

Les télomères humains constituent les extrémités des chromosomes et sont formés d'un complexe nucléoprotéine (Figure 5).

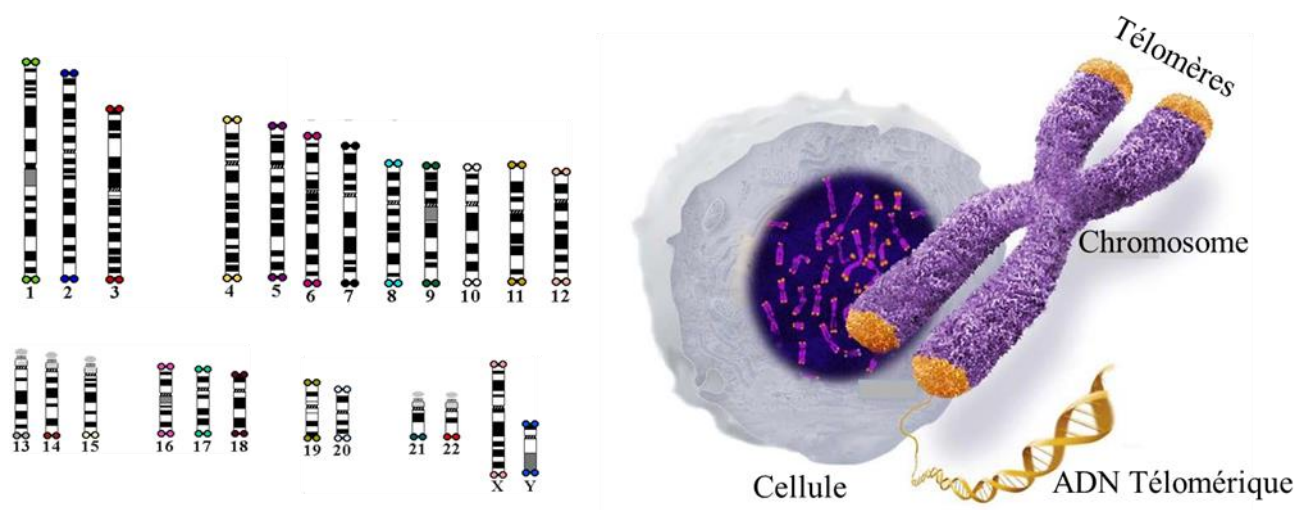


Figure 5: Représentation des différents chromosomes et leurs télomères.

Cette figure a été adaptée de l'image sur la page web de :

<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2009/illustrated-information/>

3.4.2 Structure

La structure des télomères est formée de l'ADN télomérique, des protéines spécifiques aux télomères, de l'hétérochromatine télomérique, de nucléosomes télomériques, de l'ARN télomérique et des protéines associées.

➤ La structure de l'ADN télomérique est constituée d'une répétition 5'-TTAGGG-3' dont l'extrémité 3', riche en guanines, se termine par une extension simple brin (Figure 6). Cette extension s'incruste entre le double brin télomérique avec lequel elle forme la courbure télomérique, appelée la boucle-t. Ainsi, cette boucle protège l'extrémité des télomères pour qu'elle ne soit pas reconnue comme des cassures mono ou bicaténares d'ADN (51,52).

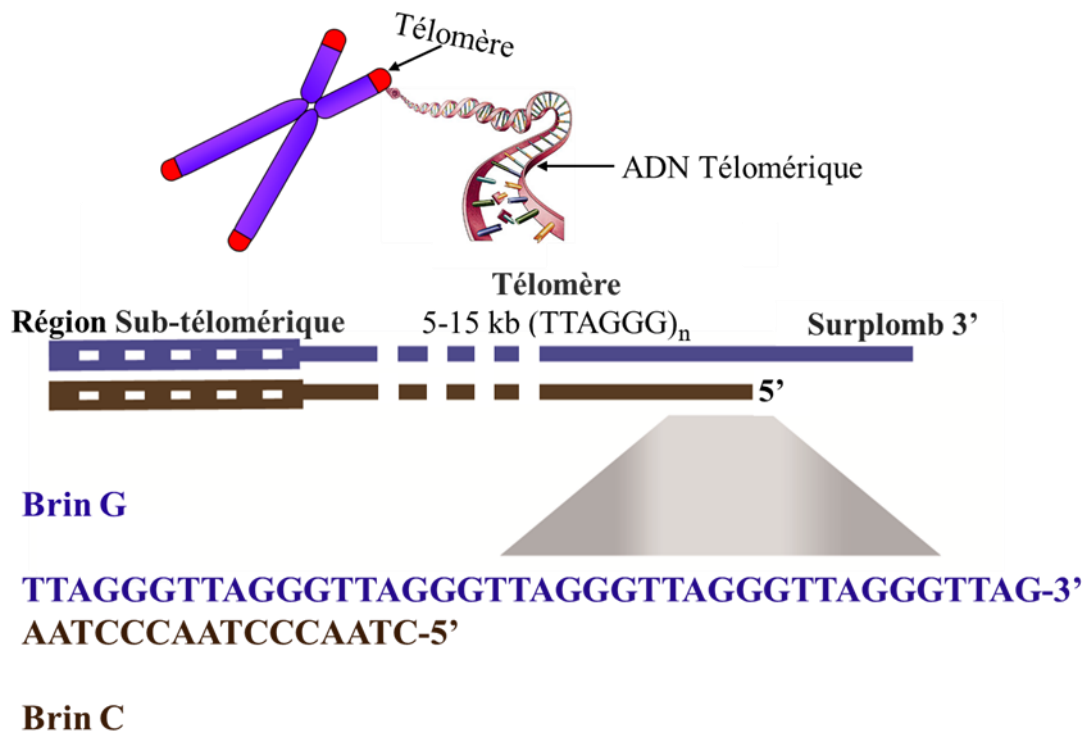


Figure 6: Représentation de l'ADN télomérique d'un vertébré.

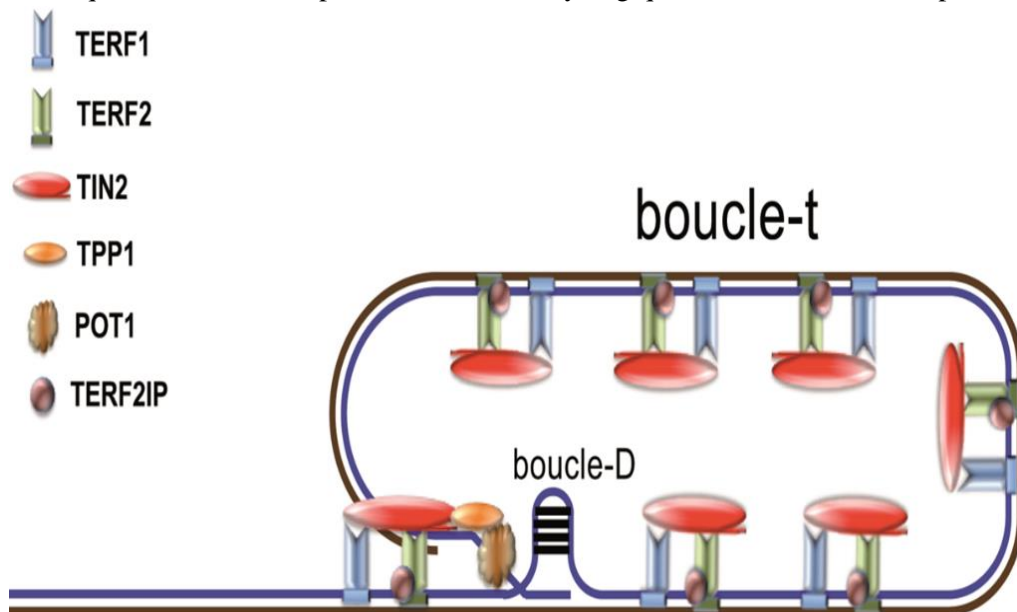
L'ADN télomérique est formé par une répétition en tandem de six nucléotides. Les télomères se terminent par une structure qui ressemble à une cassure bicaténaire de l'ADN et ils présentent une extension monocaténaire à leur extrémité 3', appelée extension télomérique. Cette extension se trouve sur le brin riche en Guanines (G). Tandis que la séquence terminale du brin riche en G n'est pas spécifique, le brin riche en Cytosines se termine le plus souvent par une séquence spécifique ATC-5'.

Les télomères sont reliés au reste de l'ADN chromosomique par les régions subtélomériques qui contiennent des séquences télomériques dégénérées. **La figure 6** et la légende l'accompagnant sont tirées de la figure 1 à la page 6 de la référence (54).

➤ Des protéines télomérique ne sont spécifiques qu'aux télomères c'est-à-dire n'interagissent qu'avec l'ADN télomérique. Ces protéines sont au nombre de six et forment un réseau protéique (Figure 7). Ce réseau est appelé le complexe de shelterin qui assure d'une part le maintien de la boucle télomérique en stabilisant la structure des télomères, et d'autre part il veille à l'intégrité des télomères en empêchant qu'elle ne soit reconnue par la machinerie de réparation de l'ADN comme des cassures mono ou bicaténares de l'ADN. En outre, les protéines télomériques participent à la régulation et au maintien de la longueur des télomères dans les cellules normales (51,53).

Figure 7: Boucles et protéines télomériques.

Les boucles télomériques sont formées par une action synergique entre l'ADN et les protéines



télomériques. L'extension télomérique se plie sur elle-même et envahit les deux brins télomériques situés en amont. La boucle ainsi formée est la boucle-t. Aussi, l'extension télomérique crée un déplacement du brin G et participe à la formation de la boucle D. Cette boucle D peut former des G-quadruplexes. Le site d'invasion de l'extension télomérique crée une structure ressemblant à la jonction de Holliday. Les protéines télomériques au nombre de six aident à l'établissement des boucles télomériques. Ces protéines forment un réseau entre elles pour assurer les fonctions de protection de la structure et de régulation de la longueur des télomères. **La figure 7** et la légende l'accompagnant sont tirées de la figure 3 à la page 12 de la de la référence (54).

➤ La troisième composante de la structure des télomères est l'hétérochromatine télomérique qui est une structure dont les histones sont densément enrichies par des marques hétérochromatiennes telles que la méthylation et l'acétylation des histones (55–57) (Figure 8).

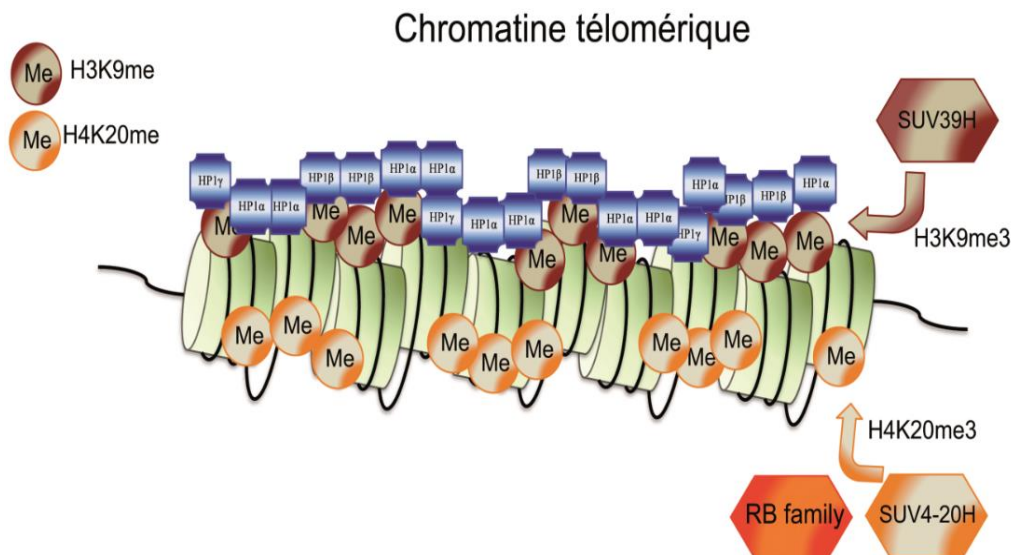


Figure 8: Chromatine télomérique.

La triméthylation de l'histone 3 à la lysine 9 (H3K9me3) se fait par la Suv39hl et Suv39h2 histone-lysine N-méthyltransférase (HMTases) (Peters et al., 2001 ; Garcia-Cao et al., 2004). L'affinité de la protéine 1 hétérochromatine (HP1) pour H3K9me3 conduit au recrutement des HMTases SUV4-20hl et SUV4-20h2 au niveau des télomères. Ces HMTases imposent la triméthylation de l'histone H4 au niveau de la lysine 20 (H4K20me3). Les protéines de la famille RB (Rbl, Rbl1, et Rbl2) peuvent directement interagir avec les SUV4-20H et influencer sur le niveau de la méthylation de H4K20me3. **La figure 8** et la légende l'accompagnant sont tirées de la figure 4 à la page 17 de la référence (54).

➤ D'autres éléments tels que les nucléosomes télomériques, l'ARN télomérique et des protéines associées (51,53) entrent dans la composition de la structure des télomères (54).

3.4.3 Fonction des télomères

Le rôle majeur des télomères est d'assurer le maintien et la stabilité du génome en protégeant les chromosomes de la perte du matériel génétique. En outre, les télomères participent à l'organisation nucléaire des chromosomes qui crée des territoires chromosomiques et jouent un rôle primordial dans les processus de recombinaisons et de transcription du génome. Une autre fonction des télomères est de permettre l'assemblage harmonieux des chromosomes au niveau de la fuseau mitotique pour assurer une meilleure ségrégation au cours de la mitose (51,53,58–62).

3.4.4 La longueur des télomères

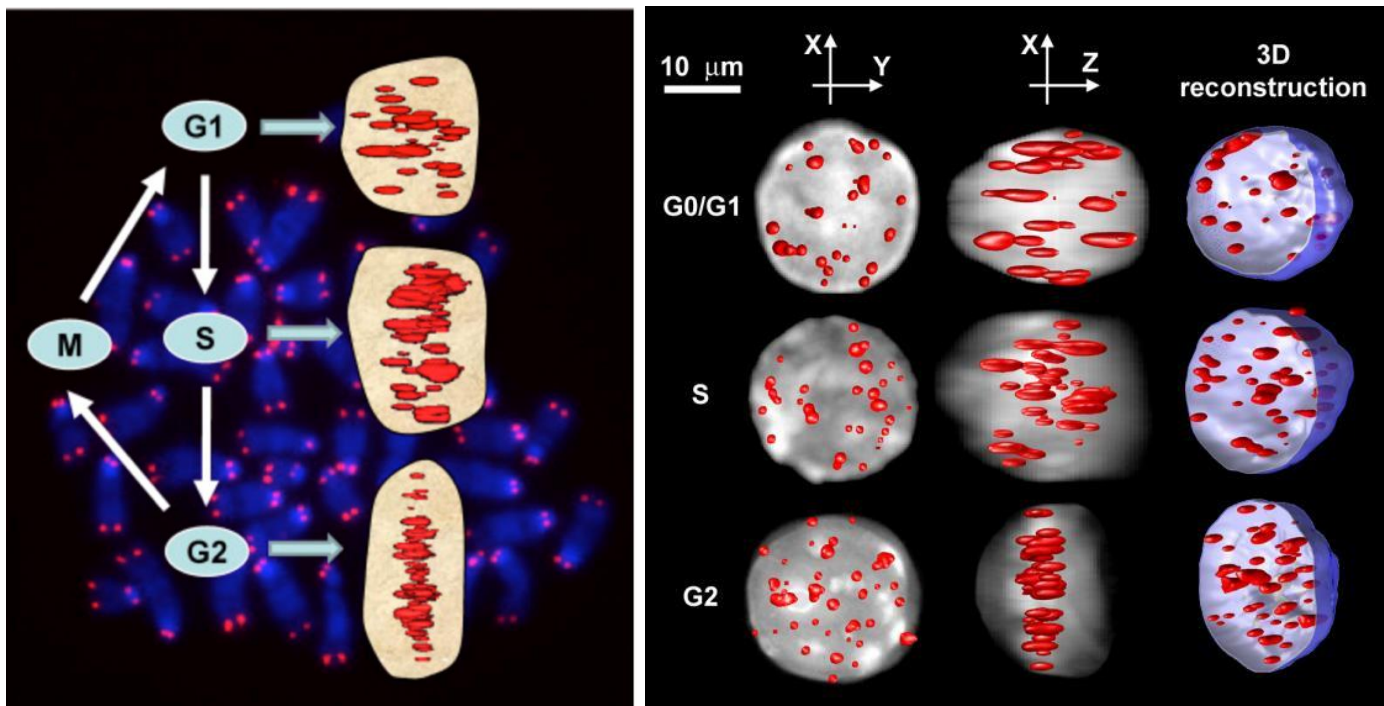
L'une des caractéristiques des cellules humaines est le raccourcissement de leurs télomères lors des divisions cellulaires (54). La longueur moyenne des télomères des cellules humaines est inversement proportionnelle de l'âge de l'individu. En effet, les télomères ont été désignés comme l'horloge biologique cellulaire ou de l'individu parce qu'ils diminuent de taille avec les divisions cellulaires ou l'âge de l'individu (63–65). La longueur moyenne des télomères d'un individu adulte est de 10 à 15 kb. La longueur des télomères varie d'un individu à un autre, d'une cellule à une autre chez le même individu et d'un bras chromosomique à un autre dans une même cellule (54). La perte des séquences télomériques est moindre dans les cellules souches et germinales que dans les autres cellules de l'organisme parce qu'il existe une enzyme, la télomérase, qui permet la synthèse des télomères à partir de leurs extrémité 3' est active. Cette enzyme est constituée d'une composante ARN qui sert de substrat pour la synthèse de l'ADN télomérique et d'une protéine qui est la composante catalytique de l'enzyme (66,67).

3.4.5 Organisation nucléaire des télomères

Les télomères sont distribués uniformément dans le noyau et ils ont tendance à préférer une location à la périphérie nucléaire dans les cellules normales tels les lymphocytes. Pour mieux assurer leurs fonctions, les télomères s'attachent à la matrice nucléaire grâce à certaines protéines telles la lamine A (68,69). La distribution des télomères dans le noyau dépend du cycle cellulaire. En effet, lors des phases G1 et S du cycle cellulaire les télomères sont uniformément distribués dans le noyau. Durant les phases G2 et M, ils s'alignent au centre nucléaire en formant le disque télomérique (Figure 9) qui joue un important rôle lors de la ségrégation et l'ascension des chromosomes au cours de la mitose (70,71).

Figure 9: Organisation 3D nucléaire des télomères.

(A). L'organisation tri dimensionnelle des télomères dans le noyau des cellules de mammifères dépend



du cycle cellulaire. (B) Trois distributions typiques des télomères. Un noyau est vu dans Phase G0 / G1 (en haut), phase S (au milieu) et phase G2 (en bas). Tout le noyau est montré en vue de dessus (plan xy), en vue de côté (plan xz) et sous forme de visualisation 3D (xyz). On voit bien que les télomères en phases G0/G1 et S sont répartis dans tout le noyau, tandis que ceux en phase G2 forme un disque. Ces figures sont tirées des références (54,70).

3.4.6 Télomères dans le cancer

L'une des caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses est le dysfonctionnement de la biologie des télomères. En effet, les cellules cancéreuses se singularisent par des télomères très courts lorsqu'on les compare aux cellules normales et cela malgré la présence d'une activité

très élevée de la télomérase ou de la voie alternative du maintien de la longueur des télomères qui sont des mécanismes qui allongent la longueur des télomères (54). Ces deux mécanismes du maintien de la longueur permettent l'immortalisation des cellules cancéreuses (72,73). Il est à signaler que les télomères individuels, c'est-à-dire les télomères de chaque bras chromosomique, ne présente pas le même degré de raccourcissement lors du processus néoplasique. En effet, il y a des télomères individuels qui se raccourcissent plus vite que d'autres et cela conduirait à des anomalies chromosomiques spécifiques dans certaines pathologies néoplasiques telle que la LMC (5,74).

En plus de leur longueur, l'organisation nucléaire des télomères des cellules cancéreuses est altérée. L'un des premiers indices de l'instabilité génomique est l'apparition des agrégats télomériques qui sont définis comme étant des grappes de télomères qui ne peuvent pas être distingués comme des signaux télomériques uniques à une résolution de 200 nanomètres, la limite de résolution spatiale intrinsèque du microscope classique. Ces agrégats télomériques peuvent résulter soit de la fusion des extrémités chromosomiques soit de la présence dans un environnement très proche de deux ou de plusieurs télomères (62,75). Bien vrai que les agrégats télomériques peuvent être présents dans des cellules normales, leur nombre est plus élevé dans les cellules cancéreuses. En outre, le nombre élevé d'agrégats télomériques a été associé au degré d'instabilité génomique (75,76).

Un autre élément de la signature de l'altération de l'organisation nucléaire des télomères des cellules cancéreuses est le changement de la distribution nucléaire des télomères. Cette distribution n'est pas harmonieuse comme dans les cellules normales. Un non alignement des télomères lors des phases G2 et M de la division cellulaire pour le disque télomérique qui a été associé à la présence d'aneuploïdie (41). En outre, l'indice de distribution des télomères dans le noyau peut être indicatif du degré de prolifération des cellules cancéreuses (77).

Les autres composantes de l'organisation nucléaire des télomères sont le nombre et la taille des télomères, la distance relative des télomères par rapport au centre nucléaire et le volume du noyau. Nous aborderons plus en détails ces différents éléments dans les sections suivantes.

3.4.7 Dysfonctionnement des télomères dans le cancer de vessie

Comme décrit précédemment, l'altération de l'organisation nucléaire des télomères joue un rôle important dans le processus néoplasique de plusieurs cancers. Bien vrai aucune étude n'a été faite pour évaluer cette organisation nucléaire des télomères dans le cancer de la vessie, la longueur des télomères qui est un de paramètres définissant cette organisation, a fait l'objet de plusieurs études dans le cancer de la vessie (78,79).

L'une des premières études rapportant sur la longueur des télomères dans le cancer de la vessie a montré que la longueur des télomères des cellules tumorales était plus courte que celle des cellules normales adjacentes sur le même tissu tumoral. Dans cette même étude, on retrouvait que la longueur des télomères est inversement proportionnelle aux stades évolutifs de la tumeur (80). D'autres études récentes ont montré qu'une survie plus faible des patients était associée à un raccourcissement des télomères dans le cancer de la vessie (81–84). Enfin, certaines études ont rapporté une association significative entre le risque élevé de cancer de la vessie et la présence des télomères courts (78,85,86). Ces différentes études montrent que les télomères courts seraient caractéristiques du cancer de la vessie et leur évaluation permettrait de déterminer des biomarqueurs de pronostic ou prédictif.

3.4.8 Étude de l'organisation nucléaire des télomères

L'étude de l'organisation nucléaire ou tridimensionnelle (3D) des télomères se fait par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)-3D des télomères, la microscopie 3D et l'utilisation d'un logiciel (TeloView™) qui analyse les paramètres définissant cette organisation nucléaire des télomères.

3.4.8.1 FISH quantitative en tri dimension

3.4.8.1.1 Définition :

L'hybridation *in situ* en fluorescence est une technique cytogénétique moléculaire qui permet l'hybridation d'une séquence d'acide nucléique couplée à un fluorochrome (sonde) à un brin complémentaire de la séquence cible. Cette procédure permet de déterminer la présence d'une séquence d'acide nucléique dans une cellule interphasique ou sur des métaphases en détectant la fluorescence associée à la sonde grâce à un microscope à fluorescence ou à un cytomètre de flux (87). En utilisant les mêmes principes que la FISH standard, la FISH quantitative (Q-FISH) permet l'acquisition d'informations quantitatives sur des séquences d'ADN grâce aux valeurs cumulatives de l'intensité de fluorescence de chaque sonde hybridée sur sa séquence cible. La Q-FISH permet la mesure de la longueur des télomères dans une cellule ou sur un bras chromosomique (88). Lorsque cette Q-FISH est appliquée sur des cellules interphasiques dont les noyaux gardent leur structure 3D, on l'appelle la technique 3D-Q-FISH (70,71,75).

3.4.8.1.2 But :

La technique 3D-Q-FISH permet de déterminer le nombre des télomères, de quantifier l'intensité des signaux télomériques qui correspondent à la longueur des télomères, de préciser la position et la distribution des télomères en rapport avec la structure 3D du noyau, d'identifier des agrégats télomériques, et enfin d'évaluer le volume nucléaire (54,70,71,75).

3.4.8.1.3 Principe :

Le fondement de la technique 3D-Q-FISH est basé sur les propriétés de dissociation et de réassociation spécifiques aux acides nucléiques. L'ADN télomérique est rendu monocaténaire par la dénaturation et mis en contact, dans des conditions permettant leur hybridation, avec la sonde télomérique qui est couplée à un fluorochrome. Cette hybridation a lieu grâce à la complémentarité entre les bases nucléotidiques de la sonde et celles de la séquence télomérique. Les hybrides infidèles et les molécules de sonde non hybridées sont éliminés par des lavages successifs. Il est impératif de faire des prétraitements cellulaires avant, pendant et après la technique FISH pour que la structure 3D nucléaire soit préservée. Ensuite, l'acquisition au microscope en 3D des images des télomères et des noyaux est effectuée. Enfin, l'analyse de ces images est faite avec l'aide d'un logiciel, TeloView™, qui permet de mesurer les paramètres définissant l'organisation nucléaire des télomères (70,71,75).

3.4.8.1.4 Avantages et limites

L'évaluation de l'organisation nucléaire permet d'avoir des informations sur la longueur des télomères, l'état d'aneuploïdie de la cellule, le grade nucléaire et l'indice de prolifération cellulaire des cellules cancéreuses. L'acquisition simultanée de ces éléments dans une même cellule accroît davantage leur valeur pronostique et de guide thérapeutique dans le cancer (4;54). En outre, on peut évaluer l'hétérogénéité inter cellulaire des différentes composantes de l'organisation nucléaire des télomères permettant la détermination de la clonalité des cellules cancéreuses et de la dynamique évolutive de l'instabilité génomique. Un autre avantage de l'évaluation de l'organisation nucléaire des télomères est la possibilité d'acquérir des données moléculaires qui peuvent être superposables et complémentaires à celles de la pathologie classique.

L'accessibilité à la technologie est la limite majeure dans l'évaluation de l'organisation nucléaire des télomères. En effet, le microscope à 3D avec différents modules de traitement d'image est dispendieux, et le logiciel TeloView™ est sous la licence d'une compagnie de biotechnologie (TeloGenomics, Canada) dont l'autorisation est nécessaire pour son utilisation.

3.4.8.1.5 Étapes

3.4.8.1.5.1 Échantillons

La FISH peut être faite à partir des préparations cytologiques et histologiques provenant de tout échantillon d'origine humaine. Les cellules interphasiques obtenues à partir d'une fixation au méthanol et à l'acide acétique ou d'une coupe tissulaire (tissus frais ou enrobé à la paraffine) sont les préparations les plus utilisées.

3.4.8.1.5.2 FISH 3D télomères

➤ Prétraitement de l'échantillon

Cette étape permet une meilleure pénétration de la sonde dans le noyau tout en gardant la structure 3D des noyaux. Souvent, une digestion protéolytique est nécessaire pour mieux perméabiliser la cellule, le noyau, et la chromatine afin qu'ils soient plus accessibles à la sonde télomérique. Cependant, il faut s'assurer que le prétraitement soit moins agressif autant que possible pour mieux préserver la structure 3D des noyaux. Le traitement au glycérol et à l'azote liquide permettent de maintenir la structure nucléaire surtout si on utilise des préparations cytologiques (4,89).

➤ Sondes télomériques

Les sondes télomérique sont généralement constituées d'acide nucléique peptidique (PNA) et constituent un des éléments essentiels de la technique 3D- QFISH. Les sondes PNA sont des molécules qui ressemblent aux molécules d'ADN et elles se différencient de celles-ci par la présence d'une chaîne pseudo peptidique qui remplace le squelette phosphatidique. Par conséquent, les bases puriques et pyrimidiques sont fixées sur cette chaîne pseudo peptidique par des liaisons carboxyliques (90). Les sondes PNA sont en général des oligonucléotides monocaténares de petite taille. La charge neutre des sondes de PNA fait qu'elles ont une température de dissociation (T_m) très élevée d'où leur spécificité plus grande que les sondes à ADN. Par conséquent, le ratio signal/bruit de fond est très élevé pour les sondes PNA, ce qui est une caractéristique très importante dans la quantification précise de la fluorescence à cause du biais qu'introduit le bruit de fond sur la valeur réelle de la fluorescence à mesurer (54). Un autre avantage de l'utilisation des sonde PNA est leur stabilité rendant ainsi l'hybridation encore plus efficace et stable. La petite taille des sondes PNA assure une meilleure pénétration cellulaire et nucléaire sans faire de prétraitements cellulaires agressifs qui peuvent changer la structure 3D des noyaux. En outre, la petite taille des sondes PNA assure une hybridation plus rapide en réduisant ainsi la possibilité de diminution de l'intensité de fluorescence au cours de l'expérimentation (70,88,90). Les sondes PNA télomériques sont des oligonucléotides monocaténares composés de 18 nucléotides, et la séquence télomérique (5'-CCCTAA-3')₃ associées au fluorochrome Cy3 est généralement la sonde télomérique la plus utilisée pour la technique 3D-QFISH (70,75,88).

➤ Dénaturation de la séquence télomérique

Cette étape consiste à séparer par la chaleur les deux brins d'ADN télomérique par rupture des liaisons hydrogènes. Une température à 80°C est généralement utilisée et elle a l'avantage d'être

au-dessus de la température de fusion de l'ADN et empêche aussi la formation de structure secondaire de l'ADN monocaténaire (ADN dénaturé) et de la sonde télomérique (54).

➤ **Hybridation**

À cette étape, la sonde télomérique s'hybride à son brin complémentaire des télomères. Cette étape est faite dans un environnement humide à 30°C et l'abri de la lumière. Elle dure 2 heures et ce temps d'hybridation est plus court que celui utilisé pour la technique FISH standard.

➤ **Lavage**

Cette étape permet d'éliminer les hybrides infidèles et les sondes non hybridées pour réduire autant que possible le bruit de fond. Elle se fait avec une solution saline associée à un détergent. La température de lavage avec la saline est au-dessus de la température d'hybridation et en deçà de la température de dénaturation. En plus, une solution de formamide tamponnée avec une solution saline est utilisée pour réduire la présence d'hybrides infidèles (70).

➤ **Contre-coloration**

La solution de contre-coloration est composée du DAPI (4', 6-diamidino-2-phénylindole) associée à une solution qui permet de diminuer la vitesse de photoblanchissement du fluochrome Cy3 (91). La contre coloration permet de colorer le noyau en bleu, et ainsi on peut visualiser simultanément le noyau (colorations bleue) et les télomères associés au fluorochrome Cy3 (coloration rouge).

➤ **Stockage**

Les lames hybridées peuvent être stockées dans un congélateur à -20 °C jusqu'au moment de l'observation microscopique. La fluorescence est plus stable à une température basse. Aussi, les lames doivent être aussi protégées de la lumière. Une température élevée et la lumière diminuent l'intensité du signal de la sonde(87,91).

3.4.8.1.5.3 Microscopie en 3D

Le système d'acquisition d'images est basé sur l'utilisation d'un microscope à épifluorescence muni d'une caméra avec une bonne résolution, de filtres à fluorescence qui permettent la visualisation du Cy3 et du DAPI et d'un système de prise d'images en 3D. Ce système permet ainsi d'acquérir différents plans focaux d'une même image. La distance entre deux plans focaux successifs est de 200 nm et 81 plans focaux sont en général capturés pour qu'une image ayant 16 µm de distance z puisse être reconstituée (Figure 10). Il est aussi essentiel que le système microscopique ait la capacité d'acquérir des images automatiquement selon le plan xy pour permettre l'acquisition de plusieurs champs d'images. Le système d'imagerie automatisé *Imager* de Zeiss associé au logiciel Zenpro (Zeiss, Canada) permet l'acquisition automatique

des images cellulaires selon les axes xyz. L'objectif optique 63X ou 40X avec une grande ouverture numérique est utilisé pour l'acquisition des images de noyaux et de télomères. Il est à noter que l'objectif 10x ou 20x peut être utilisé pour créer une image « preview » qui permet de sélectionner plus de cellules cibles tout en permettant d'avoir une vue plus large du contexte cellulaire ou tissulaire de l'échantillon.

Après la capture des images, on sélectionne les noyaux cibles (noyaux des cellules cancéreuses ou de cellules normales) à partir des images capturées par l'objectif 63x ou 40x. Ensuite, ces images sélectionnées sont traitées d'abord avec le module déconvolution de ZenPro, un algorithme mathématique, qui réduit la quantité de contamination de la lumière provenant en dehors du foyer d'acquisition (92). En effet, la prise successive de plans focaux d'une image entraîne une déformation de l'image et crée un flou autour d'elle. Ce flou conduit à une perte d'information lors de la quantification des pixels provenant de l'image. Pour remédier à cette déformation et restaurer l'image d'origine, l'algorithme itératif de déconvolution est utilisé (92).

L'image déconvolue est aussi traitée en la transformant en image TIFF de 16 bits sans compression. Ainsi chaque image nucléaire en 3D génère 162 images TIFF (81 images pour le noyau et 81 images pour les télomères) correspondant aux 81 plans focaux pris pour les deux canaux de filtres (bleu pour le noyau et rouge pour les télomères) (Figure 10).

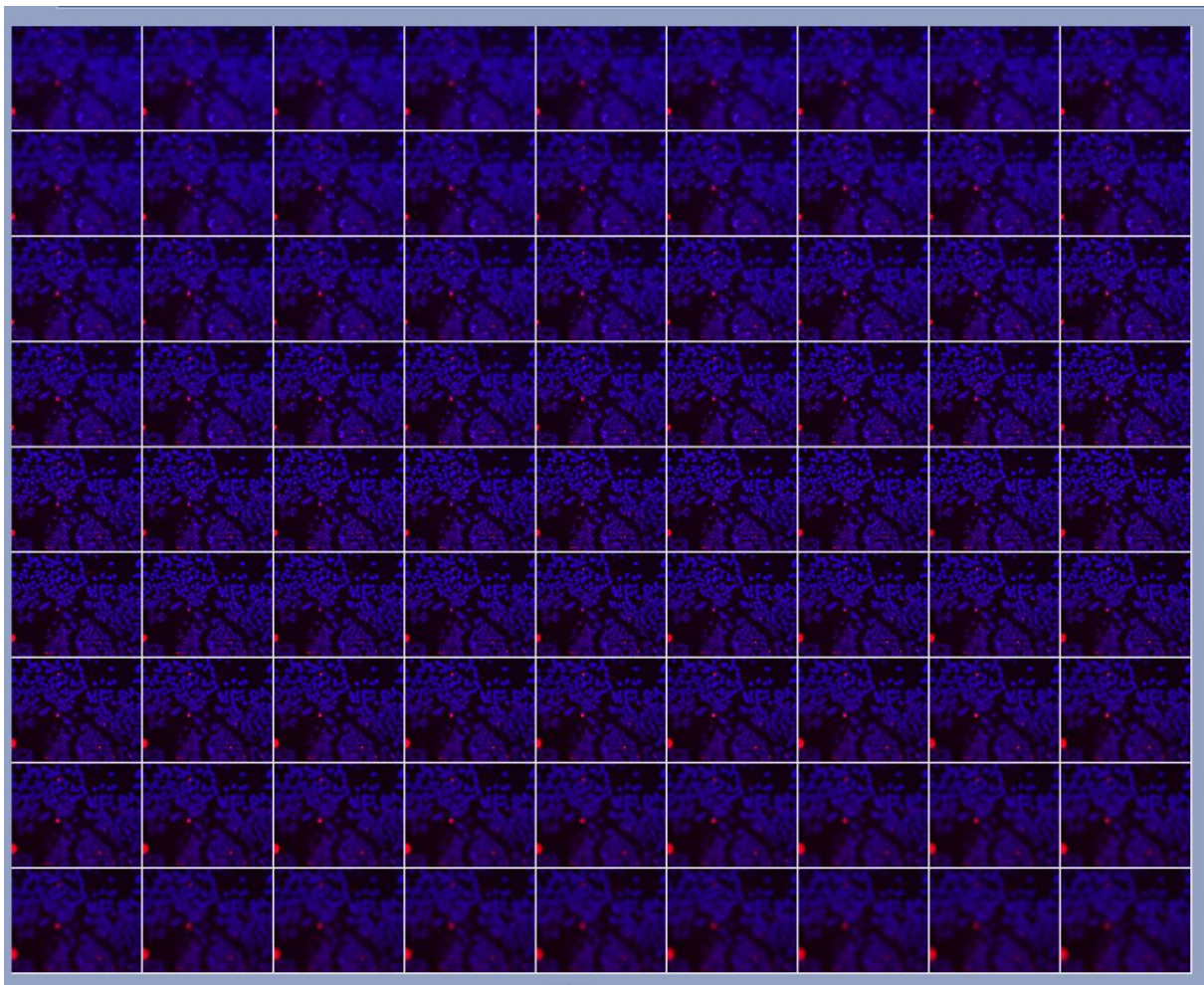


Figure 10 : Représentation des plans focaux

Représentation graphique de cellules prises avec l'objectif 40X. La même image cellulaire est a été capturée à 81 différents plans focaux et chaque plan focal est séparé de 200 nm. La reconstruction de ces 81 plans focaux constitue l'image 3D. Les noyaux sont représentés en bleu (DAPI) et les télomères en rouges (Cy3).

3.4.8.1.5.4 Analyse d'image :

Les images TIFF sont téléversées dans le logiciel TeloViewTM qui est un logiciel conçu pour faire l'analyse de l'organisation nucléaire des télomères. La description mathématique de l'algorithme TeloViewTM a été faite dans d'autres études (70, 71). Brièvement, TeloViewTM permet de détecter des signaux télomériques en fonction de l'intensité des signaux émise par la fluorescence Cy3, ensuite ces signaux sont localisés en fonction du plan de l'image et du plan défini par la structure 3D nucléaire (l'intensité de signaux émis par le DAPI). Ainsi la position des télomères et leur distribution sont déterminées par rapport au centre nucléaire. Subséquemment, TeloViewTM mesure le nombre des télomères, l'intensité des télomères, le

nombre d'agrégats télomériques, le volume nucléaire, indice de distribution télomérique, et la position des télomères en fonction du centre nucléaire.

3.4.8.2 Paramètres de l'organisation nucléaire des télomères :

L'organisation nucléaire des télomères est définie par six paramètres qui sont mesurés par TeloView™.

3.4.8.2.1 Le nombre de télomères :

Étant donné que les télomères sont les extrémités des chromosomes, leur nombre représente le nombre de chromosome dans le noyau. Une cellule normale diploïde comporte 92 télomères. Les cellules cancéreuses se caractérisent par l'aneuploïdie donc, le nombre des télomères varient en fonction de cette aneuploïdie. Il est à noter que le nombre des télomères détectée par TeloView™ varie en fonction de plusieurs facteurs tels que le type de cellule, l'état de densité de la chromatine ou la taille des télomères. Par exemple, les sondes télomériques s'hybrident plus facilement sur des télomères des cellules ayant une chromatine relâche que celle présentant une chromatine plus dense. Par conséquent, on peut retrouver des cellules normales ayant en moyenne 40-50 télomères (5,93).

3.4.8.2.2 L'intensité des télomères :

La sonde télomérique est constitué de 18 oligonucléotides dont l'extrémité 3' est associée à une molécule de fluorochrome Cy3. Chaque séquence de sonde télomérique hybridée correspond à une molécule de Cy3 qui émet une intensité donnée de fluorescence. Par conséquent, la taille des télomères est proportionnelle au nombre de sondes télomériques hybridées et à l'intensité de fluorescence Cy3 (88). Étant donné que les cellules normales ont des télomères plus longs que celles des cellules cancéreuses, l'intensité télomérique de celles-ci serait moindre que celles des cellules normales (54).

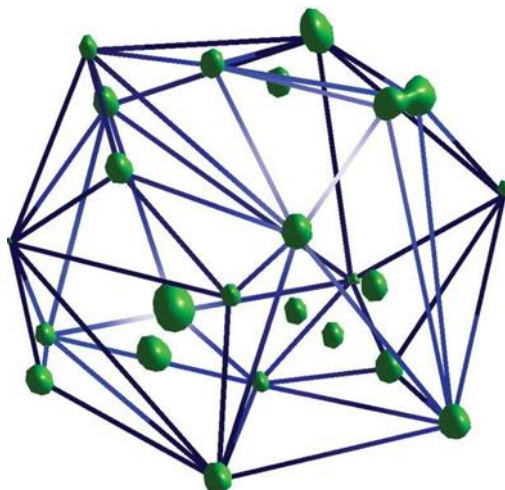
3.4.8.2.3 Les agrégats télomériques :

Les agrégats télomériques représentent des signaux de fusions télomériques ou lorsque les télomères sont très proches rendant leur individualisation difficile lorsque l'observation est faite à partir d'un microscope ayant une résolution limite de 200 nm (71). Le nombre d'agrégats télomériques est plus élevé dans les cellules cancéreuses que dans celles normales. Un nombre plus élevé d'AT est indicateur d'instabilité génomique car les AT ont été rapportés comme étant un des premiers signes de l'instabilité génomique à travers des cycles de cassure-pont fusion chromosomique (62,75,94).

3.4.8.2.4 La distribution nucléaire des télomères

Les télomères occupent tout le territoire nucléaire et la forme qu'ils prennent au cours de cette occupation définit la distribution nucléaire télomérique. Cette distribution des télomères dépend du cycle cellulaire dans les cellules normales (Figure 10) et a été associée à une prolifération accrue dans certaines cellules cancéreuses (70,77)

Figure 11: Territoire télomérique dans le noyau.



La distribution des télomères dans le volume du noyau est trouvée en ajustant un ensemble convexe de polygones qui contient tous les télomères. Ce volume ressemble généralement à une sphère ou à un disque et peut être décrit comme un ellipsoïde. Cette figure a été tirée de la référence (71).

3.4.8.2.5 La position des télomères

La position absolue des télomères est déterminée par rapport au centre du noyau. En pratique, on utilise plus la position relative qui est le rapport entre la position absolue et le volume nucléaire (5). L'utilisation de la position relative est souvent plus précise que celle absolue parce la taille du noyau peut influencer sur la distance qui sépare un télomère du centre nucléaire. Dans une cellule normale, la distance moyenne des télomères par rapport au centre du noyau est en général similaire entre les cellules d'un même type histologique. Par contre, la distance moyenne des télomères des cellules provenant d'une même tumeur peut être différente d'un groupe de cellules à un autre (54).

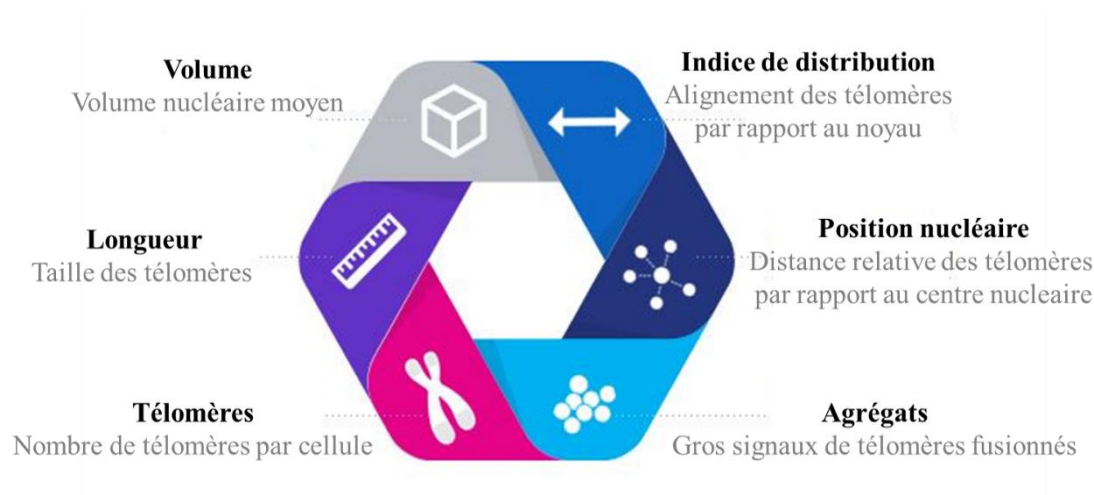
3.4.8.2.6 Le volume nucléaire

Le volume nucléaire est l'ensemble des voxels qui constituent le noyau et son unité est le mm^3 . L'unité représentative d'une image en 3D est le voxel alors qu'elle est le pixel pour celle en 2D. Par exemple, le pixel d'une image capturée par le microscope utilisé dans cette étude génère un pixel avec un axe X = 114 nm et un axe Y = 114 nm. La superposition de 2 pixels donne un voxel qui prendra en compte un troisième paramètre qui est la hauteur ou la distance

qui sépare les 2 pixels le $Z = 200$ nm. Ainsi le volume d'un voxel un $X \times Y \times Z$ (114 nm x 114 nm x 200 nm).

L'augmentation du volume nucléaire au cours de l'oncogénèse est associée à l'instabilité génomique et un mauvais facteur de pronostic dans plusieurs cancers (54).

Figure 12: Paramètres de l'organisation nucléaire des télomères



Cette figure a été tirée de la page web : <https://www.telodx.com/technology/teloview/>.

4 METHODOLOGIE

L'objet de ce travail était d'évaluer l'organisation nucléaire des télomères dans le cancer de la vessie à partir des cellules exfoliantes urothéliales en utilisant la technique 3D-FISH quantitative.

4.1 Cadre d'étude

Nous avons recruté les patients dans les services d'Urologie du CHU Point G, du CHU de Kati, de l'hôpital mère-enfant le Luxembourg, de la clinique privée Siramanan. L'analyse moléculaire a été faite dans le laboratoire de Neurosciences de la FMOS.

4.2 Type et période de l'étude

Il s'agissait d'une étude descriptive, longitudinale qui s'est déroulée sur une période de dix-huit (18) mois allant du 1er février 2019 au 31 Aout 2020.

Nous avons recruté sur une période de 18 mois de février 2019 au mois d'Aout 2021. Pour déterminer le taux de survie des patients nous avons fait leur suivie jusqu'au 28 février 2021. L'analyse génomique des données a duré 6 mois de novembre 2020 à Avril 2021.

4.3 Population d'étude

4.3.1 Critère d'inclusion

Tous patients dont le cancer de la vessie a été diagnostiqué pour la première fois durant la période d'étude ont été inclus. Durant la période d'étude, les données cliniques et les échantillons de 30 patients ont été enregistrés. Compte tenu de l'impératif de temps pour la réalisation de cette thèse d'exercice, nous n'avons fait que l'étude de l'organisation nucléaire des télomères chez 10 patients, choisis aléatoirement parmi les 30 recrutés durant la période d'étude.

4.3.2 Critère de non inclusion :

Les patients présentant un cancer secondaire de la vessie ou n'ayant pas de culot cellulaire des urinaires adéquat n'ont pas été inclus de l'étude.

4.4 Collecte des données

4.4.1 Les données cliniques

Nous avons collecté les données démographiques, cliniques et paracliniques de chaque patient. La fiche d'enquête nous a permis de recueillir ces données.

4.4.2 Considérations éthiques

Étant donné que nous devrions recueillir des données cliniques et génomiques des patients, il était judicieux qu'ils consentent à l'étude avant la collecte de celles-ci. Par conséquent chaque patient a bénéficié d'une explication de l'étude.

Le but de cette explication était de s'assurer que chaque patient ait compris les détails et les points importants qui sont : le caractère volontaire, la possibilité de se retirer à tout moment, le but, les critères de participation, les procédures, les risques liés à la participation à l'étude.

Le formulaire est en annexe de la thèse.

A noter que nos fiches établies étaient constituées d'un code afin de garantir l'anonymat du participant et de la confidentialité des données recueillies.

4.4.3 Traitement des cellules urinaires

4.4.3.1 Recueil des urines

Les échantillons d'urine ont été recueillis à l'état frais par les patients eux-mêmes chez qui l'urologue a suspecté une tumeur de la vessie (présence des symptômes ou découverte sur les examens complémentaires comme la cystoscopie). Les urines étaient recueillies avant la résection dans un tube Falcon de 50 ml. Les échantillons d'urine étaient acheminés dans les 06 heures qui suivirent leur recueil au laboratoire.

4.4.3.2 Fixation des cellules exfoliantes urothéliales :

Nous avons suivi protocole suivant pour la fixation des cellules exfoliantes urothéliales.

- a) Centrifuger l'urine dans un tube à centrifugation de 50 mL à 1800 gr pendant 10 minutes à une température de (20-25°C).
- b) Enlever le surnageant en laissant environ 1-2 mL du culot cellulaire, en faisant attention de ne pas déranger le culot.
- c) Remettre le culot en suspension avec 10 mL de 1X PBS (137 mM NaCl ; 2.7 mM KCl ; 4.3 mM Na₂HPO₄ ; 1.47 mM KH₂PO₄) et transférer le contenu dans un tube conique de 15 mL.
- d) Centrifuger le tube de 15 mL à 1800 gr pendant 10 minutes à la température ambiante.
- e) Retirer le surnageant jusqu'à environ 0,5 mL du culot cellulaire.
- f) Remettre le culot en suspension et ajouter lentement 5 ml de solution de fixation Carnoy (3 volumes de méthanol : 1 volume d'acide acétique), goutte à goutte au début, avec agitation fréquente.
- g) Laisser l'échantillon fixé à 4°C pendant 30 minutes.
- h) Centrifuger l'échantillon à 1800 gr pendant 5 minutes à 20-25°C

- i) Retirer délicatement le surnageant.
- j) Répéter les étapes f à i deux fois.
- k) Remettre le culot cellulaire en suspension en ajoutant le fixateur pour atteindre un volume de 1 mL.
- l) Transférer le culot cellulaire dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et garder l'échantillon à -20° C jusqu'au moment de réaliser la technique 3D-FISH.

4.4.3.3 Étalement

Les cellules fixées ont été étalées sur les lames de microscope en suivant le protocole ci-dessous.

- a) Retirer le surnageant.
- b) Ajouter 1mL de la solution de fixation Carnoy.
- c) Centrifuger à 2000 gr pendant 5 minutes à 20°-25°C.
- d) Retirer le surnageant.
- e) Ajouter une petite quantité de solution fixative en fonction du culot cellulaire.
- f) Étaler 5-10 µL sur une lame et laisser sécher à l'air pendant 1 minute.
- g) Observer au microscope à fond clair pour évaluer la qualité de l'étalement et la densité cellulaire.
- h) Procéder immédiatement à technique 3D-FISH.

4.4.4 Protocole de la technique 3D-FISH télomère

Nous avons suivi le protocole suivant pour réaliser la technique 3D-FISH télomère.

4.4.4.1 Les solutions

Les solutions et les réactifs suivants ont été utilisés pour la technique 3D-FISH télomère.

- **1 L de solution de 10X TBS (200 mM Tris ; 1,5 M NaCl)**
 - 24 g de Tris
 - 88 g NaCl
 - Ajuster le volume avec 1 L de H₂O distillée.
 - Ajuster le pH à 7,4
- **200 mL de solution de 1X TBS**
 - 20 mL de solution de 10x TBS (200 mM Tris ; 1,5 M NaCl)
 - 180 mL de H₂O distillée.
 - Ajuster le pH à 7,4
- **40 mL de formaldéhyde à 1% dans 1X TBS**
 - 1,08 mL de formaldéhyde à 37%

- 4 mL de 10X TBS (200 mM Tris ; 1,5 M NaCl)
- 34,92 mL de H₂O distillée.
- **40 mL de formaldéhyde à 3,7% dans 1X TBS**
 - 4 mL de formaldéhyde à 37%
 - 4 mL de TBS X10
 - 32 mL de H₂O distillée.
- **10 mL de HCl 0,01N**
 - 100 µL de HCl 1N
 - 10 mL de H₂O distillée
- **0,05% de 0,01N HCl de solution de pepsine**
 - 50 µL de 10% de la solution de pepsine
 - 10 mL de 0,01 N de HCl
- **40 mL de formamide 70% / 1X TBS (dupliquer la solution)**
 - 28 mL de formamide à 100%
 - 4 mL de 10x TBS
 - 8 mL de H₂O distillée
- **50 mL de solution de lavage à 1X**
 - 1 mL de solution de lavage à 50X de « Telomere PNA Kit » (Agilent Dako, Canada).
 - 49 mL de H₂O distillée
- **50 ml de solution de rinçage à 1X (Agilent Dako Canada).**
 - 1 mL de solution de rinçage à 50X de « Telomere PNA Kit » (Agilent Dako, Canada).
 - 49 mL de H₂O distillée
- La sonde PNA télomérique (Agilent Dako, Canada).
- Solution de montage : DAPI avec du Vectashield (Vectolabs, Canada).

4.4.4.2 Procédure

Nous avons suivi la procédure suivante pour faire la technique 3D-FISH télomère.

- a) Fixer dans 3,7% de formaldéhyde pendant 10 minutes à 20°-25°C.
- b) Laver les lames dans une solution de 1X TBS pendant 5 minutes à 20°-25°C.
- c) Laver les lames dans une autre solution de 1X TBS pendant 5 minutes à 20°-25°C.
- d) Incuber les lames dans la solution de 0,05% de pepsine / 0,01 N HCl pendant 10 minutes à 37° C.
- e) Laver les lames dans une solution de 1X TBS pendant 5 minutes à 20°-25°C.

- f) Fixer les lames dans 1% de formaldéhyde pendant 5 minutes à 20°-25°C.
- g) Laver les lames dans une solution de 1X TBS pendant 5 minutes à 20°-25°C.
- h) Laver les lames dans une autre solution de 1X TBS pendant 5 minutes à 20°-25°C.
- i) Déshydrater les lames par immersion dans des solutions successives d'éthanol à 70% pendant 2 minutes, 85% d'éthanol pendant 2 min et, 100% d'éthanol pendant 2 minutes à 20°-25°C.
- j) Laisser sécher les lames pendant 5 minutes à 20°-25°C.
- k) A partir de cette étape, la procédure doit être effectuée dans une pièce sombre.
- l) Préchauffer la quantité de sonde télomérique requise pour les lames pendant 10 minutes à 85° C.
- m) Mettre 6 µL de sonde télomérique sur chaque lame et déposer sur une lamelle de 18 x 18 mm sur chaque lame.
- n) Placer les lames dans la Thermobrite System (Illinois, USA) et exécuter le programme suivant : 85°C pendant 10 minutes (dénaturation) et 30°C pendant 2 heures (hybridation).
- o) Après hybridation, immerger les lames dans la solution de lavage 1X pour enlever les lamelles.
- p) Laver les lames dans la solution de 70% formamide /1X TBS pendant 15 minutes.
- q) Ensuite, laver les lames dans une autre solution de 70% de formamide /1X TBS pendant 15 minutes.
- r) Laver les lames dans la solution de lavage 1X à 55°C pendant 10 minutes.
- s) Laver les lames dans la solution de rinçage 1X à 20°-25°C pendant 5 minutes.
- t) Déshydrater les lames avec des solutions successives d'éthanol à 70% pendant 1 minute, 85% d'éthanol pendant 1 minute et, 100% d'éthanol pendant 1 minute à 20°-25°C.
- u) Appliquer 20 µl de solution de montage contenant du DAPI et le Vectashield sur chaque lame et mettre une lamelle de 24 x 60 mm. Garder les lames dans un congélateur à -20° C.

4.4.5 Acquisition d'images au microscope

Nous avons utilisé le système microscopique Axio Imager 2 de Zeiss, muni du logiciel ZenPro (Zeiss, Canada) et associé à une caméra Axiocam 506 mono (Zeiss, Canada).

Les lames ont été d'abord scannées à l'objectif 10X pour créer une image de vue d'ensemble de l'échantillon. À partir de cette image, nous avons sélectionné des régions de l'image contenant de probables cellules cancéreuses. Ensuite, nous avons pris des images de ces régions présélectionnées par un objectif 40X ayant une ouverture numérique de 1.4. Pour chaque image

prise à 40X, 80 plans focaux ont été réalisés pour chacun des filtres (le DAPI et le Cy3). Les temps d'exposition étaient de 250 millisecondes pour et le Cy3 et variable pour le DAPI.

4.4.6 Sélection des cellules

Chez chaque patient, nous avons choisi 220 cellules soit 110 cellules normales et 110 cellules pathologiques. Il est à noter que dans cette section, cellules et noyaux sont interchangeable car ce sont les images des noyaux dont nous disposons qui nous permettent de mentionner si un noyau provient d'une cellule cancéreuse ou non. Le DAPI ne colore que le noyau et non l'ensemble de la cellule, et c'est à partir de cette coloration, qu'on a choisi les noyaux des cellules cancéreuses. Le choix des cellules pathologiques a été faite en fonction des critères édictés par le kit UroVysion de Abbott Molecular (<https://www.molecular.abbott/sal/en-us/staticAssets/UroVysion-package-insert-R6--watermark.pdf>). Ce kit est approuvé par l'Agence Américaine de Médicament pour le diagnostic du cancer de la vessie à partir des cellules urothéliales dans les urines. En plus de ces critères, nous avons inclus la densité chromatiniennne comme critères. Les cellules normales ont été choisies en se basant sur les critères suivants : la petite taille du noyau, la rondeur du noyau, une chromatine dense et uniforme du noyau. Nous savons que d'autres cellules normales étaient présentes, mais nous avons décidé de choisir des cellules dont les noyaux ressemblent à ceux des lymphocytes ou des monocytes. Toutes les cellules sélectionnées ont été vérifiées par un spécialiste en pathologie moléculaire.

À partir de l'image 40X, les noyaux cibles (noyaux des cellules normales et pathologiques) ont été sélectionnés et coupés grâce au logiciel ZEN 3.1 (Zeiss, Canada).

4.4.7 Traitement d'images

Les images sélectionnées ont été traitées par le module de déconvolution itérative de ZenPro (Zeiss, Canada). Ensuite, les images déconvoluées ont été transformées en images TIFF de 16 bits sans compression. La transformation des images en TIFF est obligatoire parce que le logiciel TeloView™ ne reconnaît que ce format d'image.

4.4.8 Analyse par TeloView™

Le logiciel TeloView™ permet d'analyser les cellules normales et pathologiques d'un même échantillon dans une seule et unique pipeline pour éviter le mélange des données. En effet, on a répertorié 120 cellules normales et 120 cellules pathologiques dans le pipeline TeloView™ pour l'analyse d'un échantillon donné. Ensuite, on a choisi parmi celles-ci, 100 cellules normales et 100 pathologiques pour l'analyse d'un échantillon donné. Le logiciel TeloView™ permet de mieux apprécier la structure 3D des noyaux, de l'état de la chromatine et de la qualité

de l'hybridation. Cette deuxième sélection à partir du logiciel TeloView™ permet d'être plus strict et précis dans la sélection des cellules. Par conséquent, les paramètres de l'organisation nucléaire des télomères ont été générés dans un fichier Excel pour chacune des 200 cellules d'un échantillon donné. Il est important de mentionner que les études antérieures sur l'organisation nucléaire télomères à partir des préparations cytologiques provenant d'autres types cellulaires tels que les cellules sanguines n'ont analysé que 30 cellules par échantillons (95). Un des objectifs de notre étude était faire une mise au point de la technique 3D-FISH télomère, pour la première fois, sur une préparation cytologique dans le cancer de la vessie. Il était donc essentiel d'inclure le maximum de cellules analysables afin de pouvoir déterminer un seuil minimal de cellules à analyser sur des bases statistiques même si cela a entraîné une augmentation considérable du temps de travail et la durée de cette thèse.

4.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des logiciels SPSS Statistics 25 (IBM, USA), Excel (Microsoft, USA) et Python (Python Software Foundation, USA).

TeloView a généré un fichier Excel pour chaque échantillon. Pour chaque type cellulaire d'un échantillon donné, nous avons les données suivantes : [i] l'intensité de chaque signal télomérique détecté dans une cellule, [ii] le nombre total de signaux télomériques dans une cellule, [iii] le nombre d'agrégats télomériques dans une cellule, [iv] l'index de distribution nucléaire des télomères d'une cellule, [v] la position de chaque télomère par rapport au centre nucléaire d'une cellule, et [vi] le volume nucléaire d'une cellule. Nous avons fait les analyses statistiques à partir de ces données de base.

La position de chaque télomère par rapport au centre nucléaire d'une cellule permet de générer une distance qui est un indice de la localisation relative centrale ou périphérique du dit télomère. Cependant, le volume nucléaire peut influencer sur cette distance. Nous nous sommes référés à la méthodologie adoptée par Samassekou qui consistait de diviser la distance moyenne des télomères du centre nucléaire par le volume du noyau (54).

Une autre originalité de cette thèse est l'analyse statistique utilisée pour déterminer l'hétérogénéité cellulaire à partir du nombre et de l'intensité des télomères au sein de chaque type cellulaire d'un échantillon donné. Selon la littérature, aucune étude n'avait déterminé l'hétérogénéité cellulaire à partir de l'évaluation de l'organisation nucléaire des télomères. Dans cette étude, nous avons utilisé deux (nombre et intensité des télomères) des six paramètres qui définissent l'organisation nucléaire des télomères pour déterminer l'hétérogénéité cellulaire au sein d'un type cellulaire provenant d'un échantillon donné. Il est à noter que nous nous sommes limités seulement à ces deux paramètres dans cette thèse bien vrai que tous les six

paramètres pouvaient être utilisés. Notre objectif dans le présent travail est d'introduire cette nouvelle méthode d'étude de l'hétérogénéité cellulaire en se basant sur les deux paramètres les plus altérés de l'organisation nucléaire des télomères des cellules cancéreuses (54).

Pour définir l'index d'hétérogénéité d'un type cellulaire provenant d'un échantillon donné, nous avons utilisé la mesure de similarité en calculant la distance Euclidienne entre les cellules du type cellulaire de l'échantillon. La mesure de similarité en génétique en utilisant la distance Euclidienne a été rapportée ailleurs (96). Par exemple, si on veut déterminer la similarité entre trois cellules A, B et C (en fonction de deux caractéristiques x et y), on mesure les distances Euclidiennes de ces cellules entre elles. Les cellules A et B seront similaires entre elles plus que les cellules A et C lorsque la distance entre A et B est plus petite que celle entre A et C. Nous avons utilisé le même concept pour déterminer l'hétérogénéité cellulaire des cellules pathologiques et des cellules normales pour chaque patient en utilisant le nombre total des télomères et l'intensité moyenne des télomères d'une cellule.

Étant donné que le nombre des télomères et l'intensité télomérique ne sont pas à la même échelle de valeur, on ne peut mesurer la distance Euclidienne des points définis par ces deux variables qu'en les normalisant (Figure 13. I). Ainsi, nous avons utilisé la normalisation z (97) et les données normalisées nous ont permis de mesurer la distance entre deux points (cellules). Subséquemment, nous avons mesuré itérativement la distance entre une cellule donnée et chacune des 99 autres cellules de chaque type cellulaire d'un échantillon donné (Figure 13. I et II). Cette mesure a été effectuée pour chacune des 100 cellules constituant un type cellulaire d'un échantillon donné. Par exemple, pour l'échantillon d'un patient, nous avons mesuré 4950 distances pour le type cellulaire normal et le même chiffre a été généré pour les cellules pathologiques. Ensuite, nous avons déterminé l'index d'hétérogénéité cellulaire pour chaque type cellulaire en calculant la distance moyenne entre les 4950 distances définissant ce type cellulaire (Figure 13. III). Par conséquent, pour chaque échantillon, nous avons déterminé un index d'hétérogénéité pour les cellules normales et un pour celles pathologiques. L'index d'hétérogénéité généré en utilisant le nombre total des télomères et l'intensité moyenne est nommé index d'hétérogénéité en 2D (Figure 13. IV). Nous avons aussi utilisé la même méthodologie pour générer l'index d'hétérogénéité en 3D en associant le coefficient de variation de l'intensité moyenne des télomères aux deux autres paramètres qui sont le nombre total des télomères et l'intensité moyenne des télomères. L'association du coefficient de variation donne plus de précision aux données.

Il est à noter que pour les 10 échantillons étudiés dans ce travail, nous avons mesuré 198 000 distances (Figure 13. IV). Il était extrêmement difficile pour nous de générer ces données en

utilisant les méthodes usuelles de calcul, donc un algorithme a été développé par Mr. Modibo Goita (Étudiant thésard en pharmacie) pour générer ces données. Les explications et le script de l'algorithme se trouvent aux annexes de cette thèse.

I- Normalisation : mettre les variables sur la même échelle

Données brutes

I	N
a ₁	b ₁
a ₂	b ₂
a ₃	b ₃
⋮	⋮
⋮	⋮
a ₁₀₀	b ₁₀₀

$$M_a = \frac{a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_{100}}{100}$$

$$M_b = \frac{b_1 + b_2 + b_3 + \dots + b_{100}}{100}$$

$$SD_a = \sqrt{\frac{(a_1 - M_a)^2 + (a_2 - M_a)^2 + \dots + (a_{100} - M_a)^2}{100}}$$

$$SD_b = \sqrt{\frac{(b_1 - M_b)^2 + (b_2 - M_b)^2 + \dots + (b_{100} - M_b)^2}{100}}$$

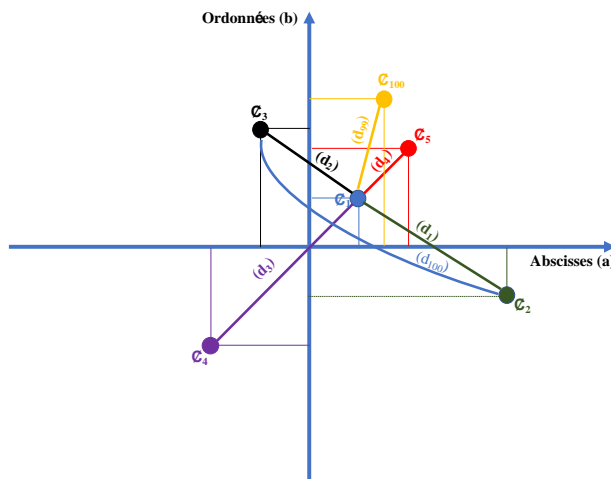
Données normalisées

I _n	N _n
$a_{n_1} = \frac{a_1 - M_a}{SD_a}$	$b_{n_1} = \frac{b_1 - M_b}{SD_b}$
$a_{n_2} = \frac{a_2 - M_a}{SD_a}$	$b_{n_2} = \frac{b_2 - M_b}{SD_b}$
⋮	⋮
$a_{n_{100}} = \frac{a_{100} - M_a}{SD_a}$	$b_{n_{100}} = \frac{b_{100} - M_b}{SD_b}$

Chaque cellule est définie par les coordonnées suivantes :

$$C_1 = (a_{n_1}; b_{n_1}), C_2 = (a_{n_2}; b_{n_2}), \dots, C_{99} = (a_{n_{99}}; b_{n_{99}}), C_{100} = (a_{n_{100}}; b_{n_{100}})$$

II- Représentation graphique des cellules



III- Calcul des distance

$$d_1 = \sqrt{(a_{n_1} - a_{n_2})^2 + (b_{n_1} - b_{n_2})^2}$$

$$d_2 = \sqrt{(a_{n_1} - a_{n_3})^2 + (b_{n_1} - b_{n_3})^2}$$

⋮

$$d_{99} = \sqrt{(a_{n_1} - a_{n_{100}})^2 + (b_{n_1} - b_{n_{100}})^2}$$

$$d_{100} = \sqrt{(a_{n_2} - a_{n_3})^2 + (b_{n_2} - b_{n_3})^2}$$

⋮

$$d_{4950} = \sqrt{(a_{n_{99}} - a_{n_{100}})^2 + (b_{n_{99}} - b_{n_{100}})^2}$$

IV- Calcul de l'index d'hétérogénéité d'un type cellulaire

$$IH = \frac{d_1 + d_2 + \dots + d_{99} + d_{100} + \dots + d_{4950}}{4950}$$

Figure 13: Représentation schématique de la méthode statistique pour calculer l'index d'hétérogénéité cellulaire

Nous avons utilisé la moyenne lorsque la distribution était normale et la médiane lorsqu'elle ne l'était pas. Par conséquent, les tests statistiques ont été faits en fonction de cette distribution. Nous avons utilisé **test t** pour la comparaison des moyennes et le test non paramétrique de **Mann -Whitney** pour celle des médianes. Le test a été considéré statistiquement significatif lorsque le $p < 0.05$.

5 RESULTATS

5.1 Données Cliniques :

5.1.1 Sexe

Tableau II: Répartition des patients en fonction du sexe.

Sexes	Effectifs	Pourcentages
Féminin	6	60
Masculin	4	40
Grand Total	10	100

Les femmes étaient les plus touchées avec 6 sur 10 patients.

5.1.2 Age

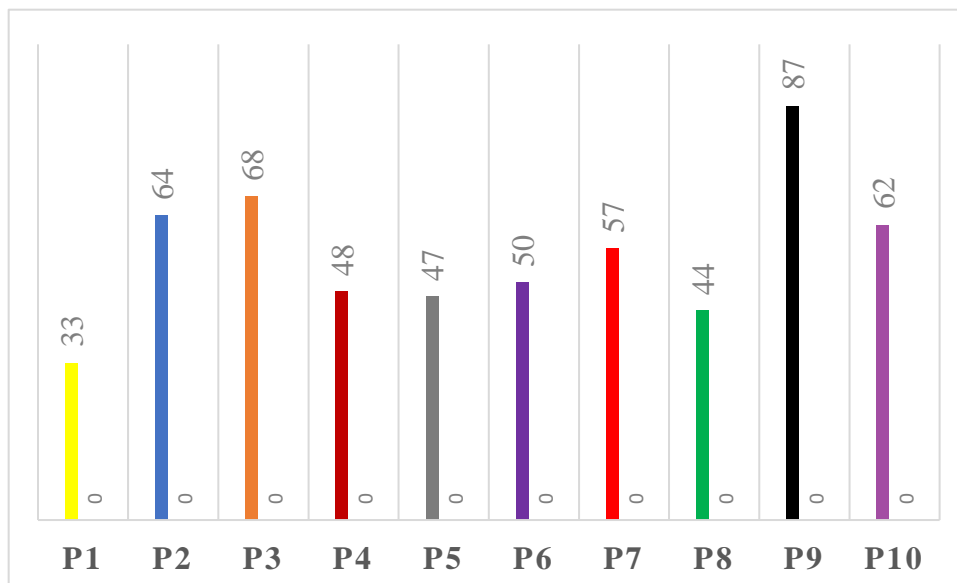


Figure 14: Répartition des patients en fonction de l'âge.

Les tranches d'âge les plus représentées étaient de 40-50 ans et 60-70 ans. L'âge moyen des patients était de 56 ans avec des extrêmes de 33 ans et 87 ans.

5.1.3 Motif de consultation

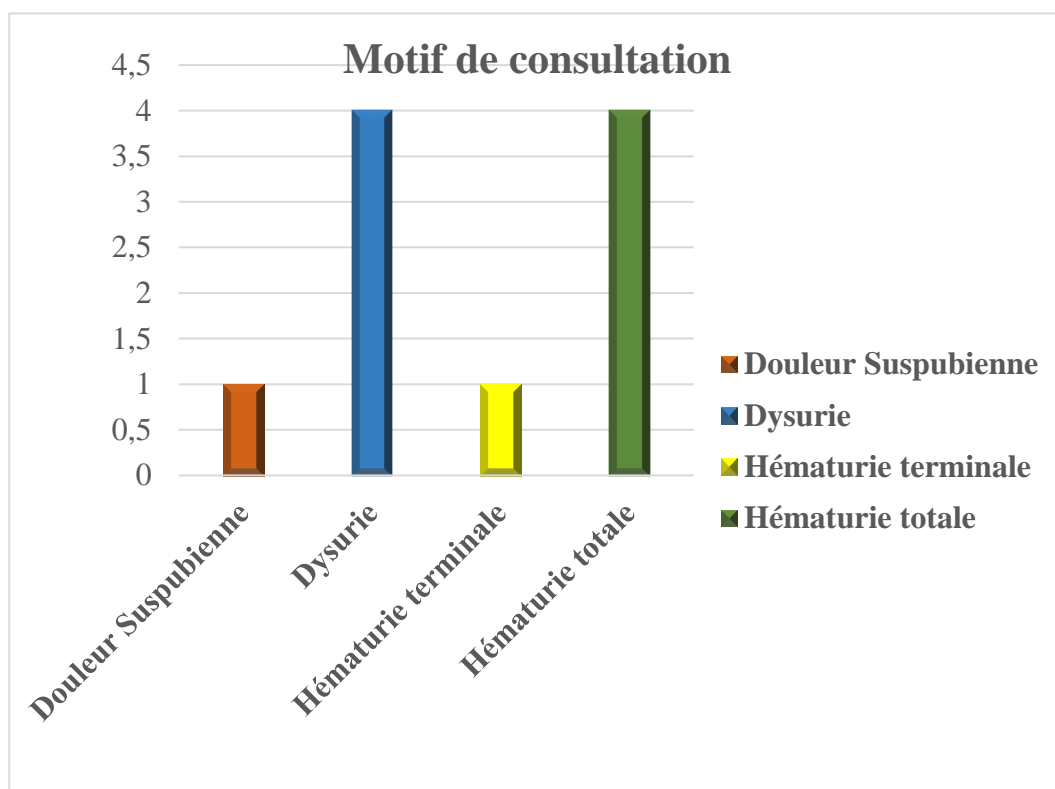


Figure 15: Répartition des patients en fonction du motif de consultation

Nous avons noté qu'un nombre égal de patients se présentaient en consultation pour dysurie (4 sur 10 patients) et une hématurie terminale (4 sur 10 patients).

5.1.4 L'aspect macroscopique des urines

Tableau III: Répartition des patients en fonction de l'aspect macroscopique des urines.

Aspect Urine	Effectifs	Pourcentages
Jaunâtre	1	10
Sanguinolent	6	60
Trouble	3	30
Total	10	100

Chez 6 patients sur 10, nous avons observé des urines sanguinolentes.

5.1.5 Types histologiques

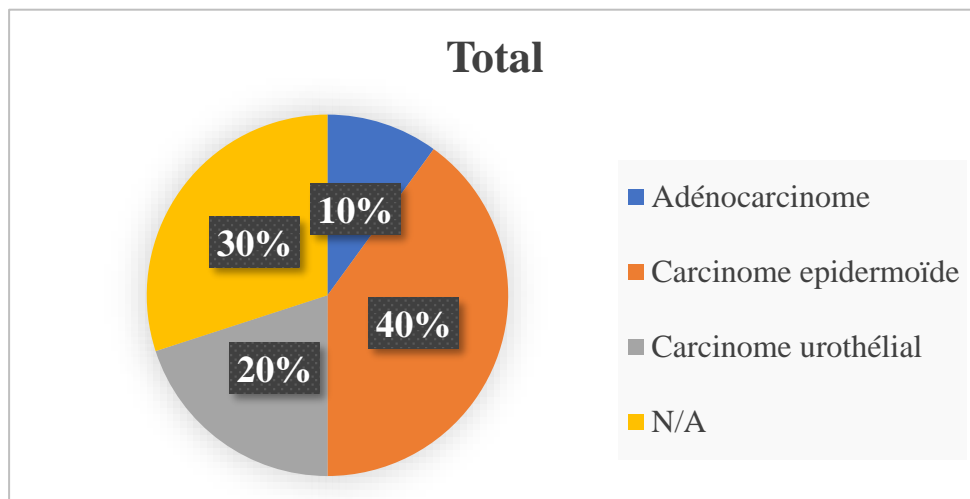


Figure 16: Répartition des patients en fonction du type histologique

Étant donné qu'on n'a pas pu déterminer le type histologique chez 3 des 10 patients, par conséquent, la fréquence du carcinome épidermoïde était de 4/7.

5.1.6 Types histologiques et antécédents de schistosomiase :

Tableau IV: Répartition des patients en fonction du type histologique et l'antécédent de schistosomiase.

Types histologiques	Antécédents de Schistosomiase	Total
Adénocarcinome	1	1
Carcinome épidermoïde	4	4
Carcinome urothélial	2	2
N/A	3	3
Total	10	10

Chez l'ensemble des 10 patients, nous avons retrouvé un antécédent de *Schistosomiase* et cet antécédent était indépendants du type histologique.

5.1.7 Taux de survie des patients

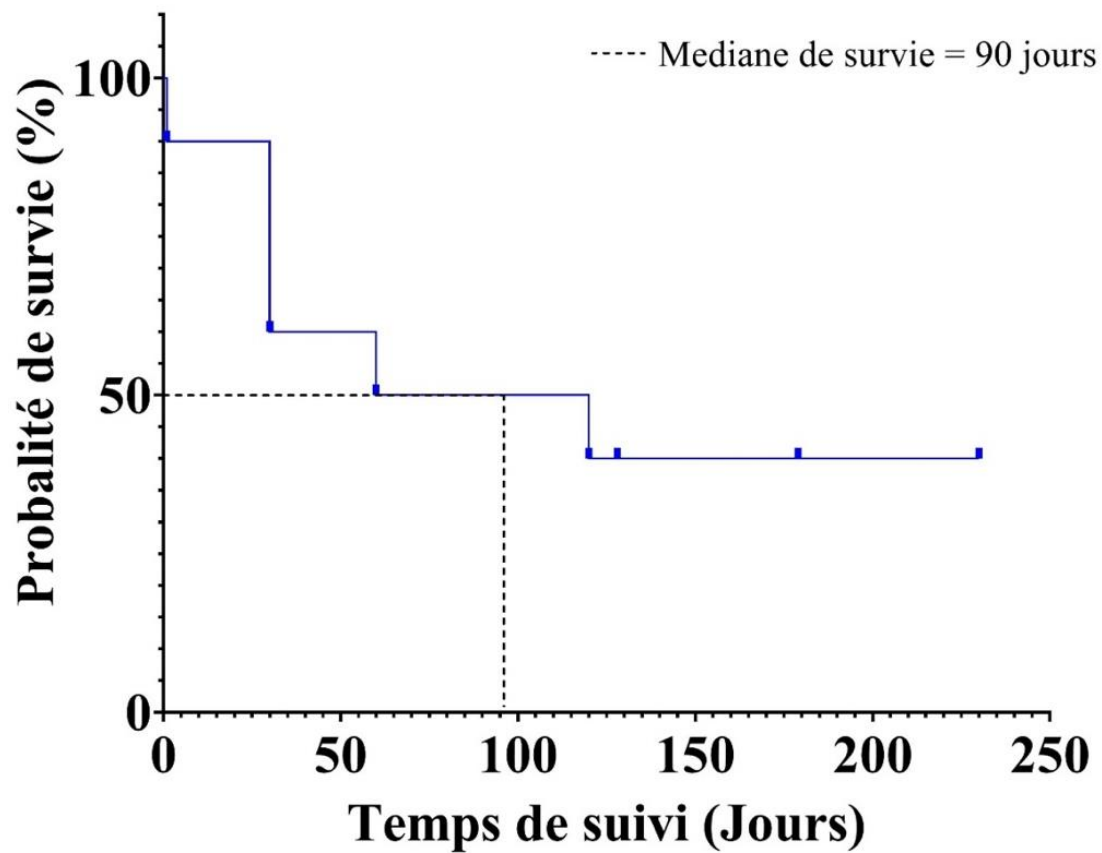


Figure 17: Diagramme de Kaplan Meier.

La médiane de survie des patients était de 90 jours avec un intervalle de confiance à 95%.

Tableau V: Probabilité de décès.

Temps de suivi (jours)	Probabilités (%) de décès
0	100
1	90
30	60
60	50
120	40
128	40
179	40
230	40

Après 120 jours, 6 des 10 patients étaient décédés.

5.2 Données sur la mise au point de la technique 3D FISH :

Tableau VI: Degré de digestion nucléaire en fonction de la concentration et du temps de traitement par la pepsine.

Temps de traitement en minutes	Concentration de pepsine en %			
	0,01	0,025	0,05	0,1
5	---	---	-	++
10	----	--	+/-	+++
20	---	--	+	+++

- ou -- ou ---: Moins digéré

+/- : Digestion adéquate

+ ou ++ ou +++ : Trop digéré

Le degré de la digestion nucléaire par la pepsine a été évalué en fonction de l'intensité des signaux télomériques et de la structure 3D nucléaire en fonction de la coloration DAPI. Les concentrations 0.01% et 0.025% de pepsine aux différents temps de digestion n'étaient pas adéquates car l'intensité des signaux télomériques était très faible. À l'autre extrême, une concentration à 0,1% donnait une digestion nucléaire très prononcée qui s'était manifestée par un changement de la structure 3D nucléaire (réduction de l'épaisseur nucléaire et aspect chevelu du noyau). La concentration 0,05% à 10 minutes était appropriée car les signaux télomériques étaient intenses et la structure 3D nucléaire était conservée. La concentration de pepsine à 0.05% avec un temps de traitement de 10 min été retenue pour le protocole utilisé dans l'évaluation des paramètres 3D télomériques.

Tableau VII: Qualité de l'hybridation en fonction de la température et du temps d'hybridation avec la sonde télomérique.

Temps d'hybridation en minutes	Température en degré Celsius	
	80	85
3	+	++
5	+	+++
10	++	+++

+ : Hybridation insuffisante

++ : Hybridation moyenne

+++ : Bonne Hybridation

La qualité de l'hybridation a été appréciée en fonction de l'intensité des signaux télomériques. Plus les signaux télomériques étaient intenses, plus l'hybridation était de bonne qualité. La température d'hybridation à 85° C pendant 10 minutes a été retenue pour le protocole utilisé dans l'évaluation des paramètres 3D télomériques.

Tableau VIII: Rapport intensité du signal télomérique sur bruit de fond en fonction de la température et du temps de lavage de la solution de lavage 1X.

Temps de lavage en minutes	Température en degré Celsius		
	37	55	65
5	---	+	-
10	---	+++	--
20	--	+++	---

- ou – ou --- : Hybridation de mauvaise qualité

+ : Hybridation de qualité moyenne

+++ : Hybridation de bonne qualité

La qualité de l'hybridation a été évaluée en fonction de l'intensité télomérique et du bruit de fond. Le lavage à 37° C a donné une mauvaise qualité d'hybridation car le bruit de fond était très élevé. Une bonne qualité d'hybridation a été observée avec une température de lavage à 55° C (10 ou 20 minutes). La température du lavage à 55° C aussi donnait une hybridation de qualité moindre car l'intensité des signaux télomériques était faible. La température de lavage à 55° C pendant 10 minutes a été retenue pour le protocole utilisé dans l'évaluation des paramètres 3D télomériques.

Tableau IX: Caractéristiques de l'imagerie cellulaire

Caractéristiques de l'imagerie cellulaire				
Patients	Nombre de champ de 40X	Nombre de cellules par champ	Nombre de cellules pathologiques par champ	Nombre d'heures consacré dans le choix des cellules
P1	170	114,33	4,62	73
P2	80	185,4	4,5	23
P3	40	215,5	9,58	94
P4	146	155,2	2,76	25
P5	90	142,29	1,76	70
P6	80	214,6	1,98	12
P7	140	189,6	4,58	49
P8	50	189,6	3,71	49
P9	80	173	2	47
P10	66	31,07	2,1	11
Total	942	1610,59	37,59	453

Nous avons analysé 942 champs microscopiques pour choisir les cellules cibles de l'ensemble des 10 patients. Par conséquent, nous avons analysé environ 1 517 176 cellules pour l'ensemble des patients, et parmi ces cellules, 2200 cellules cibles (normales et cancéreuses) ont été choisies pour l'analyse 3D des télomères. Pour choisir ces cellules, nous avons consacré environ 453 heures et le choix des cellules a été le plus long pour le patient P3 (94 heures). Enfin, ce même patient P3 présentait le plus de densité cellulaire cancéreuse que les autres patients.

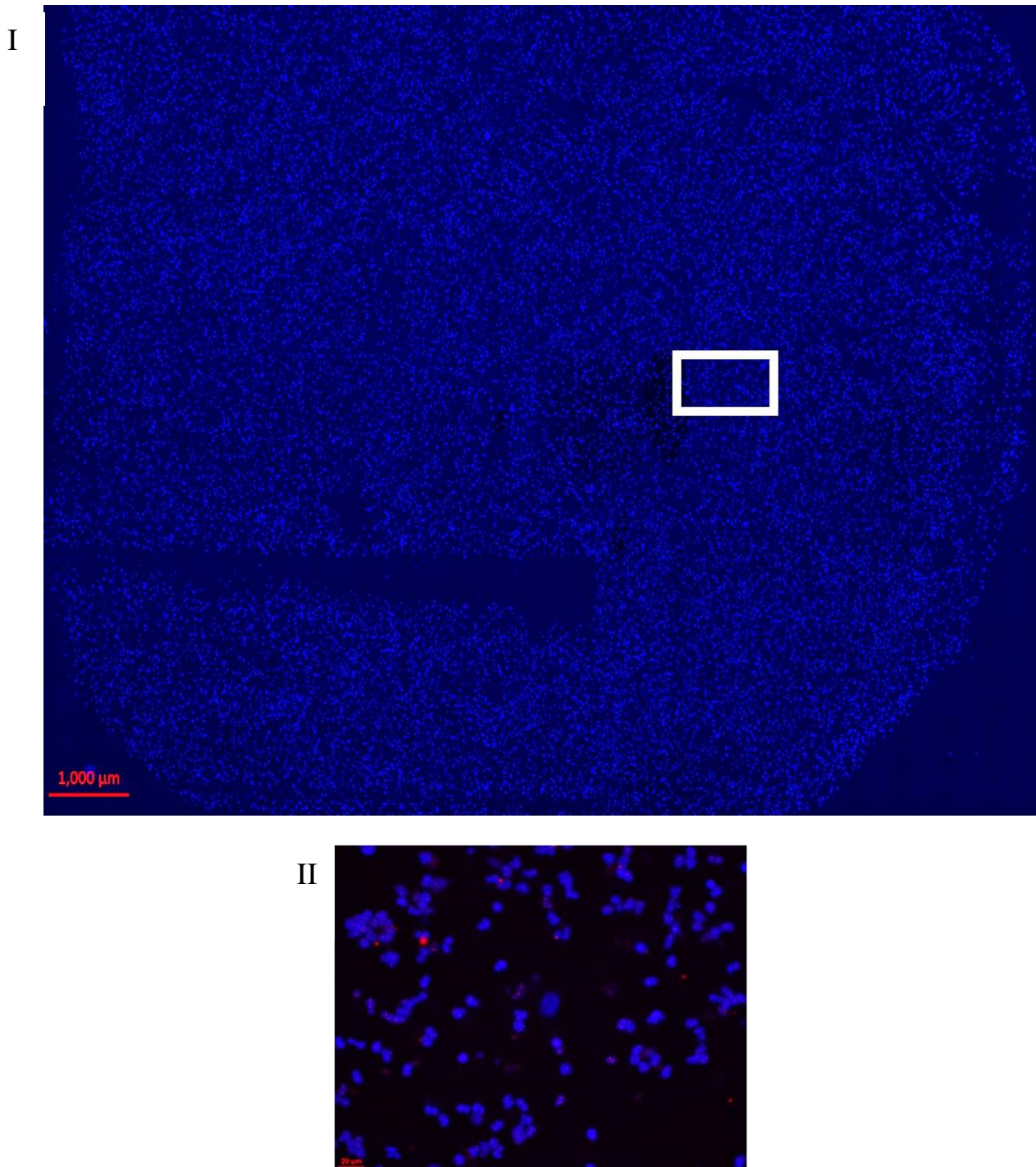


Figure 18: Image microscope à l'objectif 10X.

Représentation d'un champ microscopique à l'objectif 10X de l'étalement cellulaire de l'échantillon d'un patient. I). Les noyaux sont représentés par des points bleus (coloration DAPI). L'image II représente un agrandissement d'une section l'image I (partie encadrée).

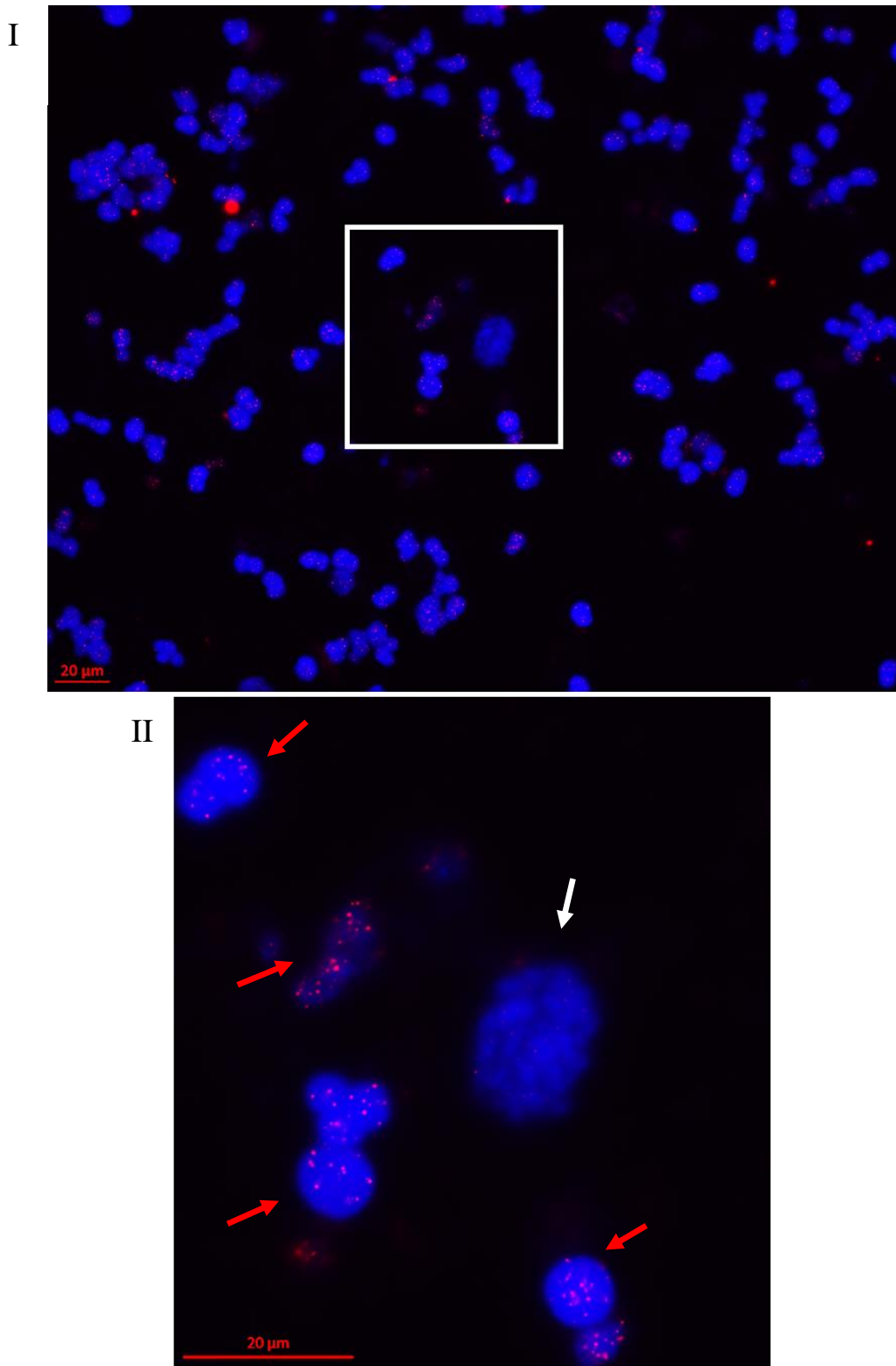


Figure 19: Image microscopique à l'objectif 40X.

Champ microscopique à l'objectif 40X de l'étalement cellulaire d'un patient. Sur l'image I), des dizaines de cellules normales sont présentes, et parmi elle, on peut identifier une cellule cancéreuse. L'Image II) représente un élargissement d'une section de l'image I) (encadrée). On

remarque la présence d'une cellule cancéreuse indiquée par la flèche blanche. Cette cellule se caractérise par des signaux télomériques d'intensité très faible alors que les cellules normales (indiquées par des flèches rouges) autour d'elle présentent des signaux télomérique plus intenses.

5.3 Données sur l'organisation nucléaire des télomères

5.3.1 Paramètres télomériques

Tableau X : Répartition des paramètres télomériques des patients pris globalement en fonction du type cellulaire.

Paramètres télomériques	Type cellulaire (médiane par cellule)		
	Normales	Pathologiques	Valeur <i>p</i>
Nombre total de signaux télomériques	26,00	45,00	< 0,001
Intensité moyenne de signaux télomériques	8770,16	7164,71	< 0,001
Nombre total d'agrégats télomériques	2	5	< 0,001
Indice de distribution nucléaire	2,39	5,58	< 0,001
Volume nucléaire (µm³)	303,28	655,91	< 0,001
Distance télomérique à partir du centre du noyau	2,20	1,52	< 0,001

Les cellules cancéreuses présentaient plus de télomères et d'agrégats télomériques, mais des télomères plus courts sont ceux des cellules normales. Les noyaux des cellules tumorales étaient deux fois grands que ceux des cellules normales. L'indice de distribution nucléaires des télomères qui correspond à l'index de prolifération cellulaire était aussi deux fois plus élevé dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales. Enfin, les télomères des cellules cancéreuses avaient une localisation nucléaire plus centrale que périphérique lorsqu'ils sont comparés à ceux des cellules normales.

5.3.2 Nombre de signaux télomériques

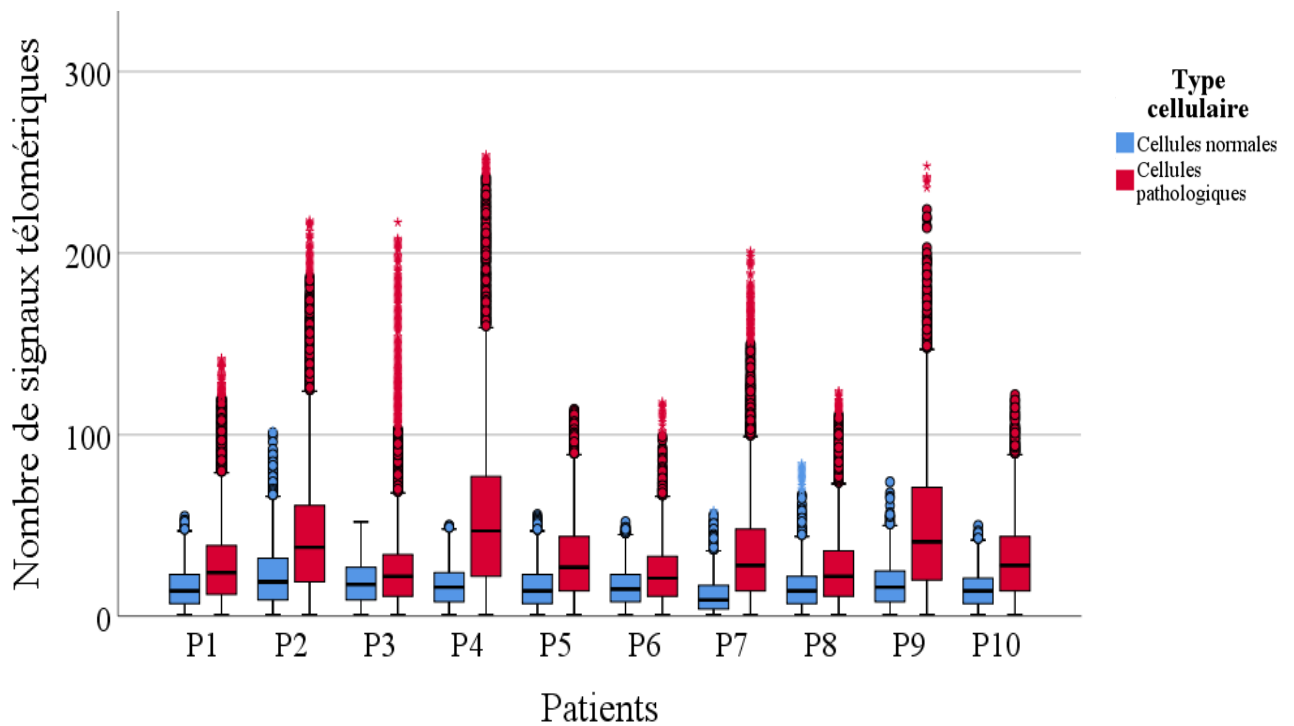


Figure 20: Représentation du nombre des signaux télomériques par le diagramme de boîte à moustaches.

Nous observons que chez chaque patient la médiane du nombre de signaux télomériques par cellule était plus élevée dans les cellules pathologiques que celui des cellules normales. En outre, les cellules pathologiques étaient plus hétérogènes en terme du nombre des télomères par cellule que les cellules normales. Chez au moins 4 patients, on retrouvait plus de 200 télomères par noyau dans certaines cellules pathologiques. Les 3 patients P4, P9 et P2 avaient plus de télomères dans leur cellules cancéreuses que les autres patients.

5.3.3 Intensité des signaux télomériques

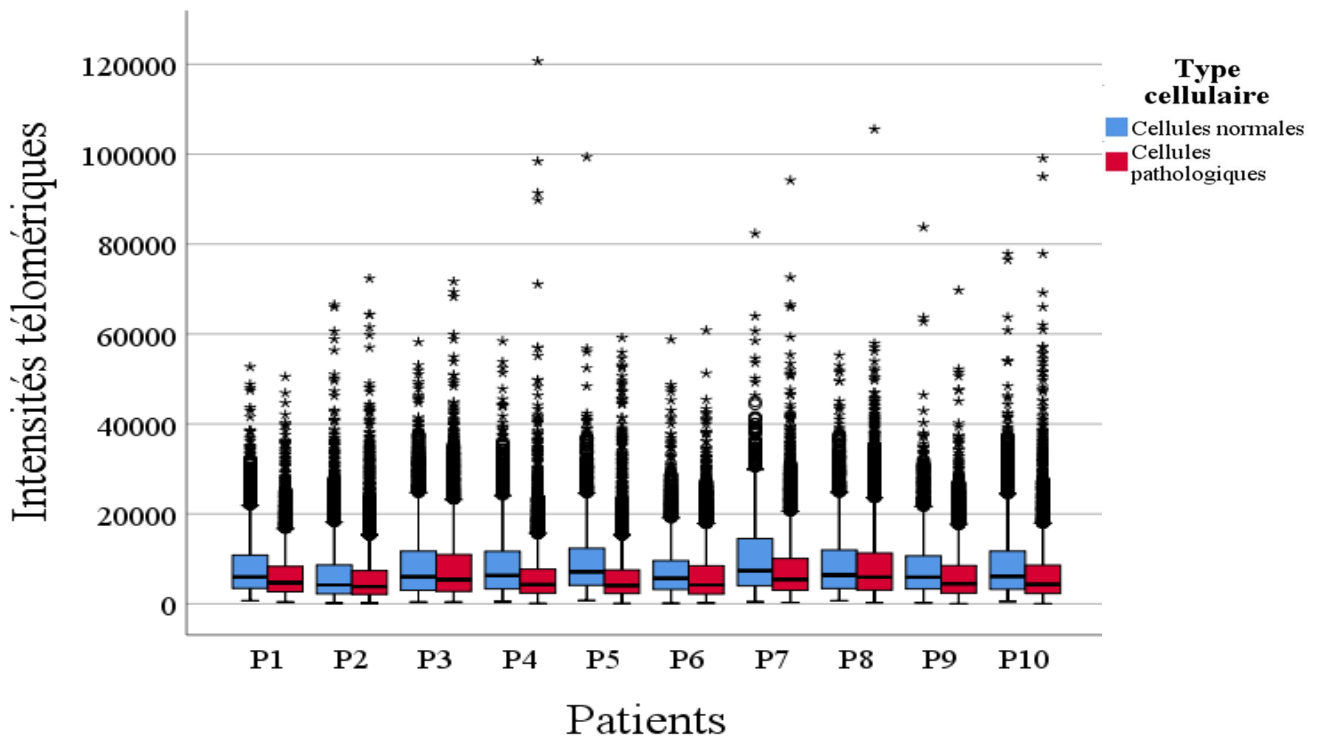


Figure 21: Représentation de l'intensité des signaux télomériques par le diagramme de boîte à moustaches.

Nous avons constaté chez chaque patient que la médiane l'intensité télomérique dans les cellules pathologiques sont plus faible par rapport aux cellules normales.

5.3.4 Nombre d'agrégats télomériques

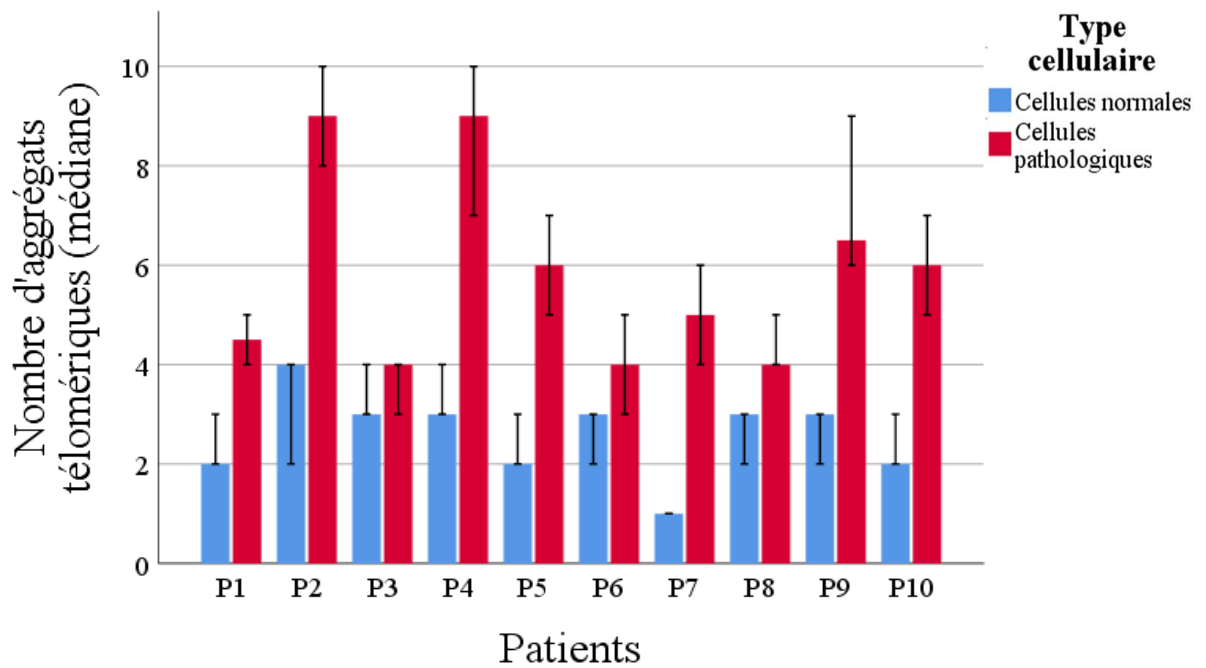


Figure 22: Représentation du nombre médian d'agrégats télomériques par cellule par le diagramme en Barres.

Chez tous les patients à l'exception de P3, les cellules cancéreuses présentaient plus d'agrégats télomériques que celles normales. Les trois patients qui avaient plus d'agrégats télomériques dans leurs cellules tumorales que les autres étaient P2, P4 et P9.

5.3.5 Indice de distribution nucléaire des télomères :

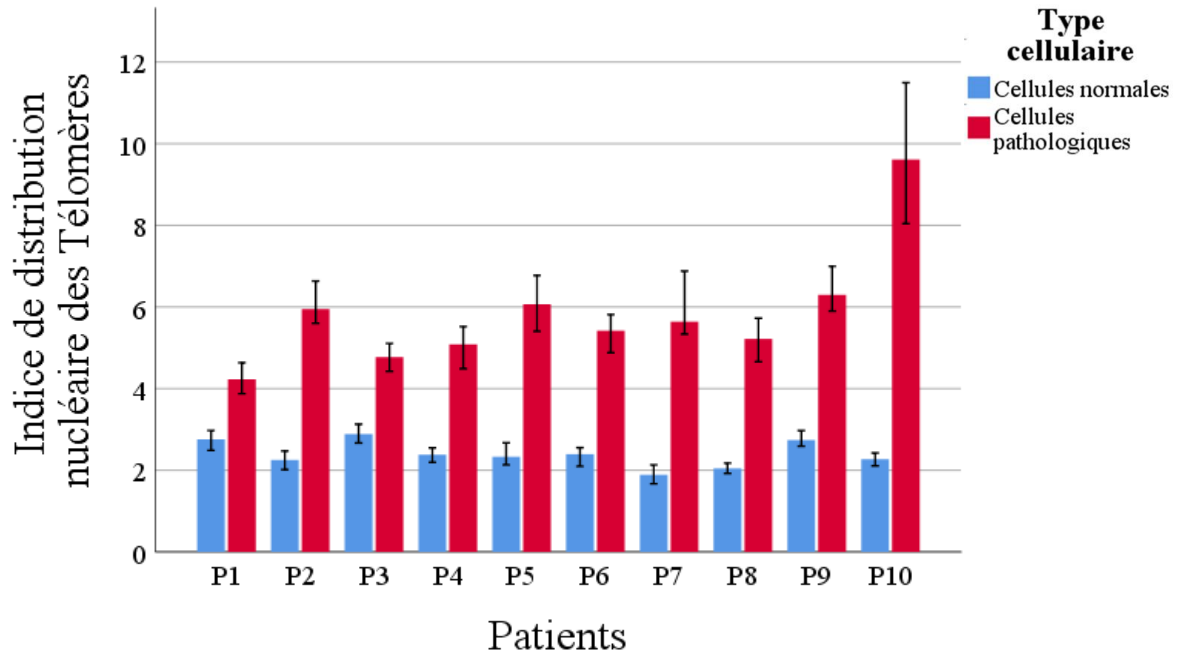


Figure 23: Représentation de l'indice de distribution nucléaire des télomères par le diagramme en Barres.

L'indice de distribution nucléaire des télomères était plus élevé dans les cellules pathologiques que dans celles normales chez tous les patients. Cet index était au-delà de quatre par cellule dans les cellules cancéreuses de tous les patients. Les cellules tumorales des patients P10, P9 et P5 présentaient plus de désorganisation nucléaire des télomères que celles des autres patients.

5.3.6 Distance des télomères à partir du centre du noyau

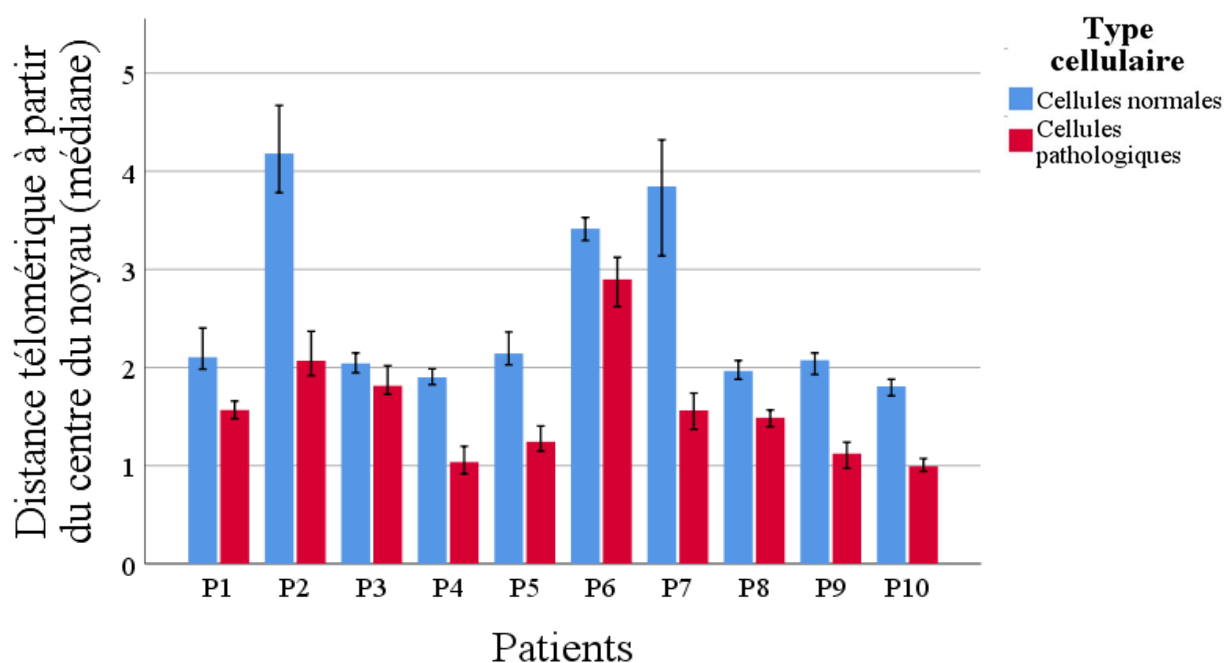


Figure 24: Représentation de la relative distance des télomères à partir du centre nucléaire par le diagramme en Barres.

Tous les patients avaient des cellules pathologiques dont les télomères étaient situés plus près du centre nucléaire par rapport aux cellules normales. Les cellules normales des patients P6, P7 et P2 présentaient des télomères qui étaient situés plus à la périphérie par rapport aux autres patients.

5.3.7 Volume nucléaire :

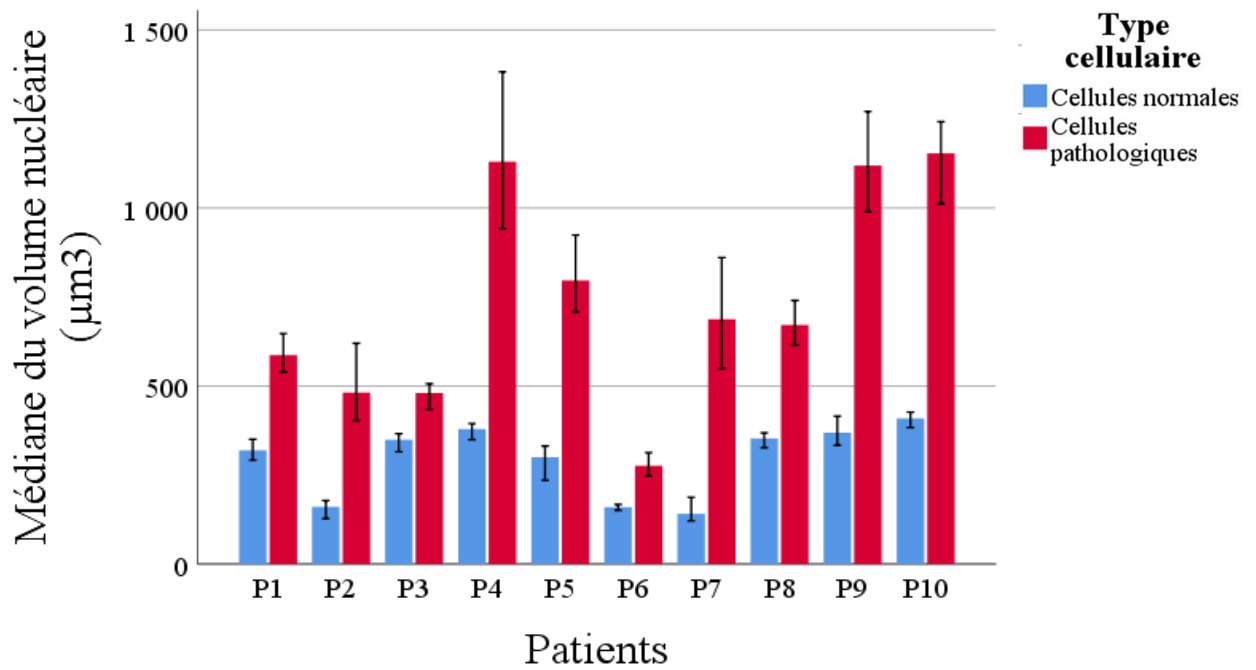


Figure 25: Représentation du volume nucléaire par le diagramme en Barres.

Les noyaux des cellules tumorales étaient plus volumineux que ceux des cellules normales chez tous les patients. Chez les patients P4, P9 et P10, le volume médian nucléaire des cellules pathologiques étaient au-delà de 1000 mm³.

5.3.8 Hétérogénéité cellulaire

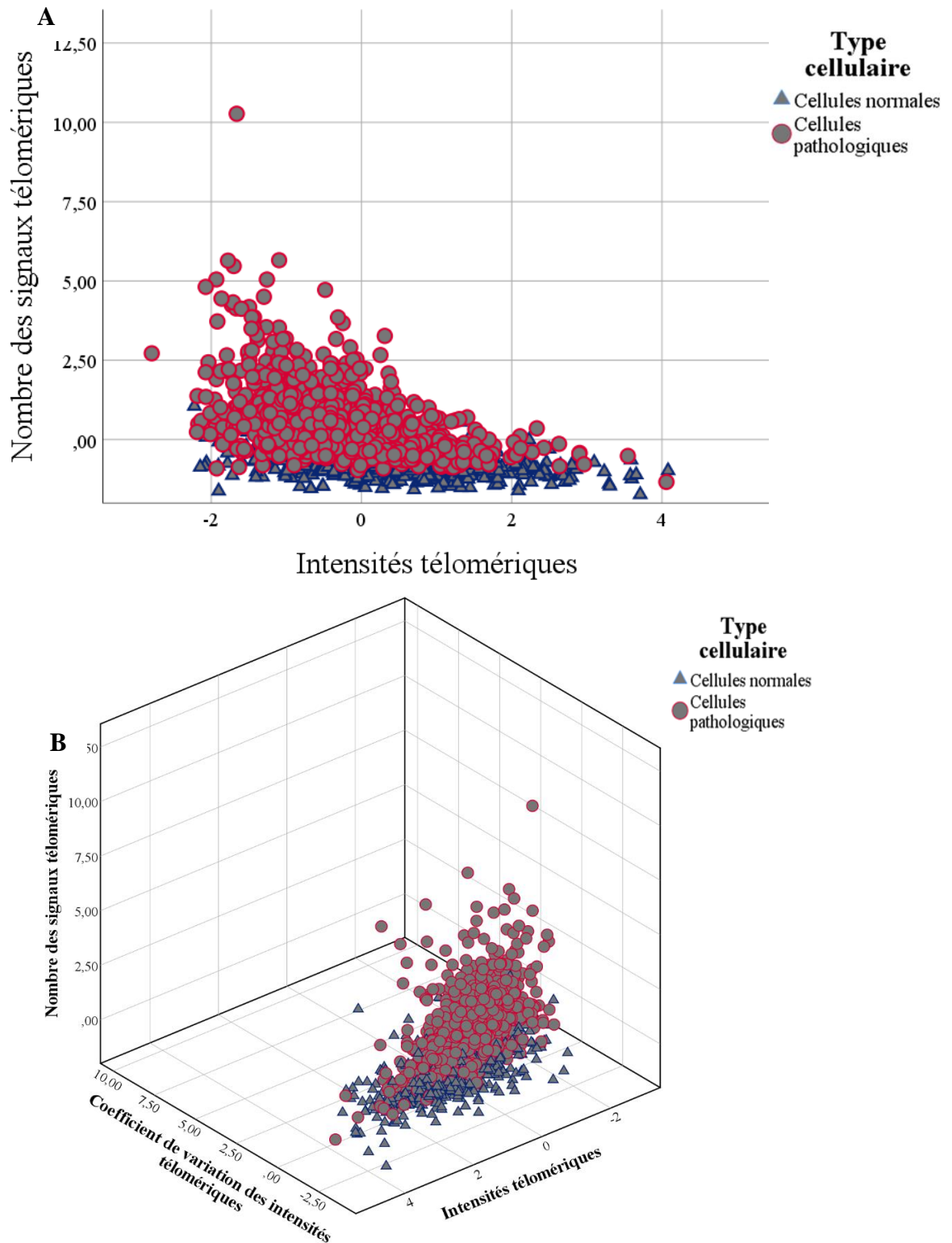


Figure 26 : Diagramme de dispersion cellulaire.

La figure 26.A) est la représentation de la dispersion cellulaire en 2D en fonction du nombre des télomères et de leur intensité. La figure 26.B) représente la dispersion cellulaire en 3D

fonction du nombre des télomères, de leur intensité, et du coefficient de variation de l'intensité télomérique

Les diagrammes de dispersions A et B montrent que les cellules pathologiques sont plus dispersées par rapport aux cellules normales. Donc elles sont plus hétérogènes que les cellules normales ($p < 0,000001$).

5.4 Corrélation entre les données cliniques et télogénomiques

5.4.1 Description clinique et télogénomique des patients

Patient P1 :

Il s'agit d'un patient de 33 ans avec un ATCD de schistosomiase urinaire ayant présenté, 6 mois avant de consulter en urologie, une dysurie, une hématurie terminale et des brûlures mictionnelles. L'examen physique a retrouvé une douleur à la palpation de l'hypogastre et du plancher vésical et une pâleur des conjonctives palpébrales.

Le bilan biologique a montré une anémie, une infection urinaire à *pseudomonas Spp* et une fonction rénale conservée. À l'uro-scanner, on a retrouvé un processus tumoral vésical avec des localisations secondaires ganglionnaires satellites, une urétéro- hydronéphrose bilatérale et un nodule condensant de T12.

Après la résection de la tumeur, l'examen anatomopathologique a précisé le diagnostic d'un carcinome épidermoïde moyennement différencié, associé à une cystite bilharzienne. La musculature était infiltrée par la tumeur. L'évolution a été marquée par le décès du patient 4 mois après le diagnostic.

Les données génomiques des télomères montraient une altération de leur organisation nucléaire dans les cellules pathologiques (Figure 27) et tous les paramètres définissant cette organisation étaient affectés (Tableau XII). En outre, on a retrouvé une hétérogénéité cellulaire (Figure 28). Cependant, l'index définissant cette hétérogénéité et celui de la distribution nucléaire des télomères étaient parmi les moins élevés des 10 patients.

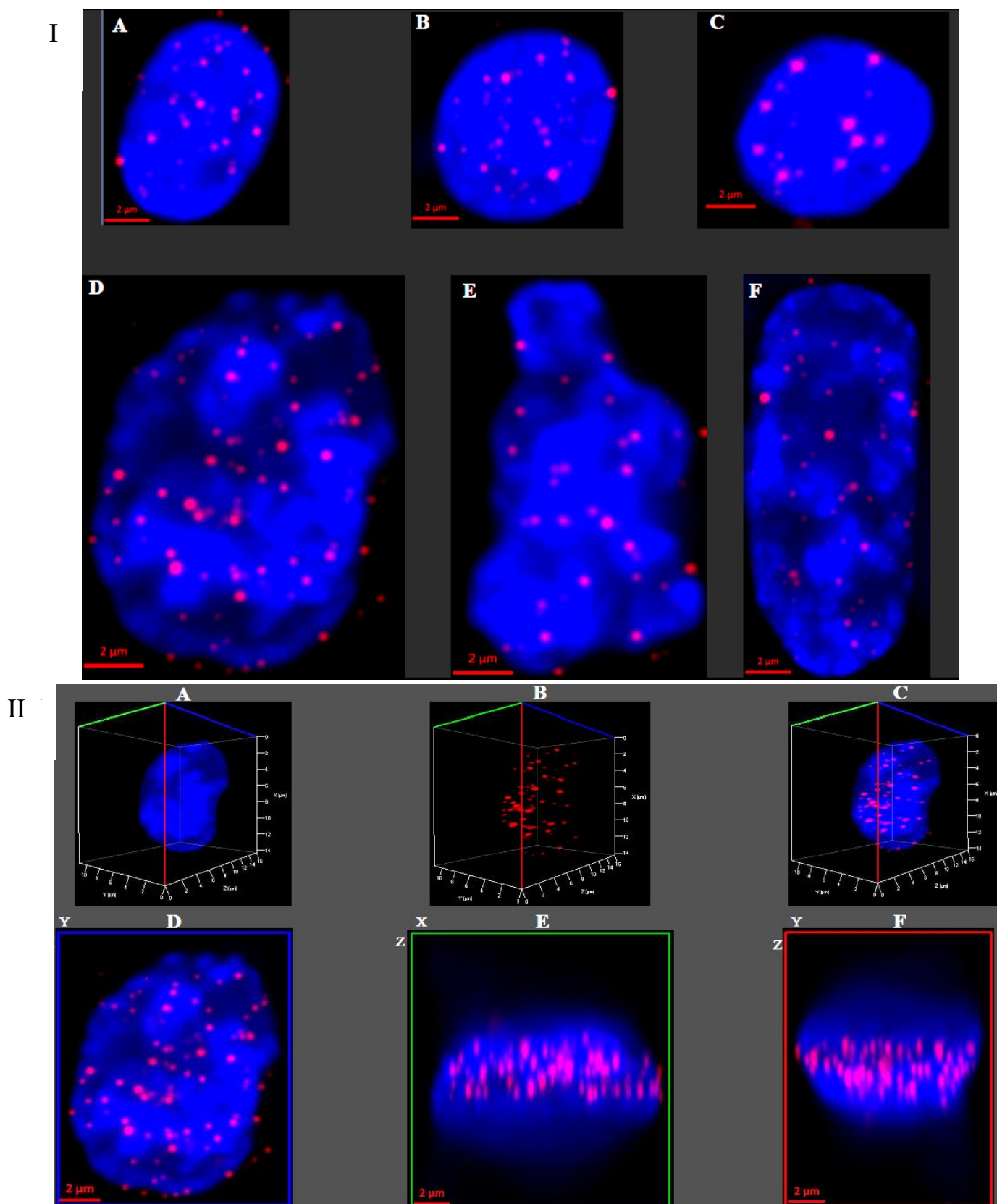


Figure 27 : Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P1.

Les images 2D (**I**) et 3D (**II**) des noyaux cellulaires (bleu) et de leurs télomères (rouge) ont été capturées et visualisées avec le logiciel ZenPro2.

Les images **IA**, **IB** et **IC** représentent des noyaux provenant de cellules normales. Ces noyaux étaient sphériques avec des contours réguliers et une chromatine dense. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux était environ 8,5 μm . Le nombre des télomères était moins élevé que dans les noyaux des cellules cancéreuses.

Les images **ID**, **IE** et **IF** représentent des noyaux de cellules cancéreuses et elles présentaient un pléomorphisme nucléaire avec des contours irréguliers de leur noyau. La chromatine des noyaux de ces cellules cancéreuses était lâche avec une distribution irrégulière. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux était environ 20 μm .

Les images **IIA** (noyau seul), **IIB** (télomères seuls) et **IIC** (noyau et télomères) sont la représentation 3D de l'image **ID**. Les images **IID**, **IIE** et **IIF** sont les projections des différents axes xy, xz et yz de l'image **ID**.

Tableau XI: Répartition des paramètres télomériques de **P1** en fonction du type cellulaire.

Paramètres télomériques	Type cellulaire (médiane)		Valeur <i>p</i>
	Normales	Pathologiques	
Nombre total de signaux télomériques	23,50	38,50	< 0,001
Intensité moyenne de signaux télomériques	8352,09	6924,24	0,003
Nombre total d'agrégats télomériques	2	5	< 0,001
Indice de distribution nucléaire	2,76	4,23	< 0,001
Volume nucléaire	319,41	586,56	< 0,001
Distance télomérique à partir du centre du noyau	2,10	1,57	< 0,001

Les paramètres télomériques suivants des cellules pathologiques : le nombre total de signaux télomériques, le nombre total d'agrégats télomériques, l'indice de distribution, le volume nucléaire e étaient statistiquement plus élevés que ceux des cellules normales.

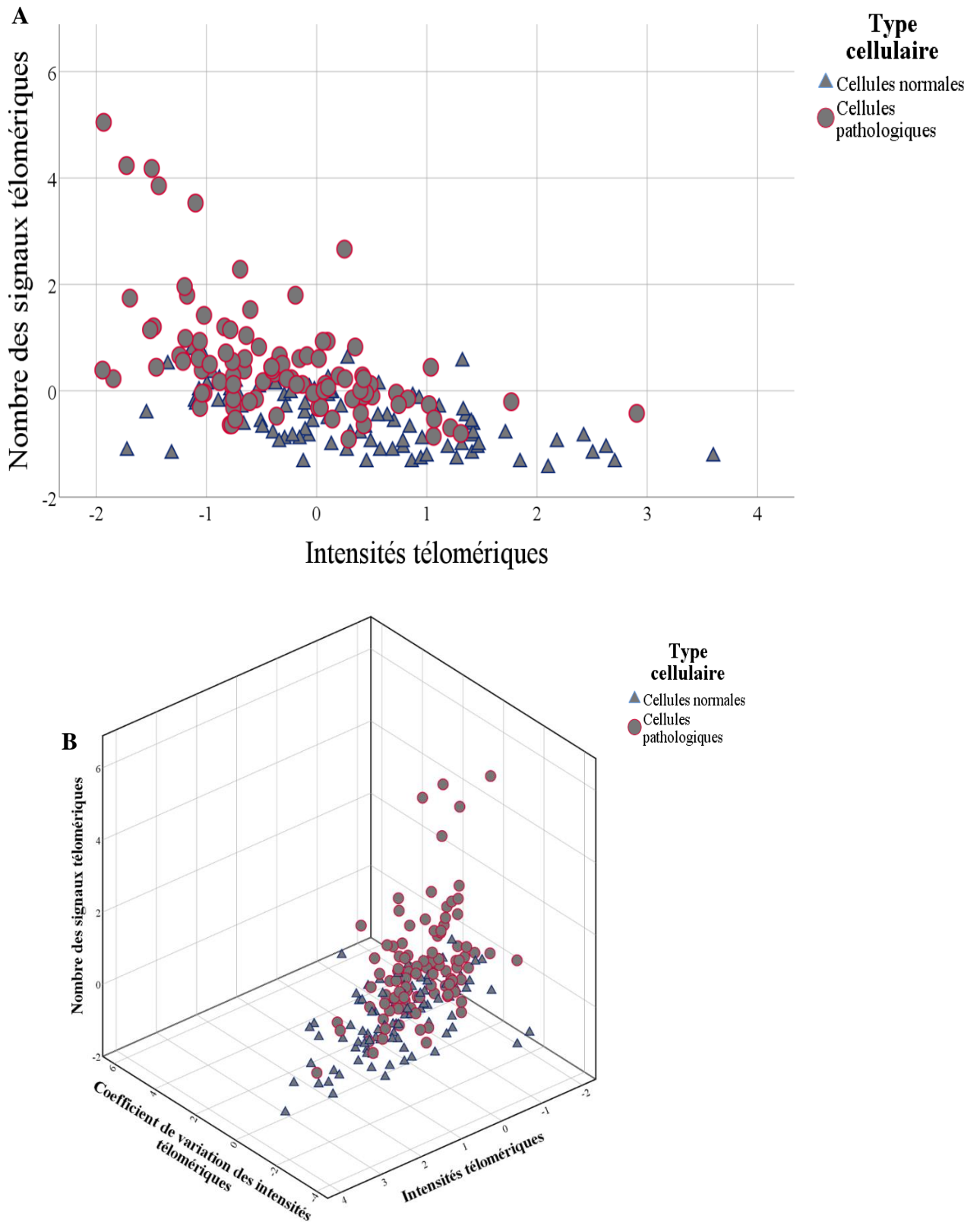


Figure 28 : Diagramme de dispersion cellulaire.

La figure 28. A) est la représentation de la dispersion cellulaire en 2D en fonction du nombre des télomères et de leur intensité. La figure 27. B) représente la dispersion cellulaire en 3D

fonction du nombre des télomères, de leur intensité, et du coefficient de variation de l'intensité télomérique.

L'index d'hétérogénéité cellulaire en 2D était plus élevé dans les cellules cancéreuses (1.5782) que celles normales (1.4236), ($p=3,8811E^{-14}$) En 3D, il n'y avait pas de différence statistique ($p=0,099$.) les index d'hétérogénéité des cellules cancéreuses (2.0375) et celles normales (2.0011).

Patient P2

C'est un patient de 64 ans ayant des antécédents de bilharziose urinaire. Il a présenté une dysurie, une hématurie terminale et des brûlures mictionnelles 6 mois avant d'effectuer une consultation urologique. L'examen physique a montré une douleur hypogastrique à la palpation. Les conjonctives palpébrales étaient pales.

L'examen biologique a montré une anémie, une infection urinaire à *Pantoea Sp* et une fonction rénale altérée. L'échographique pelvienne a conclu à la présence d'une masse tumorale vésicale, une urétéro-hydronephrose et une hypertrophie modérée de la prostate avec une calcification. À la cystoscopie, on a retrouvé une volumineuse tumeur de la vessie envahissant l'urètre. L'uro-scanner a montré un processus tumoral de la vessie avec une infiltration prostatique et une urétéro- hydronephrose bilatérale.

Après la résection de la tumeur, l'examen anatomopathologique a retrouvé un carcinome urothélial infiltrant le muscle de la vessie. L'évolution a été marquée par le décès du patient 2 mois après le diagnostic.

L'organisation nucléaire des télomères étaient altérée dans les cellules cancéreuses (Figure 29) et les paramètres caractérisant cette altération étaient très prononcés dans ces cellules cancéreuses du patient (Tableau XIII). Par exemple, le nombre et les agrégats télomériques des cellules cancéreuses étaient plus le double de ceux des cellules normales. En plus, le volume nucléaire des cellules cancéreuses représentait plus du triple de celui des cellules normales et les télomères avaient une localisation nucléaire plus périphérique. Il est à noter aussi que les télomères des cellules cancéreuses étaient plus courts et leur distribution nucléaire était très désorganisée. Enfin, les cellules cancéreuses étaient plus hétérogènes et formaient un groupe cellulaire très distinct de celles normales.

En conclusion, le stade avancé clinique était en concordance avec le degré de l'instabilité génomique défini par le niveau prononcé de l'altération nucléaire des télomères.

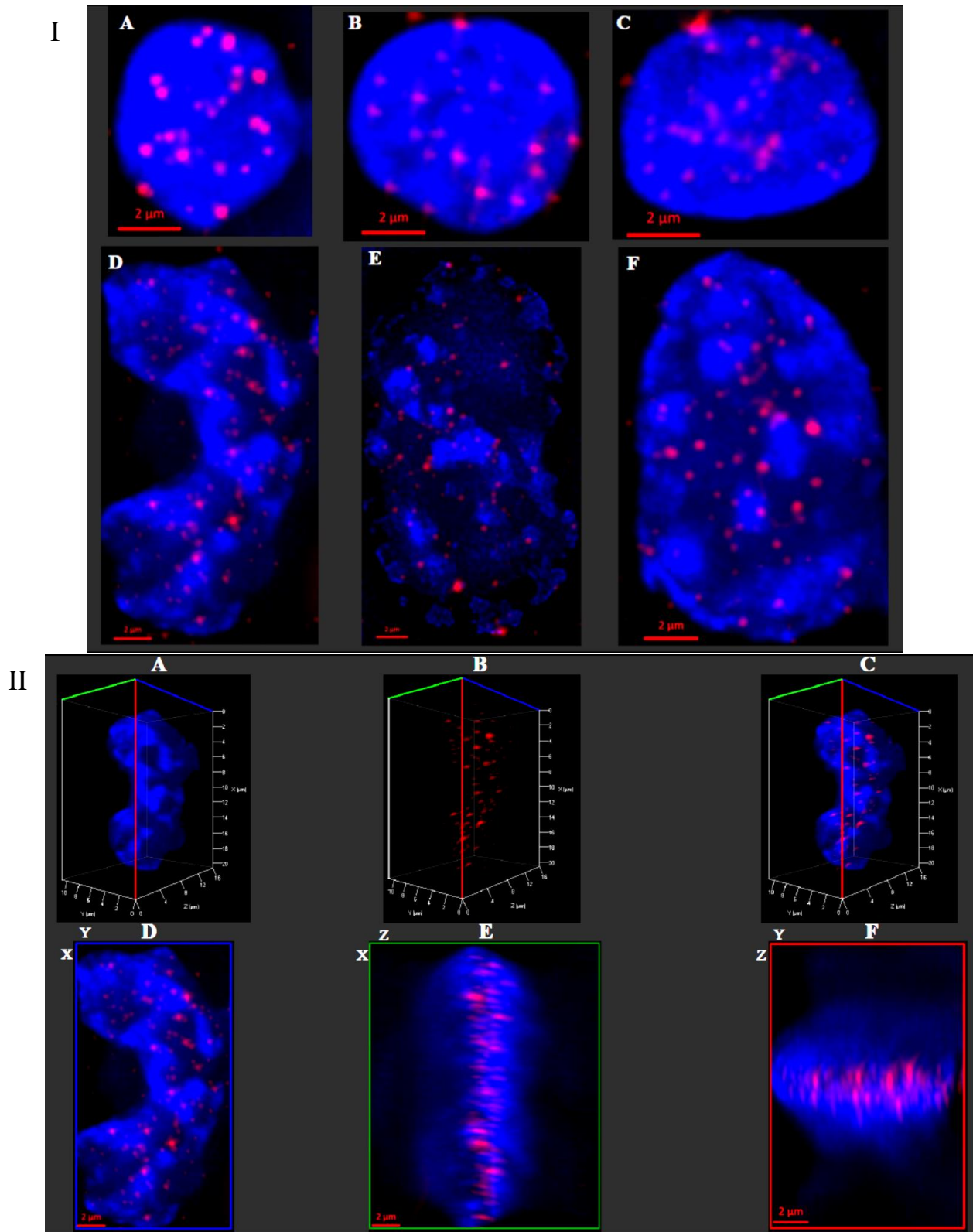


Figure 29 : Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P2.

Les images 2D (I) et 3D (II) des noyaux cellulaires (bleu) et de leurs télomères (rouge) ont été capturées et visualisées avec le logiciel ZenPro2.

Les images **IA**, **IB** et **IC** représentent des noyaux provenant de cellules normales. Ces noyaux étaient formes sphériques avec des contours réguliers et une chromatine moins dense. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux était environ 7,5 μm . Les télomères de ces cellules normales étaient plus intenses que ceux des cellules cancéreuses. Cependant, le nombre des télomères était plus bas dans les cellules dans les cellules normales.

Les images **ID**, **IE** et **IF** représentent des noyaux des cellules cancéreuses. Les noyaux des cellules cancéreuses présentaient différentes tailles et avec des contours irréguliers de leur noyau. La chromatine des noyaux de ces cellules cancéreuses était très décondensée avec une distribution irrégulière. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux était environ 19 μm .

Les images **IIA** (noyau seul), **IIB** (télomères seuls) et **IIC** (noyau et télomères) sont la représentation 3D de l'image **ID**. Les image **IID**, **IIE** et **IIF** sont les projections des différents axes xy, xz et yz de l'image **ID**.

Tableau XII: Répartition des paramètres télomériques de **P2** en fonction du type cellulaire.

Paramètres télomériques	Type Cellulaire (médiane)		Valeur <i>p</i>
	Normales	Pathologiques	
Nombre total de signaux télomériques	34,00	68,00	< 0,001
Intensité moyenne de signaux télomériques	7202,34	6237,41	0,016
Nombre total d'agrégats télomériques	4	9	< 0,001
Index de distribution nucléaire	2,25	5,95	< 0,001
Volume nucléaire	160,71	481,72	< 0,001
Distance télomérique à partir du centre du noyau	4,18	2,07	< 0,001

Les paramètres télomériques des cellules pathologiques étaient différents de ceux des cellules normales.

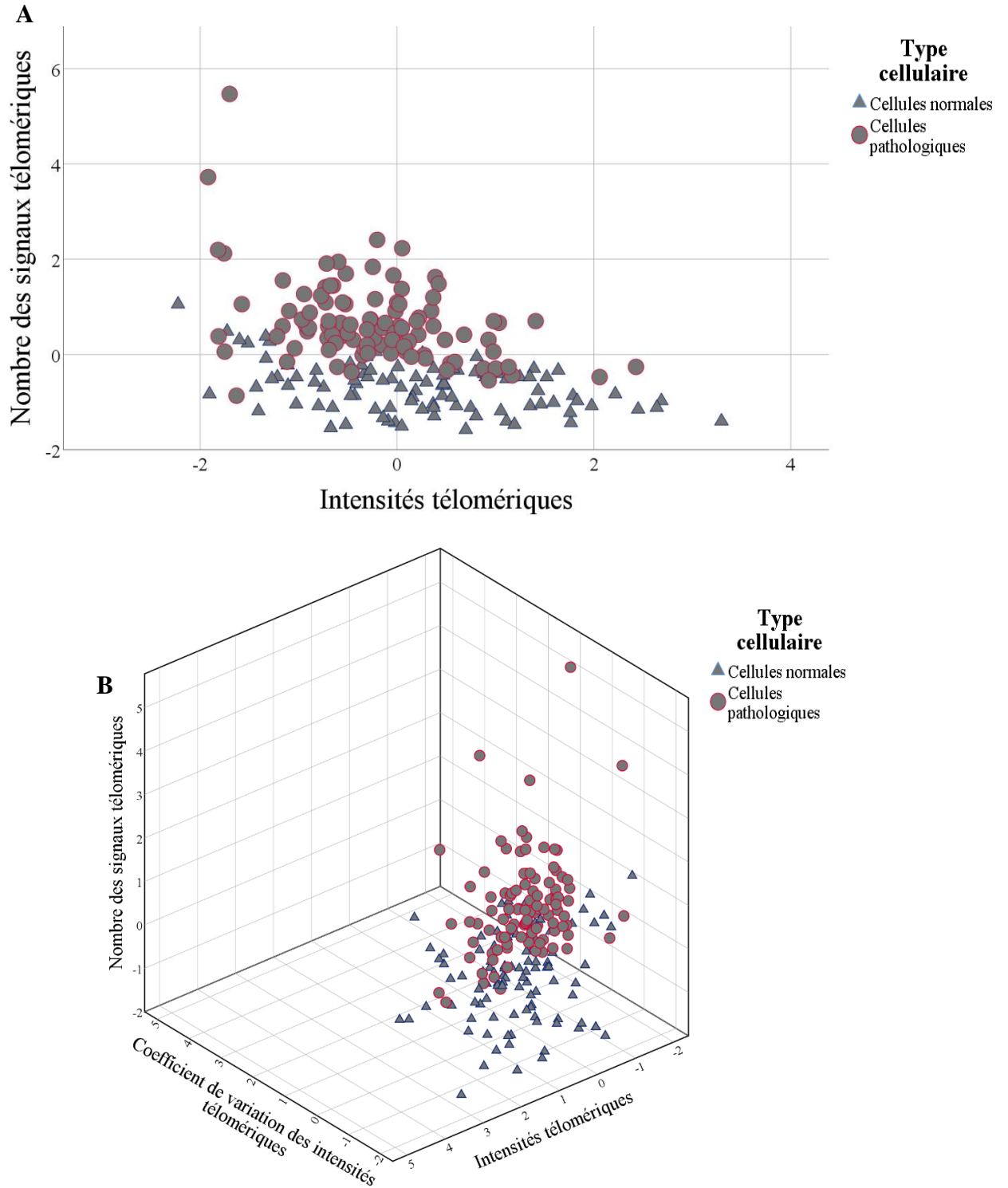


Figure 30: Diagramme de dispersion cellulaire.

La figure 30. A) est la représentation de la dispersion cellulaire en 2D en fonction du nombre des télomères et de leur intensité. La figure 30.B) représente la dispersion cellulaire en 3D fonction du nombre des télomères, de leur intensité, et du coefficient de variation de l'intensité télomérique.

Les index d'hétérogénéité cellulaire en 2D des télomères étaient de 1.4079 et 1,4837 pour les cellules pathologiques et normales, respectivement ($p=0,000050$). En 3D, l'index d'hétérogénéité cellulaire des cellules pathologiques (1,8279) étaient statistiquement moins élevés que celui des cellules normales (2,0980) ($p=1,1594^{E-38}$). **Patiente P3**

Il s'agit d'une patiente de 68 ans avec un ATCD de schistosomiase urinaire. La patiente a présenté une hématurie caillotante totale un mois avant la consultation urologique. L'examen physique a montré un pelvis mobile avec une induration de la base vésicale.

L'examen biologique a montré une anémie, une infection à *Escherichia coli* et une fonction rénale conservée. À l'uro-scanner, on a retrouvé un épaissement pariétal tumoral de la vessie sur séquelles de bilharziose, une infiltration tumorale de la graisse péri-vésicale, un envahissement du méat urétéral droit avec une urétéro- hydronéphrose homolatérale, et une adénopathie inguinale gauche.

Après la pelvectomie antérieure de Bricker, la patiente est décédée le lendemain de l'intervention et l'examen anatomopathologique de la tumeur n'a pas pu être réalisé.

L'étude des télomères a montré une altération nucléaire de leur organisation (Figure 31). Cependant, cette altération n'affectait que quatre des six paramètres définissant l'organisation nucléaire des télomères (Tableau XIV). Les cellules cancéreuses étaient plus hétérogènes que celles normales, mais un pourcentage élevé d'entre elles étaient similaires au regard du nombre et de l'intensité des télomères (Figure 32). Il est à noter que les cellules cancéreuses de la patiente présentaient un nombre d'agrégats télomériques plus bas que celui des autres patients (Figure 31). Bien vrai que la patiente présentait un envahissement locorégional de la tumeur, les cellules cancéreuses étaient génomiquement moins instable que celles des autres patients. La nature pathologique A l'exception de l'intensité moyenne des télomères et du nombre d'agrégats télomériques, tous les autres paramètres étaient statistiquement différents entre Les cellules pathologiques et celles normales. La tumeur et les facteurs liés au décès post opératoire de 24 heures pourraient nous édifier davantage

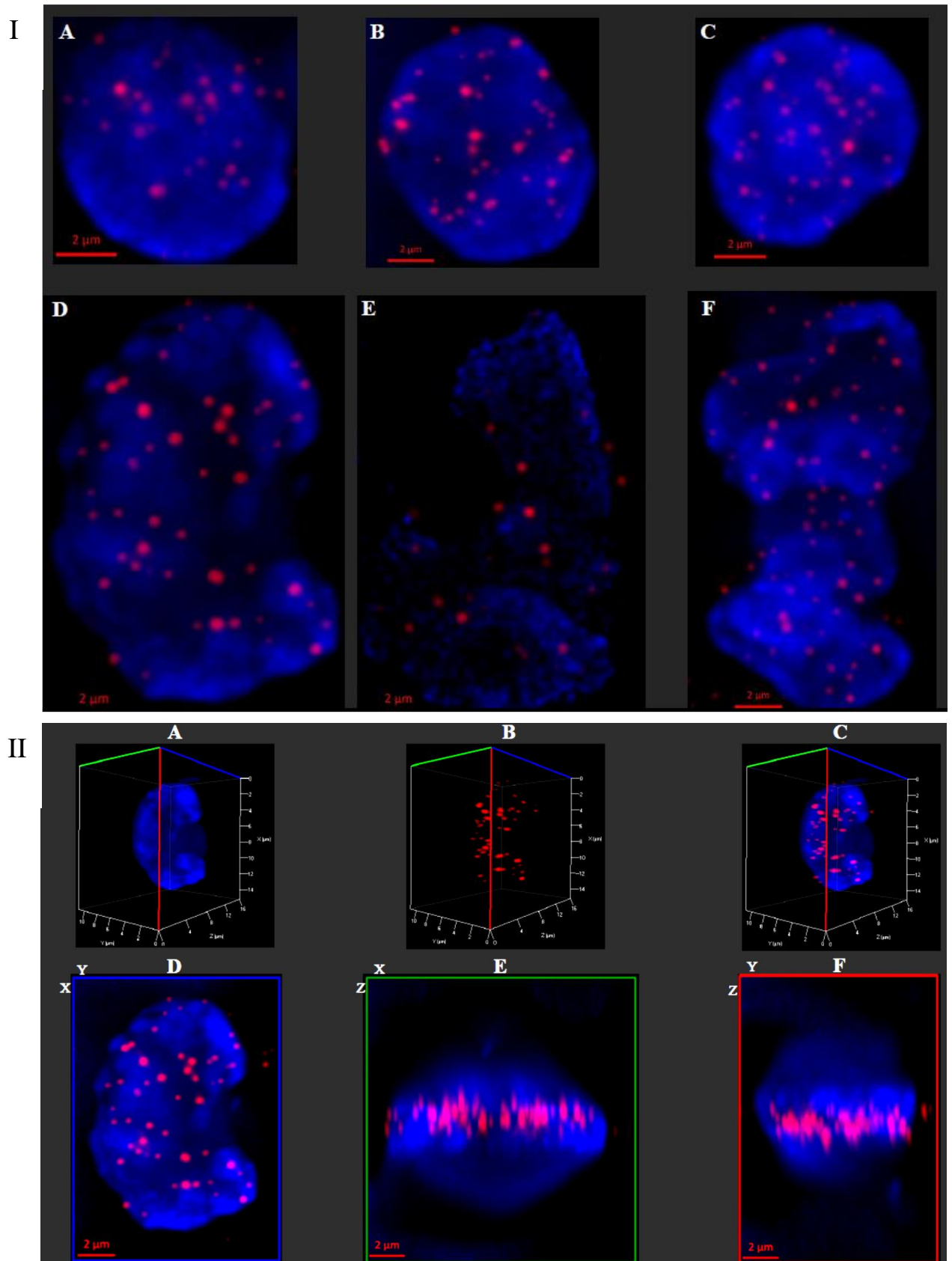


Figure 31 : Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P3.

Les images 2D (**I**) et 3D (**II**) des noyaux cellulaires (bleu) et de leurs télomères (rouge) ont été capturées et visualisées avec le logiciel ZenPro2.

Les images **IA**, **IB** et **IC** représentent des noyaux provenant de cellules normales. La plupart des noyaux sont sphériques avec une chromatine dense distribuée de façon homogène. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux est environ 9 μm . Les télomères de ces cellules normales sont plus intenses que ceux des cellules cancéreuses.

Les images **ID**, **IE** et **IF** représentent des noyaux des cellules cancéreuses et ces noyaux ont des formes différentes avec des contours irréguliers. La chromatine des noyaux de ces cellules cancéreuses est décondensée et cette décondensation varie en fonction de la cellule cancéreuse.

La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux est environ 19 μm .

Les images **IIA** (noyau seul), **IIB** (télomères seuls) et **IIC** (noyau et télomères) sont la représentation 3D de l'image **ID**. Les images **IID**, **IIE** et **IIF** sont les projections des différents axes xy, xz et yz de l'image **ID**.

Tableau XIII: Répartition des paramètres télomériques de **P3** en fonction du type cellulaire.

Paramètres télomériques	Type cellulaire (médiane)		Valeur <i>p</i>
	Normales	Pathologiques	
Nombre total de signaux télomériques	32,00	36,00	< 0,001
Intensité moyenne de signaux télomériques	8580,65	8561,64	0,888
Nombre total d'agrégats télomériques	3	4	0,554
Indice de distribution nucléaire	2,89	4,77	< 0,001
Volume nucléaire	349,20	480,39	< 0,001
Distance télomérique à partir du centre du noyau	2,04	1,81	0,034

À l'exception de l'intensité moyenne des télomères et du nombre d'agrégats télomériques, tous les autres paramètres étaient statistiquement différents entre les cellules pathologiques et celles normales.

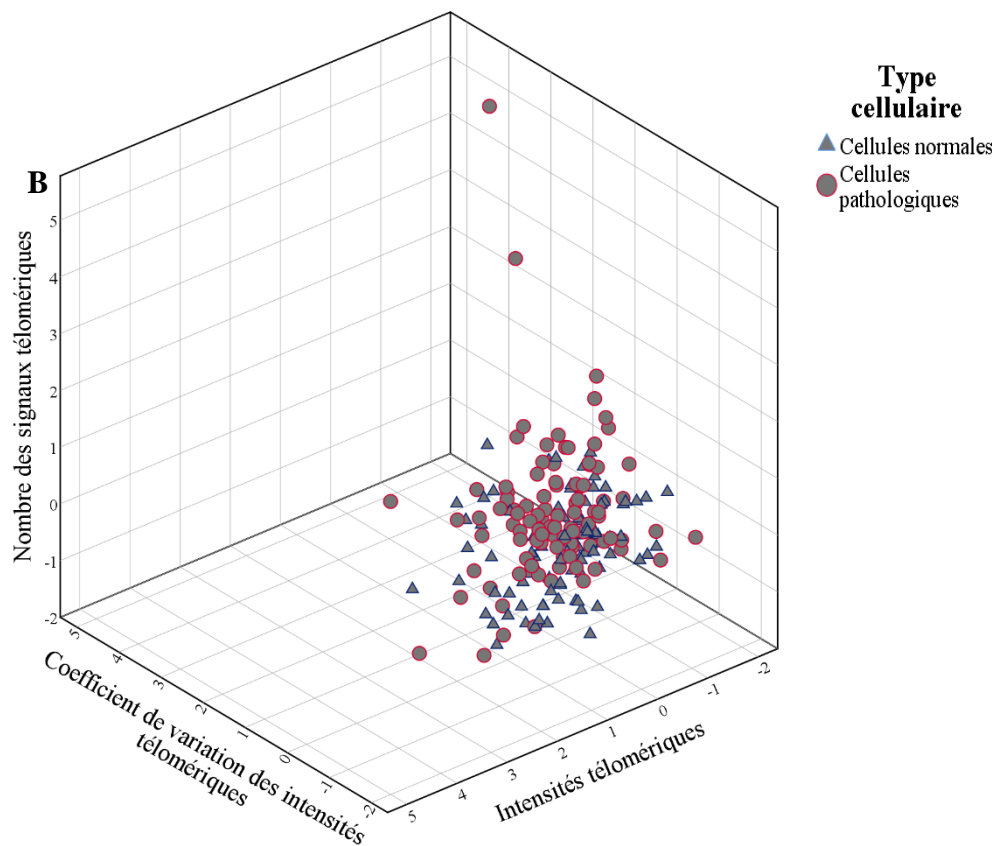
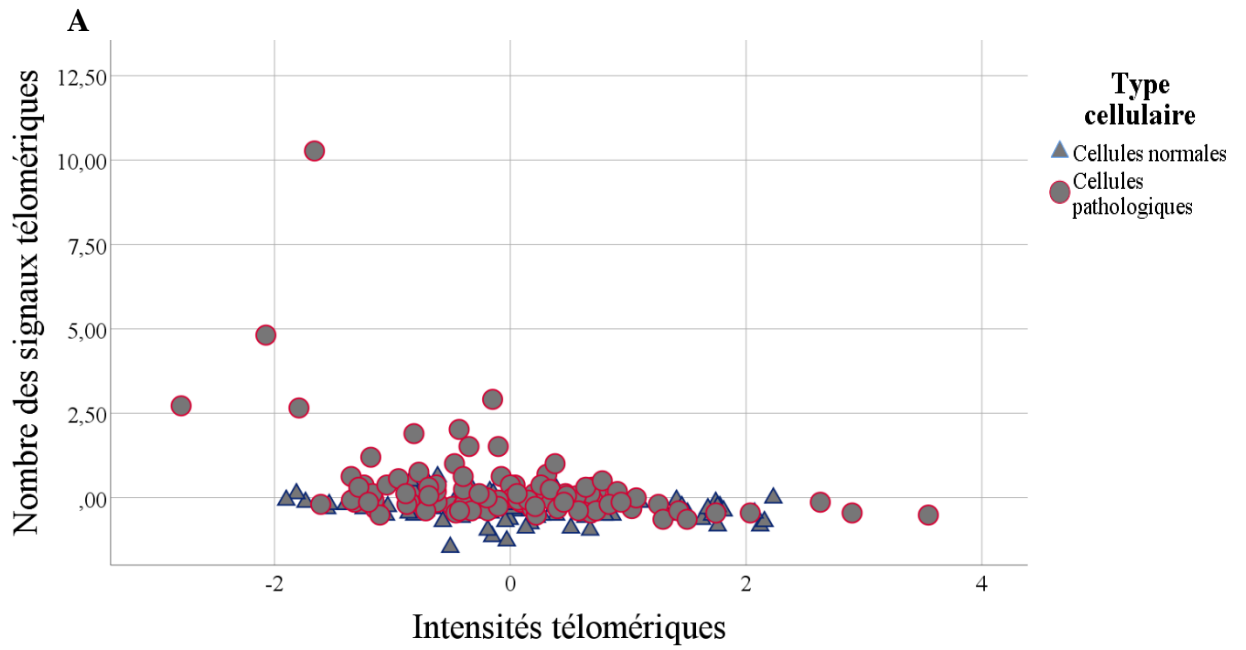


Figure 32 : Diagramme de dispersion cellulaire.

La figure 32. A) est la représentation de la dispersion cellulaire en 2D en fonction du nombre des télomères et de leur intensité. La figure 32. B) représente la dispersion cellulaire en 3D

fonction du nombre des télomères, de leur intensité, et du coefficient de variation de l'intensité télomérique.

Les index d'hétérogénéité cellulaire en 2D des télomères étaient de 1.6598 et 1.2536 pour les cellules pathologiques et normales, respectivement ($p=1,4856^{E-54}$). En 3D, l'index d'hétérogénéité cellulaire des cellules pathologiques (2.1813) étaient statistiquement plus élevés que celui des cellules normales (1.7729) ($p=1,1018^{E-49}$).

Patiente P4

Une patiente de 48 ans avec un ATCD de bilharziose urinaire a présenté progressivement une dysurie, une hématurie terminale et des brûlures mictionnelles 6 mois avant d'effectuer une consultation urologique. À l'examen physique, on a retrouvé une douleur à la palpation de l'hypogastrique et du plancher vésical. Les conjonctives palpébrales étaient pales.

L'examen biologique a montré une anémie, une infection à *Pantoea Sp* et une fonction rénale altérée. L'examen échographique pelvien a montré une masse vésicale d'allure tumorale, une urétéro-hydronéphrose. À la cystoscopie, on a retrouvé une volumineuse tumeur de la vessie envahissant l'urètre. L'uro-scanner a montré un processus néoplasique de la vessie avec une carcinose péritonéale pelvienne et une infiltration focale du sigmoïde.

Après la résection de la tumeur, l'examen anatomopathologique a retrouvé un adénocarcinome moyennement différencié de la vessie avec infiltration de la musculuse. La patiente a été mise sous chimiothérapie était vivante à la fin d'étude (2 mois de suivi).

L'analyse de l'organisation nucléaire des télomères (Figure 33) a montré une instabilité génomique des cellules pathologiques avec tous les paramètres télomérique significativement différente entre les cellules cancéreuses et normales (Tableau XV et Figure 34). Le volume nucléaire et le nombre total d'agrégats télomériques des cellules cancéreuses étaient le triple de ceux des cellules normales.

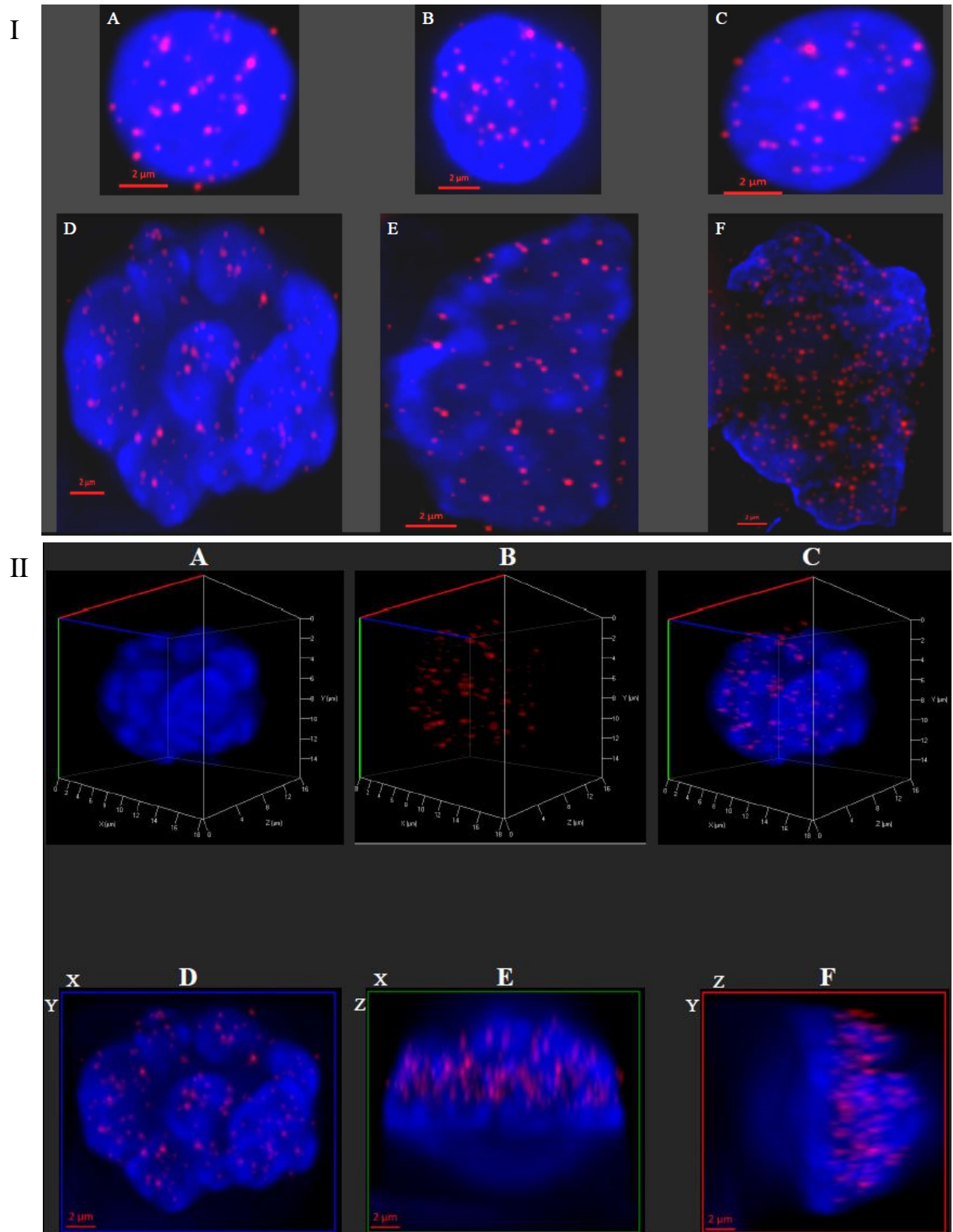


Figure 33: Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P4.

Les images 2D (I) et 3D (II) des noyaux cellulaires (bleu) et de leurs télomères (rouge) ont été capturées et visualisées avec le logiciel ZenPro2.

Les images **IA**, **IB** et **IC** représentent des noyaux provenant de cellules normales. Ces noyaux sont sphériques avec des contours réguliers et une chromatine dense. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux est environ 8 μm , ils ont des télomères plus intenses que ceux des cellules cancéreuses. Par contre, le nombre des télomères de ces cellules normales était moindre que celui des cellules cancéreuses.

Les images **ID**, **IE** et **IF** représentent des noyaux des cellules cancéreuses. Les noyaux de ces cellules sont polymorphes avec un remodelage prononcé de la chromatine. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux est environ 16 μm .

Les images **IIA** (noyau seul), **IIB** (télomères seuls) et **IIC** (noyau et télomères) sont la représentation 3D de l'image **ID**. Les images **IID**, **IIE** et **IIF** sont les projections des différents axes xy, xz et yz de l'image **ID**.

Tableau XIV: Répartition des paramètres télomériques de **P4** en fonction du type cellulaire.

Paramètres télomériques	Type cellulaire (médiane)		Valeur <i>p</i>
	Normales	Pathologiques	
Nombre total de signaux télomériques	28,00	78,50	< 0,001
Intensité moyenne de signaux télomériques	8925,65	6649,66	< 0,001
Nombre total d'agrégats télomériques	3	9	< 0,001
Indice de distribution nucléaire	2,38	5,08	< 0,001
Volume nucléaire	379,21	1130,14	< 0,001
Distance télomérique à partir du centre du noyau	1,90	1,04	< 0,001

Tous les paramètres télomériques étaient statistiquement différents entre les cellules pathologiques et celles normales.

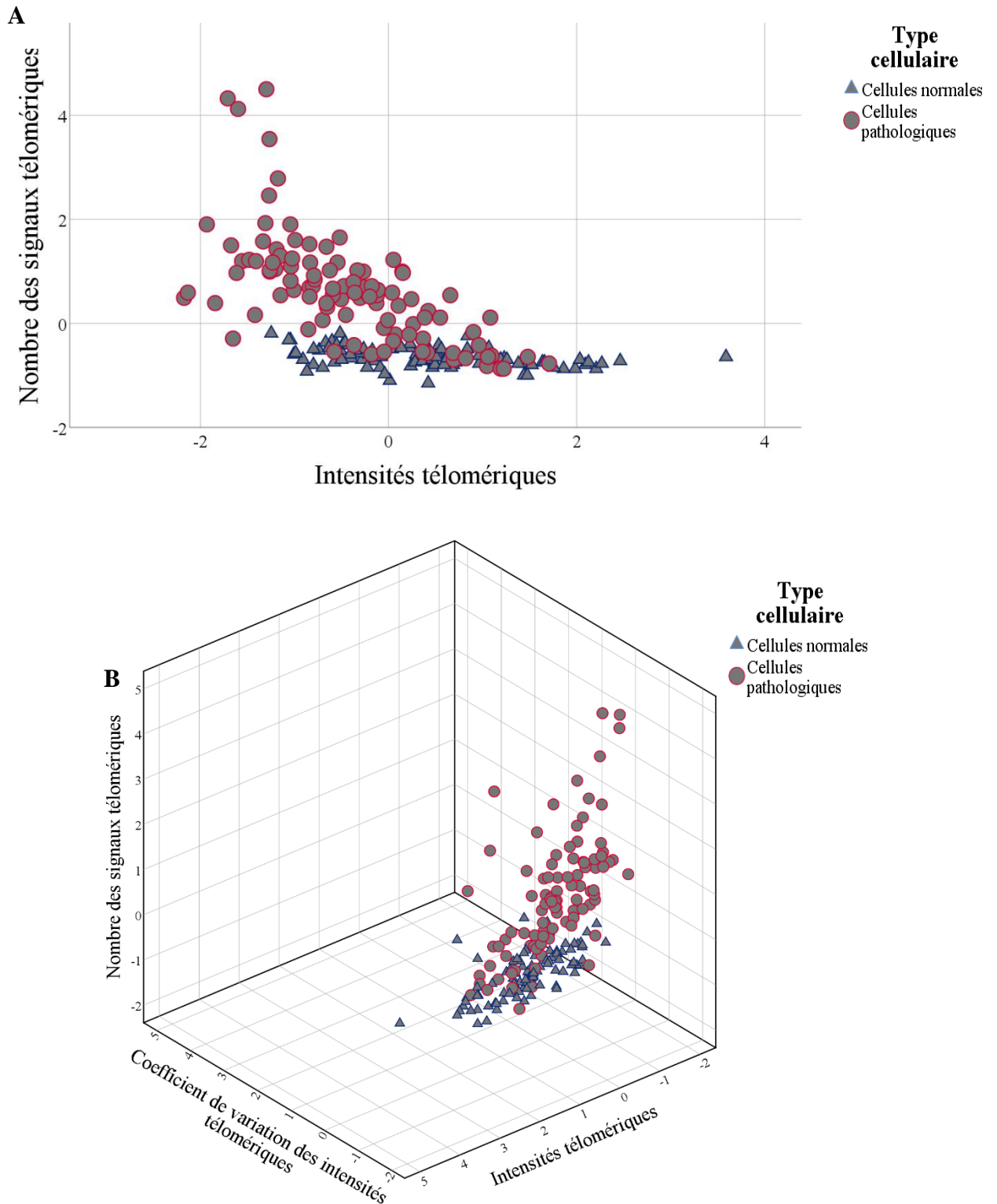


Figure 34: Diagramme de dispersion cellulaire.

La figure 34. A) est la représentation de la dispersion cellulaire en 2D en fonction du nombre des télomères et de leur intensité. La figure 34. B) représente la dispersion cellulaire en 3D fonction du nombre des télomères, de leur intensité, et du coefficient de variation de l'intensité télomérique.

Les index d'hétérogénéité cellulaire en 2D des télomères étaient de 1,6036 et 1,0994 pour les cellules pathologiques et normales, respectivement. En 3D, les valeurs de l'index d'hétérogénéité cellulaire des cellules pathologiques étaient de 2,0992 et 1,3053 pour les cellules normales. Les valeurs de ces index étaient statistiquement plus élevées dans les cellules pathologiques par rapport aux cellules normales en 2D ($p=4,632^{E-154}$) et 3D ($p=1,4952^{E-197}$)

197 patiente P5

C'est une patiente de 47 ans avec un ATCD d'infection urinaire à schistosomiase urinaire. Elle a présenté une dysurie, une hématurie totale et des brûlures mictionnelles deux ans avant la consultation urologique. À l'examen physique, a retrouvé une douleur hypogastrique et du plancher vésical, et des conjonctives palpébrales pales.

L'examen biologique a montré une anémie, une infection à *Echerichia Coli* et une fonction rénale altérée. On a observé à l'examen échographique un épaississement irrégulier et diffus de la paroi vésicale. La cystoscopie a montré une tumeur multifocale. L'uroscanner a retrouvé un processus tumoral vésical envahissant le 1/3 du vagin, avec des localisations secondaires ganglionnaires satellites et une urétéro- hydronéphrose bilatérale, et un nodule condensant de T12. La résection de la tumeur n'a pu être effectuée, et la patiente est décédée 1 mois après le diagnostic.

L'architecture nucléaire des télomères des cellules cancéreuses de la patiente était remodelée (Figure 35). L'analyse des paramètres télomériques (Tableau XVI) a montré que le nombre des signaux télomériques et le volume nucléaire étaient deux fois plus élevés dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normale. De même, le nombre d'agrégats télomériques étaient le triple dans les cellules pathologiques par rapport aux cellules normale. Enfin, les cellules cancéreuses étaient plus hétérogènes que celles normales (Figure 36).

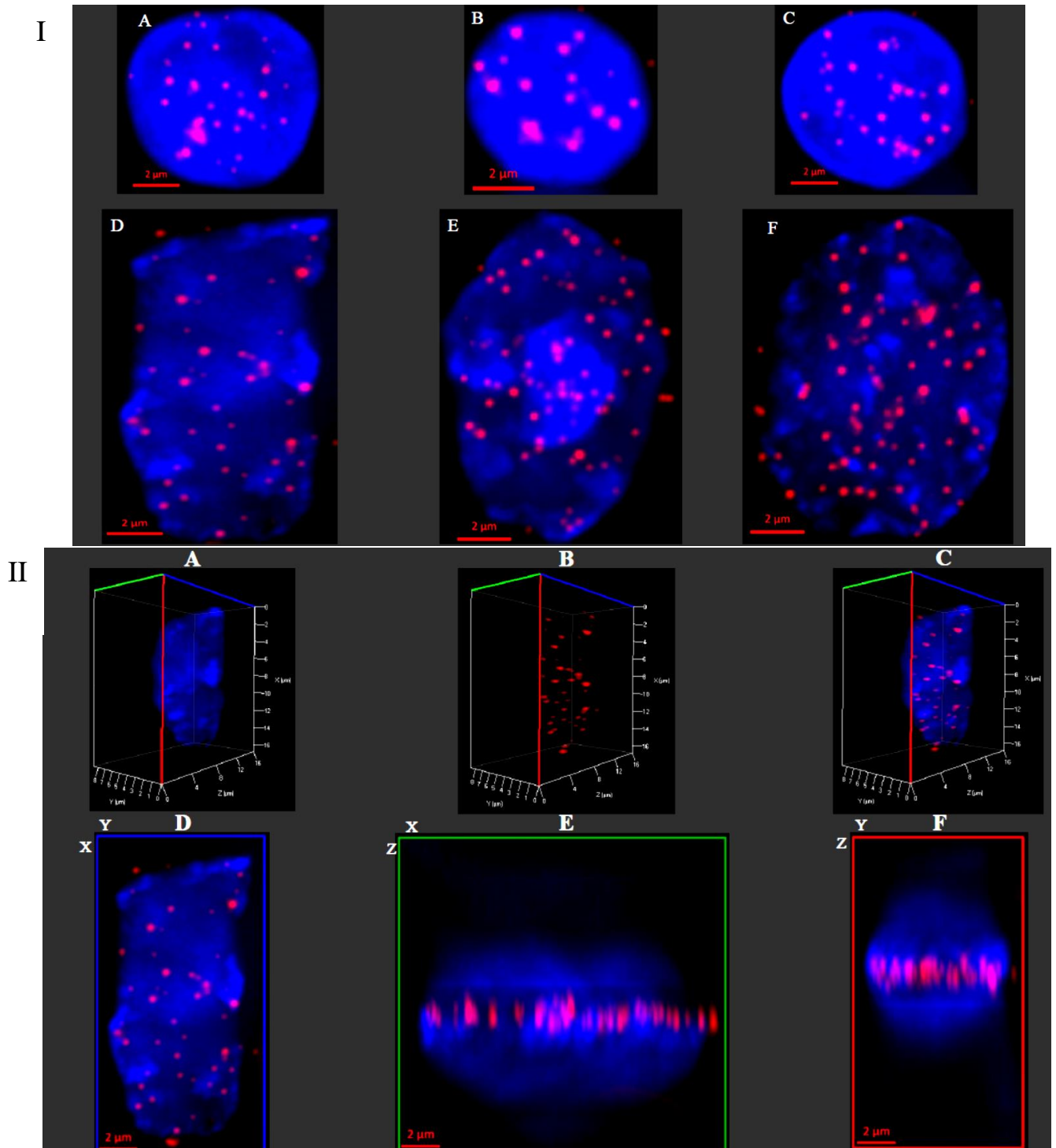


Figure 35: Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P5.

Les images 2D (I) et 3D (II) des noyaux cellulaires (bleu) et de leurs télomères (rouge) ont été capturées et visualisées avec le logiciel ZenPro2.

Les images **IA**, **IB** et **IC** représentent des noyaux provenant de cellules normales. Ces noyaux sont sphériques avec des contours réguliers et une chromatine dense. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux est environ 8 μm . Le nombre des télomères était moins élevé dans les cellules normales que dans celles cancéreuses.

Les images **ID**, **IE** et **IF** représentent des noyaux de cellules cancéreuses et elles présentaient un pléomorphisme nucléaire avec des contours irréguliers de leur noyau. La chromatine des noyaux de ces cellules cancéreuses était décondensée et remodelée. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux était environ 19 μm .

Les images **IIA** (noyau seul), **IIB** (télomères seuls) et **IIC** (noyau et télomères) sont la représentation 3D de l'image **ID**. Les images **IID**, **IIE** et **IIF** sont les projections des différents axes xy, xz et yz de l'image **ID**.

Tableau XV: Répartition des paramètres télomériques de **P5** en fonction des 2 catégories de cellules

Paramètres télomériques	Type cellulaire (médiane)		Valeur <i>p</i>
	Normales	Pathologiques	
Nombre total de signaux télomériques	24,00	45,00	< 0,001
Intensité moyenne de signaux télomériques	9871,70	6028,50	< 0,001
Nombre total d'agrégats télomériques	2	6	< 0,001
Indice de distribution nucléaire	2,33	6,07	< 0,001
Volume nucléaire	300,35	796,48	< 0,001
Distance télomérique à partir du centre du noyau	2,14	1,24	< 0,001

Les paramètres télomériques des cellules pathologiques étaient statistiquement plus élevés que ceux des cellules normales.

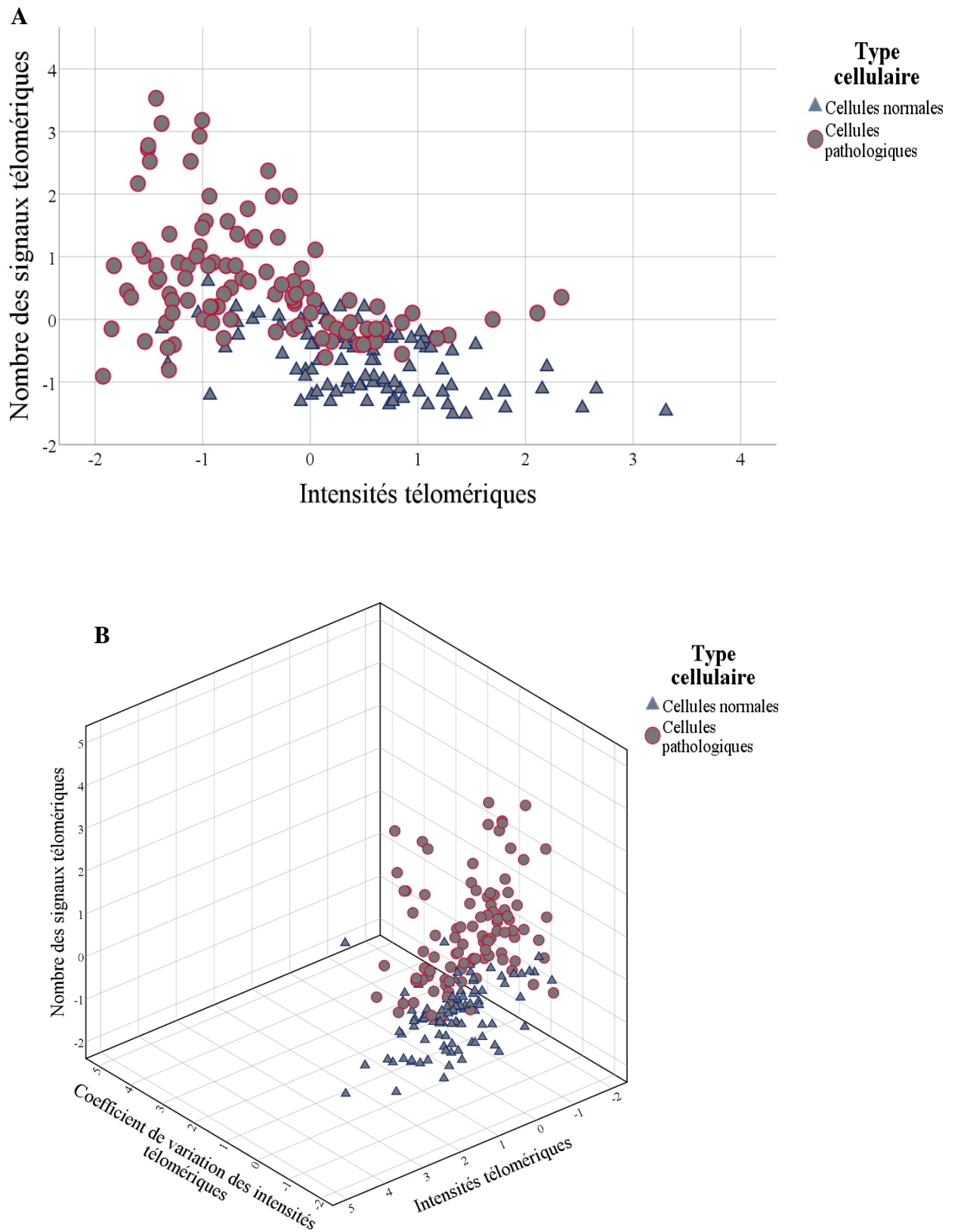


Figure 36 : Diagramme de dispersion cellulaire.

La figure 36.A) est la représentation de la dispersion cellulaire en 2D en fonction du nombre des télomères et de leur intensité. La figure 36.B) représente la dispersion cellulaire en 3D fonction du nombre des télomères, de leur intensité, et du coefficient de variation de l'intensité télomérique.

Les index d'hétérogénéité cellulaire en 2D des télomères étaient de 1,5980 et 1,1820 pour les cellules pathologiques et normales, respectivement. En 3D, les valeurs de l'index d'hétérogénéité cellulaire des cellules pathologiques étaient de 2,1311 et 1,4879 pour les cellules normales. L'index d'hétérogénéité était statistiquement plus élevé dans les cellules pathologiques par rapport aux cellules normales en 2D ($p=2,0864^{E-134}$) et 3D ($p=3,0706^{E-202}$).

Patiente P6

Il s'agit d'une patiente de 50 ans avec un ATCD de schistosomiase urinaire. La présente symptomatologie constituée de pollakiurie, de brûlures mictionnelles et d'hématurie totale avait commencé 2 ans avant la première consultation urologique. À l'examen physique, on avait retrouvé une douleur hypogastrique à la palpation et une masse au niveau du plancher inférieur de la vessie.

L'examen biologique a montré une anémie, une infection urinaire à *Escherichia coli* et une fonction rénale conservée. L'échographie a montré une masse vésicale sans retentissement sur les reins. À la cystoscopie, une masse occupant la quasi-totalité de la vessie était présente.

Après la résection de la tumeur, l'examen anatomopathologique concluait à un carcinome épidermoïde moyennement invasif et kératinisant de la vessie avec infiltration de la musculature. La patiente a bénéficié d'un traitement à base de chimiothérapie et de radiothérapie, et elle était vivante à la fin de l'étude (5 mois de suivi).

Les données génomiques des télomères montraient une altération de leur organisation nucléaire dans les cellules pathologiques (Figure 37), et tous les paramètres définissant cette organisation étaient significativement entre les cellules cancéreuses et celles normales sauf l'intensité télomérique (Tableau XVII). En outre, on a retrouvé une hétérogénéité cellulaire (Figure 38). Bien vrai qu'on a remarqué une différence significative entre les cellules normales et pathologique, les cellules pathologiques ne présentaient pas une altération prononcée de leur organisation nucléaire des télomères.

En conclusion, les cellules tumorales de la patiente étaient génomiquement moins instable, ce qui pourrait expliquer sa survie relativement longue.

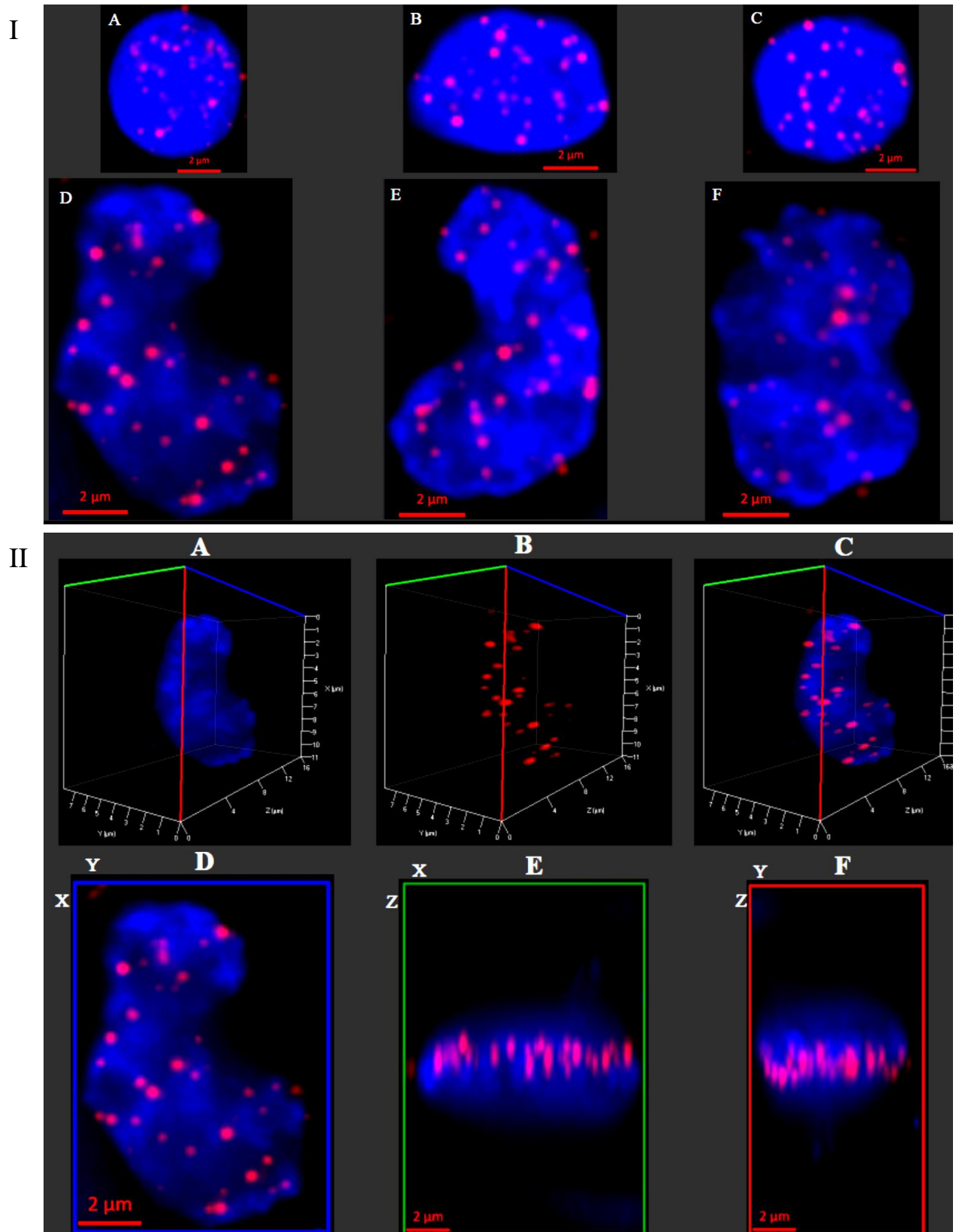


Figure 37: Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P6.

Les images 2D (I) et 3D (II) des noyaux cellulaires (bleu) et de leurs télomères (rouge) ont été capturées et visualisées avec le logiciel ZenPro2.

Les images **IA**, **IB** et **IC** représentent des noyaux provenant de cellules normales. Ces noyaux étaient sphériques avec des contours réguliers et une chromatine dense. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux était environ 8 μm . L'intensité des télomères des cellules normales était similaire à celle des cellules cancéreuses.

Les images **ID**, **IE** et **IF** représentent des noyaux des cellules cancéreuses et elles présentaient de noyaux différents en fonction de leur forme et de taille. La chromatine des noyaux de ces cellules cancéreuses était moins décondensée. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux est environ 14 μm .

Les images **IIA** (noyau seul), **IIB** (télomères seuls) et **IIC** (noyau et télomères) sont la représentation 3D de l'image **ID**. Les image **IID**, **IIE** et **IIF** sont les projections des différents axes xy, xz et yz de l'image **ID**.

Tableau XVI: Répartition des paramètres télomériques de **P6** en fonction du type cellulaire.

Paramètres télomériques	Type cellulaire (médiane)		Valeur <i>p</i>
	Normales	Pathologiques	
Nombre total de signaux télomériques	26,00	33,50	< 0,001
Intensité moyenne de signaux télomériques	7321,73	6781,82	0,16
Nombre total d'agrégats télomériques	3	4	0,001
Indice de distribution nucléaire	2,39	5,42	< 0,001
Volume nucléaire	159,67	276,07	< 0,001
Distance télomérique à partir du centre du noyau	3,41	2,90	< 0,001

Les paramètres télomériques sont tous statistiquement plus élevés dans les cellules pathologiques que ceux des cellules normales, sauf l'intensité télomérique.

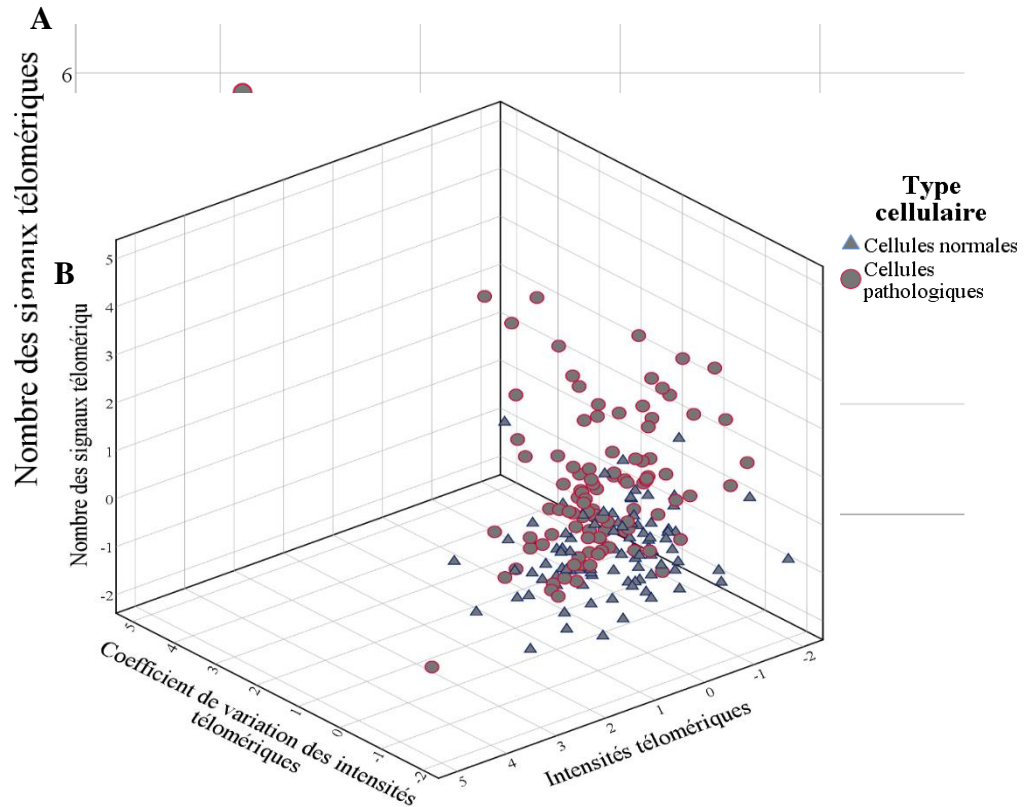


Figure 38 : Diagramme de dispersion cellulaire.

Les diagrammes de dispersions Figure 38.A et Figure 38.B sont schématiquement les 2D et 3D de l'hétérogénéité cellulaire, respectivement. Les index d'hétérogénéité cellulaire en 2D des télomères étaient de 1,8251 et 1,2743 pour les cellules pathologiques et normales, respectivement ($p=7,2621E^{-160}$). En 3D, l'index d'hétérogénéité cellulaire des cellules pathologiques (2,3256) étaient statistiquement plus élevées que celui des cellules normales (1,6584) ($p=9,6039E^{-194}$).

Patient P7

Le patient P7 était âgé de 50 ans au moment du diagnostic et avait des antécédents de bilharziose urinaire et de tabagisme. La symptomatologie clinique qui a débuté progressivement 2 ans avant la consultation urologique a été marquée par une douleur hypogastrique, une hématurie terminale, et des brûlures mictionnelles. À l'examen physique, on a retrouvé une douleur à la palpation de l'hypogastre et une hypertrophie bénigne de la prostate.

L'examen biologique a montré une anémie et une fonction rénale conservée. L'uro-scanner a objectivé un processus tumoral vésical bourgeonnant de siège antérieur et latéral droit sans atteinte des organes de voisinage.

Après la résection tumorale, l'examen anatomopathologique a permis de faire le diagnostic de carcinome épidermoïde moyennement différencié de la vessie. Le patient a été mis sous chimiothérapie et a présenté une évolution favorable (suivi de 7 mois).

Ce patient également présentait un remodelage de l'architecture nucléaire des télomères (Figure 39). En effet, la majorité des paramètres télomériques dans cellules pathologiques comparativement aux cellules normales. En effet, le nombre de signaux télomériques, le volume nucléaire, l'index de distribution des télomères, le nombre d'agrégats télomériques et le volume nucléaire étaient plus de quatre fois élevés dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales. De même, l'intensité moyenne des télomères était moins accentuée dans les cellules pathologiques par rapport aux cellules normale (Tableau XVIII). Enfin, les cellules cancéreuses et normales présentaient une hétérogénéité cellulaire semblable (Figure 40).

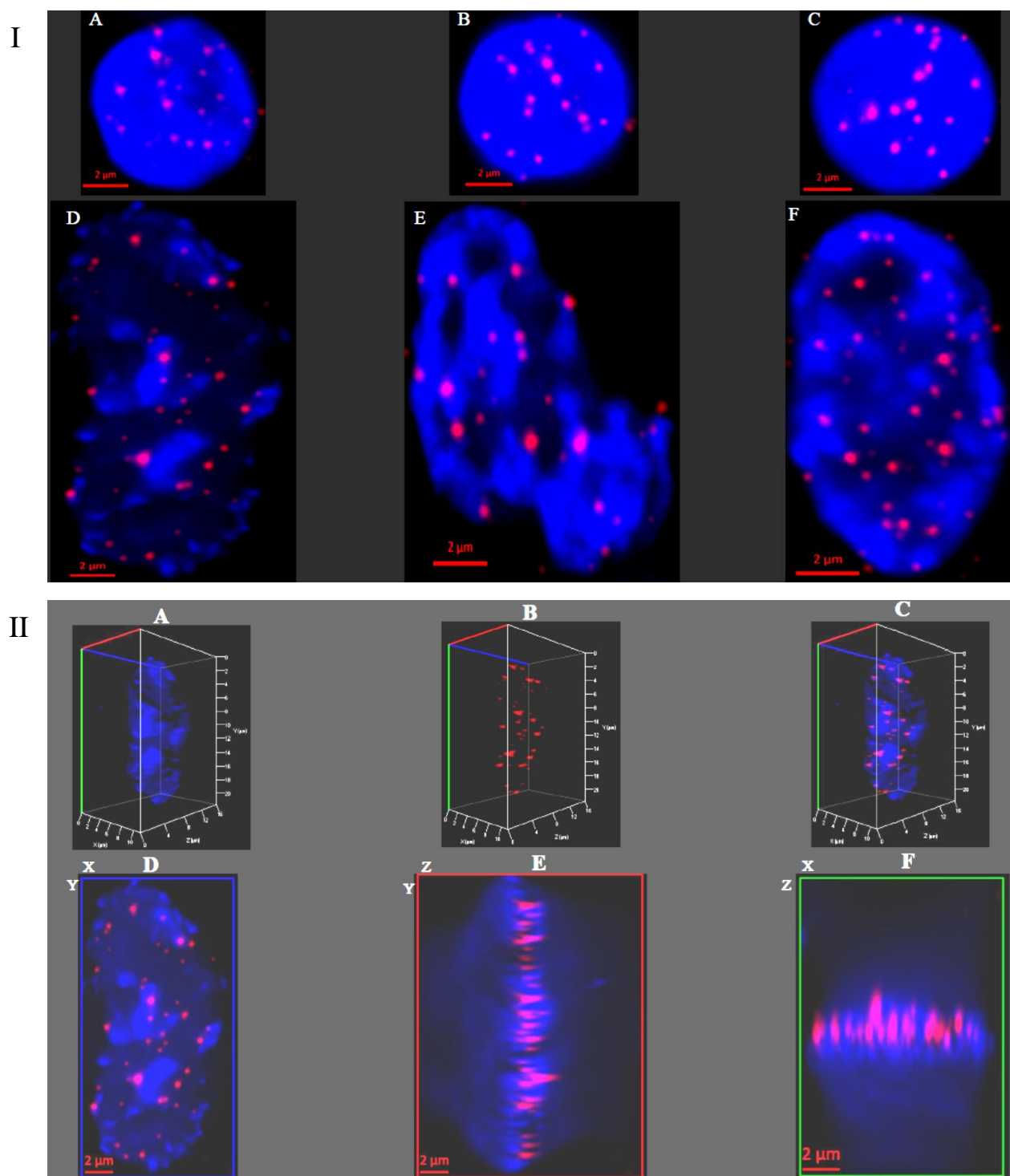


Figure 39: Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P7.

Les images 2D (I) et 3D (II) des noyaux cellulaires (bleu) et de leurs télomères (rouge) ont été capturées et visualisées avec le logiciel ZenPro2.

Les images IA, IB et IC représentent des noyaux provenant de cellules normales. Ces noyaux étaient sphériques avec des contours réguliers et une chromatine dense. La mesure moyenne du

grand axe de ces noyaux était environ 7 μm . Le nombre des télomères était moins élevé que dans les noyaux des cellules cancéreuses.

Les images **ID**, **IE** et **IF** représentent des noyaux de cellules cancéreuses et elles présentaient un pléomorphisme nucléaire avec des contours irréguliers de leur noyau. La chromatine des noyaux de ces cellules cancéreuses était remaniée avec des zones libres d'ADN (pas de coloration DAPI). La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux était environ 21 μm .

Les images **IIA** (noyau seul), **IIB** (télomères seuls) et **IIC** (noyau et télomères) sont la représentation 3D de l'image **ID**. Les images **IID**, **IIE** et **IIF** sont les projections des différents axes xy, xz et yz de l'image **ID**.

Tableau XVII: Répartition des paramètres télomériques de **P7** en fonction du type cellulaire.

Paramètres télomériques	Type cellulaire (médiane)		Valeurs de <i>p</i>
	Normales	Pathologiques	
Nombre total de signaux télomériques	9,00	44,00	< 0,001
Intensité moyenne de signaux télomériques	11125,09	8197,95	< 0,001
Nombre total d'agrégats télomériques	1	5	< 0,001
Indice de distribution nucléaire	1,89	5,64	< 0,001
Volume nucléaire	141,09	687,66	< 0,001
Distance télomérique à partir du centre du noyau	3,85	1,56	< 0,001

Les paramètres télomériques étaient tous statistiquement différents entre les deux types cellulaires.

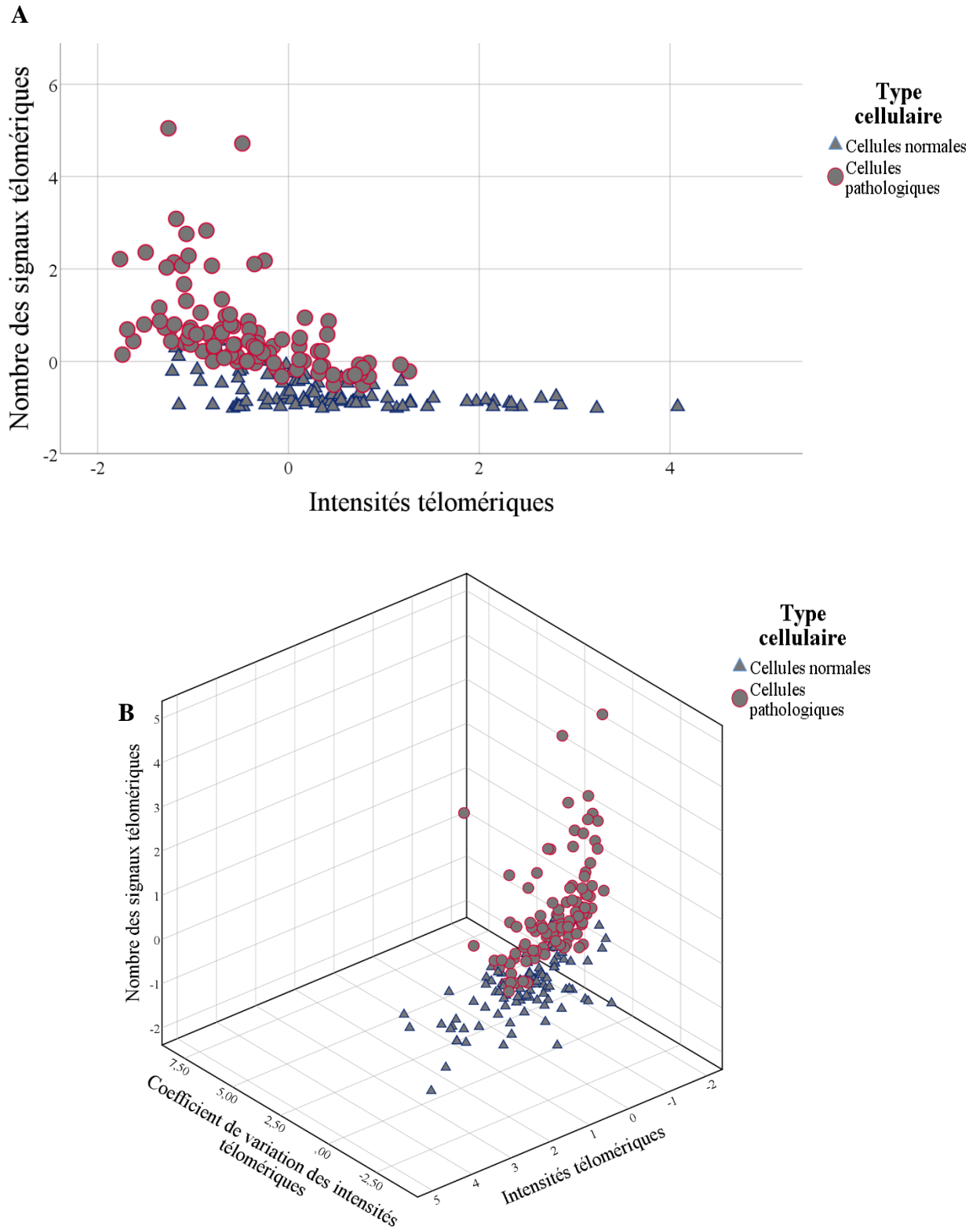


Figure 40: Diagramme de dispersion cellulaire.

Les diagrammes de dispersions Figure 40.A et Figure 40.B sont schématiquement les 2D et 3D de l'hétérogénéité cellulaire, respectivement.

Les index d'hétérogénéité cellulaire en 2D des télomères étaient de 1,3846 et 1,2650 pour les cellules tumorales et normales, respectivement. En 3D, les valeurs de l'index d'hétérogénéité cellulaire des cellules tumorales étaient de 1,8470 et 1,8042 pour les cellules normales. L'index d'hétérogénéité était plus statistiquement plus élevé dans les cellules tumorales que dans les cellules normales en 2D ($p=5,1183^{E-10}$) mais pas en 3D ($p=0,064$).

Patient P8

Il s'agit d'une patiente de 44 ans ayant un ATCD de schistosomiase urinaire. Elle a présenté des épisodes intermittents d'hématurie sur une période de six mois avant de faire une consultation urologique. Une douleur pelvienne associée à une induration du plancher vésical étaient les principaux signes à l'examen physique.

L'examen biologique a montré une anémie, une infection urinaire *bacille à gram négatif* et une fonction rénale conservée. À l'échographie, une masse tissulaire intra-vésicale et vascularisée était présente. L'uro-scanner a montré un aspect tumoral du plancher vésical avec une urétéro-hydronephrose bilatérale et des ganglions loco-régionaux non spécifiques, sans lésion des autres organes.

Après la résection tumorale, l'examen anatomopathologique a montré un carcinome épidermoïde moyennement différencié associé à une cystite bilharzienne. La pelvectomie antérieure de Bricker a été faite, et la patiente est décédée 2 semaines après l'intervention. Une embolie pulmonaire serait probablement la cause.

L'analyse télomérique a montré une altération de l'organisation nucléaire des télomères des cellules néoplasiques (Figure 41), et cinq des six paramètres de cette organisation était statistiquement différents entre les cellules normales et pathologiques (Tableau XIX). Bien vrai que les cellules cancéreuses présentaient une organisation altérée de leurs télomères, l'analyse des paramètres télomériques évoquait une instabilité génomique moindre. En effet, la longueur des télomères des cellules néoplasiques étaient statistiquement similaires à celle des cellules normales. En outre, on n'a pas observé une augmentation considérable du nombre des télomères et des agrégats télomériques ainsi que le volume nucléaire dans les cellules cancéreuses qui étaient aussi hétérogènes (Tableau XIX et Figure 42). En conclusion, le degré moindre de l'instabilité génomique était en concordance avec les données pathologiques et cliniques.

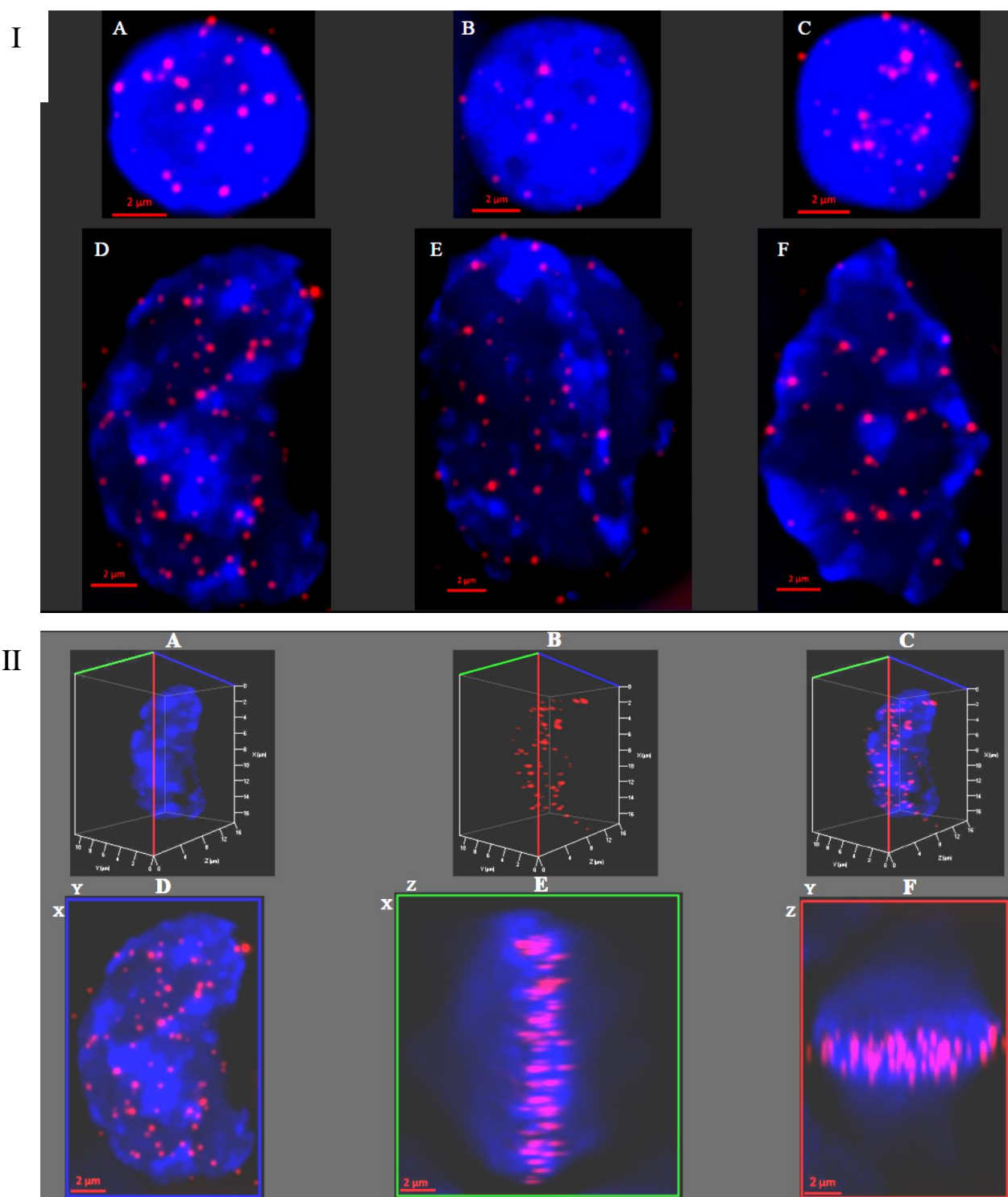


Figure 41 : Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P8.

Les images 2D (I) et 3D (II) des noyaux cellulaires (bleu) et de leurs télomères (rouge) ont été capturées et visualisées avec le logiciel ZenPro2.

Les images IA, IB et IC représentent des noyaux provenant de cellules normales. Ces noyaux étaient sphériques avec des contours réguliers et une chromatine dense. La mesure moyenne du

grand axe de ces noyaux était environ 7,5 μm . Le nombre des télomères était moins élevé que dans les noyaux des cellules cancéreuses.

Les images **ID**, **IE** et **IF** représentent des noyaux de cellules cancéreuses et elles présentaient un pléomorphisme nucléaire avec des contours irréguliers de leur noyau. La chromatine des noyaux de ces cellules cancéreuses était décondensée et complètement remaniée. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux était environ 17 μm .

Les images **IIA** (noyau seul), **IIB** (télomères seuls) et **IIC** (noyau et télomères) sont la représentation 3D de l'image **ID**. Les images **IID**, **IIE** et **IIF** sont les projections des différents axes xy, xz et yz de l'image **ID**.

Tableau XVIII: Répartition des paramètres télomériques de **P8** en fonction du type cellulaire.

Paramètres télomériques	Type cellulaire (médiane)		Valeur <i>p</i>
	Normales	Pathologiques	
Nombre total de signaux télomériques	23,50	34,50	< 0,001
Intensité moyenne de signaux télomériques	9049,72	9091,12	0,888
Nombre total d'agrégats télomériques	3	4	< 0,001
Indice de distribution nucléaire	2,04	5,22	< 0,001
Volume nucléaire	352,98	671,24	< 0,001
Distance télomérique à partir du centre du noyau	1,96	1,49	< 0,001

A l'exception de l'intensité télomérique, tous les paramètres étaient statistiquement différents entre les cellules normales et cancéreuses.

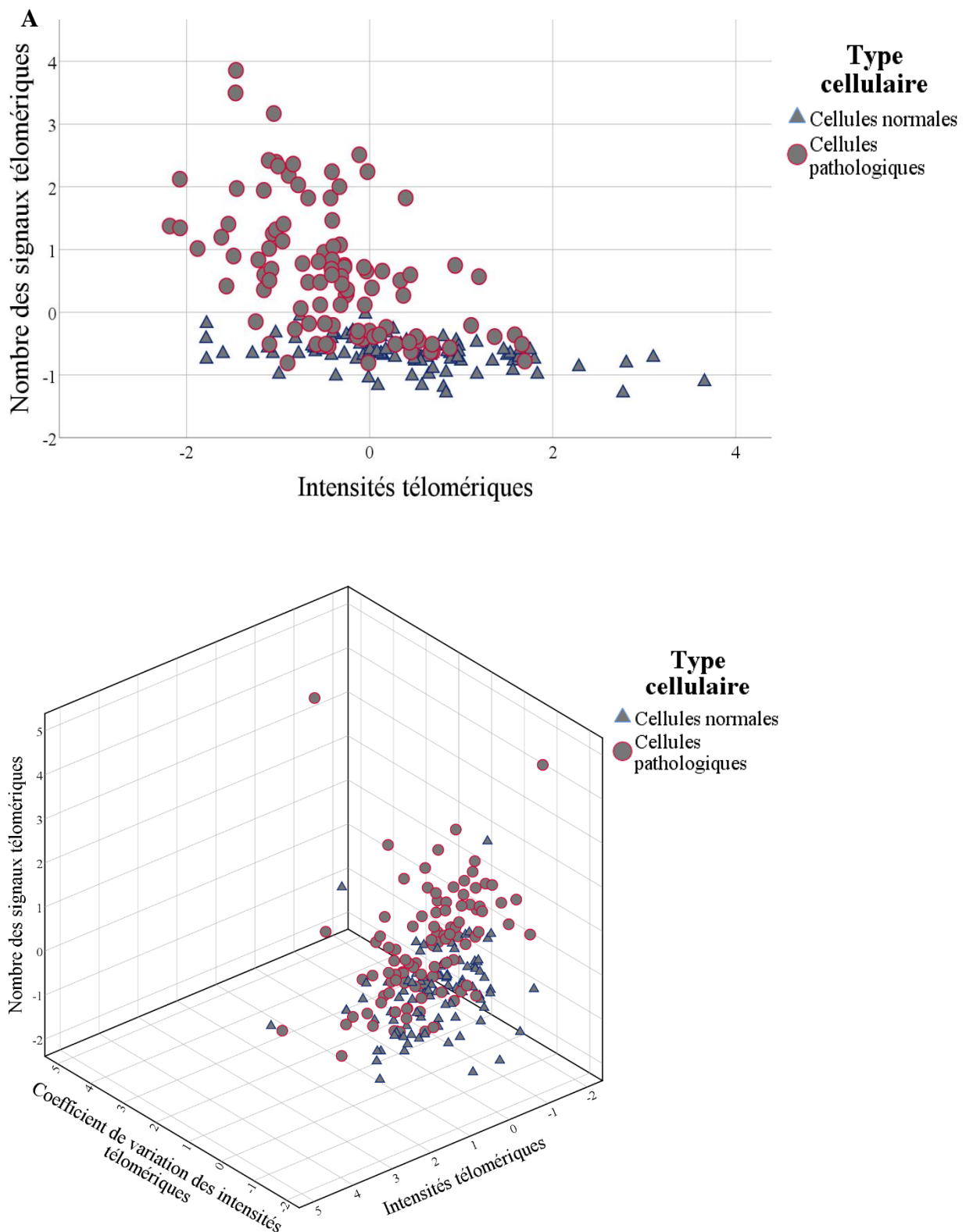


Figure 42: Diagramme de dispersion cellulaire.

Les Figure 42.A et Figures 42.B sont les représentations 2D et 3D de l'hétérogénéité cellulaire, respectivement. Les index d'hétérogénéité cellulaire en 2D des télomères étaient de 1,7668 et 1,3524 pour les cellules cancéreuses et normales, respectivement ($p=6,7805^{E-87}$). En 3D, l'index d'hétérogénéité cellulaire des cellules cancéreuses (2.2264) étaient statistiquement plus élevés que celui des cellules normales (1,7987), ($p=2,9586^{E-71}$).

Patiente P9 (SITA)

Il s'agit d'une patiente de 87 ans ayant un ATCD d'infection urinaire à schistosomiase. La symptomatologie a commencé un an avant de consulter en urologie, et elle était marquée par une dysurie et une hématurie terminale. À l'examen physique, une masse hypogastrique douloureuse à la palpation était présente. Le plancher vésical était dur au toucher vaginal et la sonde urinaire ramenait des urines purulentes.

L'examen biologique a montré une anémie, une infection urinaire à *Enterococcus faecalis* et une fonction rénale conservée. À la cytologie urinaire, on a retrouvé des cellules atypiques avec une forte suspicion de malignité.

L'échographie a montré un épaississement irrégulier de la paroi vésicale avec infiltration de la graisse adjacente associée à une urétéro- hydronéphrose gauche modérée. La TDM abdomino-pelvienne a montré un processus expansif de la paroi vésicale avec envahissement du sigmoïde et importante urétéro- hydronéphrose gauche.

La résection n'a pas pu être réalisée à cause de l'état général altéré de la patiente. La patiente est décédée un mois après le diagnostic clinique.

Les cellules cancéreuses présentaient un remodelage nucléaire et une altération de l'architecture nucléaire des télomères (Figure 43). L'analyse téloméomique a montré une instabilité génomique très prononcée des cellules pathologiques (Tableau XX). En effet, le nombre de signaux téloméomiques, l'index de distribution des télomères, le nombre d'agrégats téloméomiques étaient deux fois plus élevés dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales et le volume nucléaire était le triple. L'hétérogénéité cellulaire était plus marquée dans les cellules cancéreuses que celles normales (Figure 44).

En conclusion, instabilité génomique très prononcée des cellules tumorales et la localisation secondaire tumorale et l'âge de la patiente pouvaient expliquer le mauvais pronostic de la patiente.

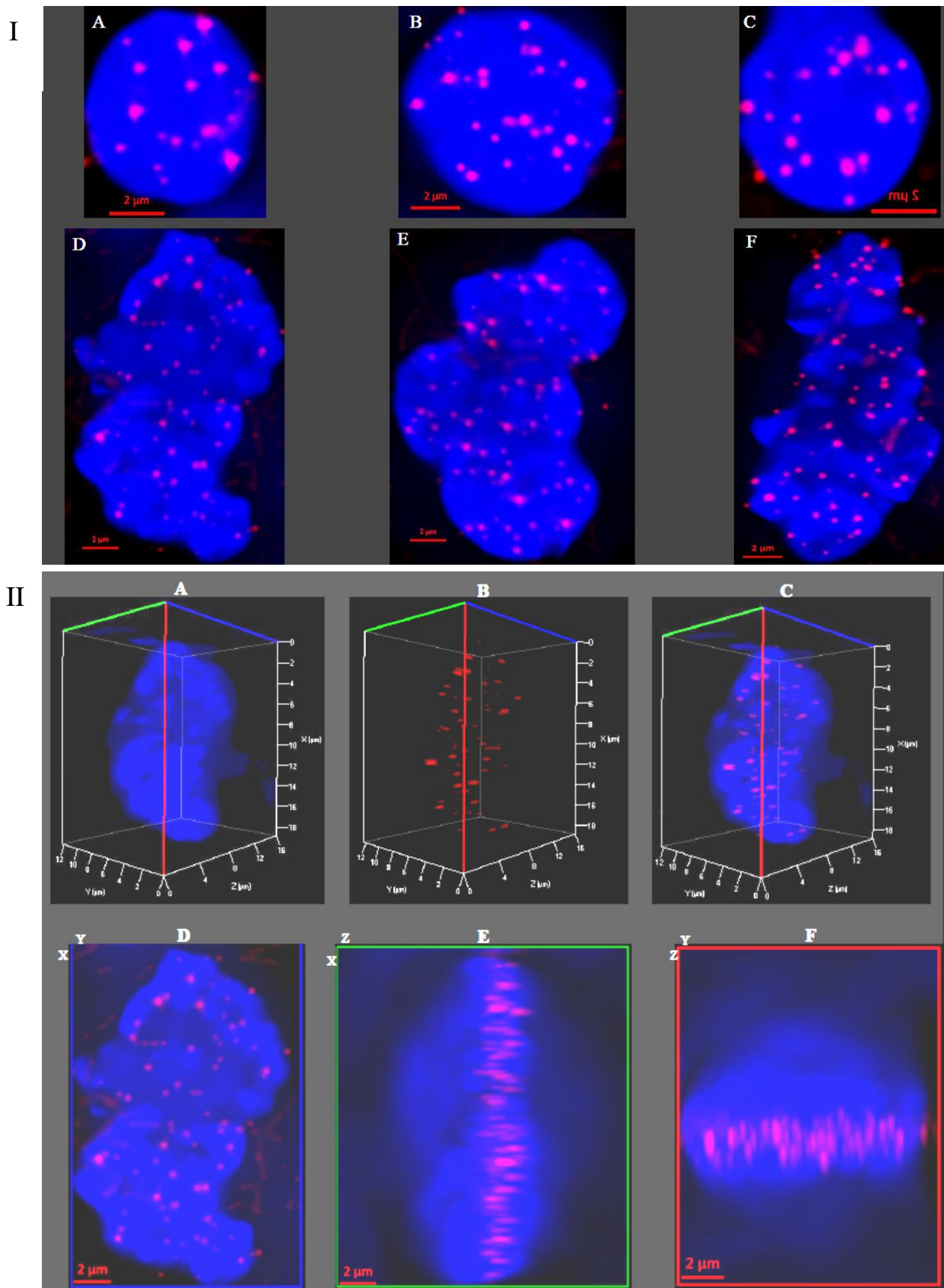


Figure 43 : Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P9.

Les images 2D (**I**) et 3D (**II**) des noyaux cellulaires (bleu) et de leurs télomères (rouge) ont été capturées et visualisées avec le logiciel ZenPro2.

Les images **IA**, **IB** et **IC** représentent des noyaux provenant de cellules normales. Ces noyaux étaient sphériques avec des contours réguliers et une chromatine dense. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux était environ 8 μm . Dans les cellules normales, le nombre des télomères était moindre que dans celles cancéreuses.

Les images **ID**, **IE** et **IF** représentent des noyaux de cellules cancéreuses et elles présentaient un pléomorphisme nucléaire avec des contours irréguliers de leur noyau. En outre, les noyaux des cellules cancéreuses étaient complètement remodelés et ceux étaient polymorphes. La chromatine était légèrement décondensée. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux était environ 19 μm .

Les images **IIA** (noyau seul), **IIB** (télomères seuls) et **IIC** (noyau et télomères) sont la représentation 3D de l'image **ID**. Les images **IID**, **IIE** et **IIF** sont les projections des différents axes xy, xz et yz de l'image **ID**.

Tableau XIX: Répartition des paramètres télomériques de **P9** en fonction du type cellulaire.

Paramètres télomériques	Type cellulaire (médiane)		Valeur <i>p</i>
	Normales	Pathologiques	
Nombre total de signaux télomériques	27,00	68,00	< 0,001
Intensité moyenne de signaux télomériques	8346,86	6733,90	< 0,001
Nombre total d'agrégats télomériques	3	7	< 0,001
Indice de distribution nucléaire	2,74	6,30	< 0,001
Volume nucléaire	369,18	1119,27	< 0,001
Distance moyenne des télomères à partir du centre nucléaire	2,08	1,12	< 0,001

Les paramètres télomériques suivants des cellules cancéreuses : le nombre total de signaux télomériques, le nombre total d'agrégats télomériques, l'indice de distribution télomérique, le volume nucléaire et la distance moyenne des télomères à partir du centre nucléaire sont tous statistiquement plus élevés que ceux des cellules normales.

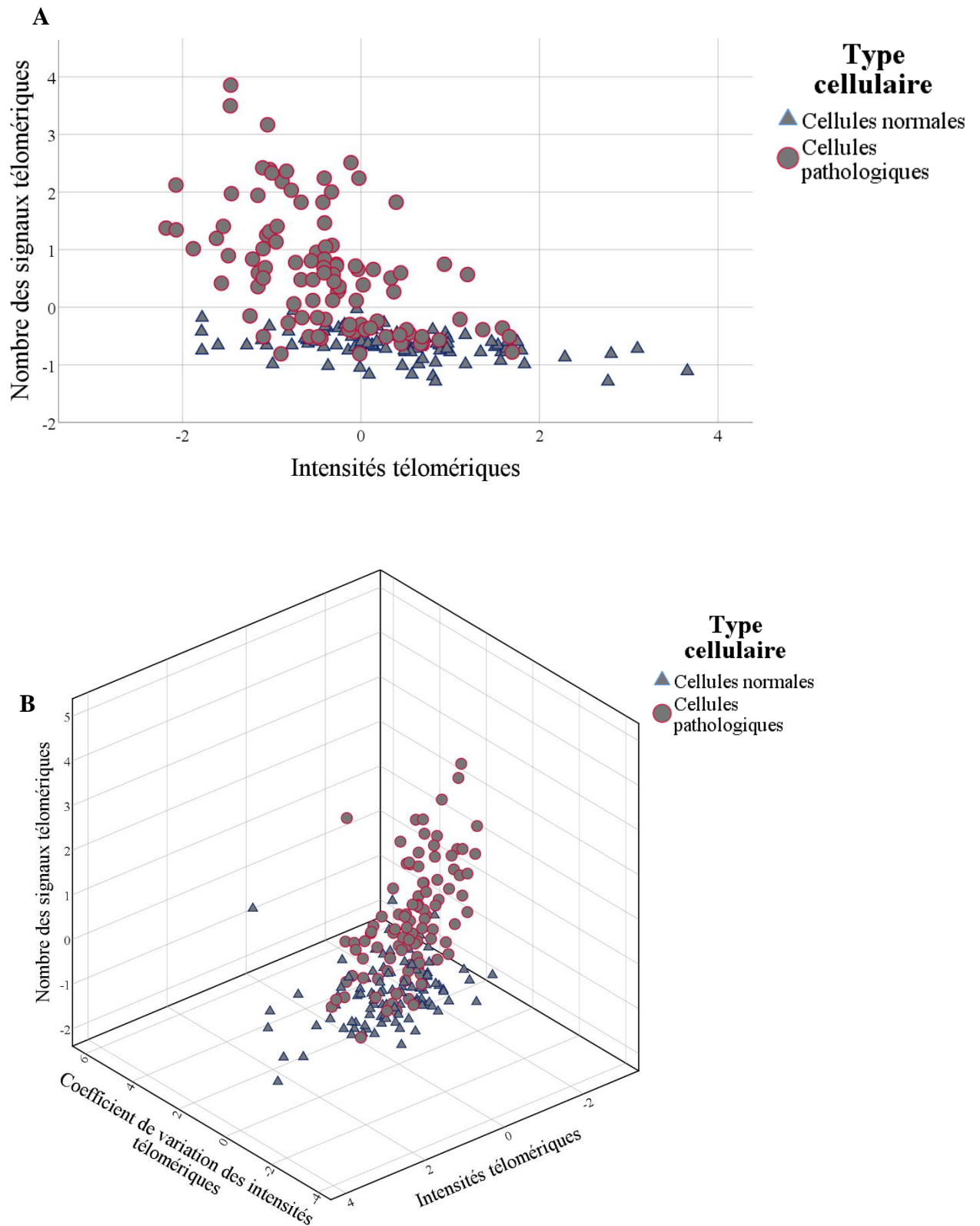


Figure 44: Diagramme de dispersion cellulaire.

La figure 44. A) est la représentation de la dispersion cellulaire en 2D en fonction du nombre des télomères et de leur intensité. La figure 44. B) représente la dispersion cellulaire en 3D fonction du nombre des télomères, de leur intensité, et du coefficient de variation de l'intensité télomérique.

La représentation graphique 2D montre une hétérogénéité des cellules cancéreuses avec un index d'hétérogénéité d'une moyenne de 1.6213 que les cellules normales d'une moyenne de 1.1965 ($p=1,0863^{E-118}$). La représentation graphique en 3D de l'intensité moyenne des télomères par cellule, le coefficient de variation des intensités télomériques et le nombre des signaux télomériques montre que les cellules cancéreuses sont plus hétérogènes avec un index d'hétérogénéité 1.9747 que les cellules normales avec un index de 1.8585 ($p=4,9081^{E-8}$).

Patient P10

Le patient P10 était âgé de 60 ans au moment du diagnostic et avait un ATCD d'infection urinaire à *schistosoma*. La symptomatologie clinique a débuté 3 ans avant le diagnostic et elle était essentiellement marquée par une dysurie. À l'examen physique, l'hypogastrique et le plancher vésical étaient douloureux à la palpation, et les conjonctives palpébrales étaient pâles. L'examen biologique a montré une anémie, une infection urinaire à *Staphylococcus aureus* et une fonction rénale altérée. À l'uro-scanner, on a retrouvé des masses tumorales vésicales de localisation principale au niveau du trigone ainsi que deux autres localisations : l'une au dôme et l'autre pariétale antérieure sans signe de localisation secondaire et la présence d'une urétéro-hydronéphrose bilatérale de grade II.

Après la résection de la tumeur, l'examen anatomopathologique a conclu un carcinome urothélial papillaire de haut grade de la vessie sans signe d'infiltration. Le patient a été mis sous chimiothérapie et la radiothérapie était un survivant (180 jours) à la fin de l'étude.

L'analyse des données télomériques évoque une altération de l'organisation nucléaire des télomères des cellules néoplasiques (Figure 45). En effet, les cellules cancéreuses étaient deux fois plus grosses avec trois fois plus d'agrégats télomériques et deux fois plus de signaux télomériques comparativement aux cellules normales. De plus, les télomères dans les cellules cancéreuses étaient plus désorganisés et présentaient une capacité proliférative plus élevée avec un indice de distribution télomérique trois fois plus élevé que celui des cellules normales. (Tableau XXI). Enfin, l'hétérogénéité cellulaire était plus prononcée au niveau des cellules cancéreuses que celles normales (Figure 46).

En conclusion, le grade élevé de la tumeur était en concordance avec le degré prononcé d'instabilité génomique des cellules pathologiques même si la présentation clinique n'évoquait pas de localisation secondaire.

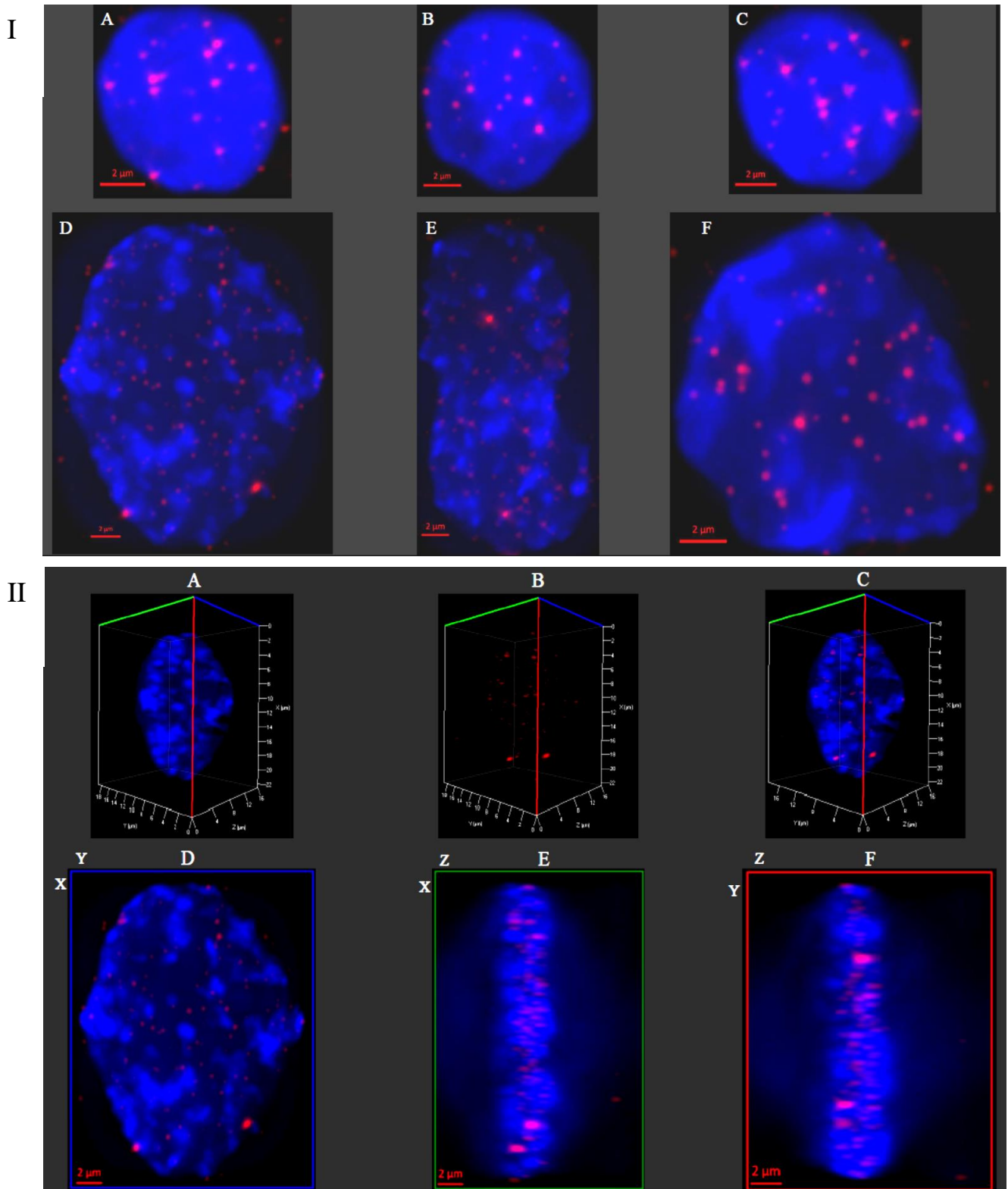


Figure 45: Images en 2D et 3D représentatives des cellules de l'échantillon P10.

Les images 2D (**I**) et 3D (**II**) des noyaux cellulaires (bleu) et de leurs télomères (rouge) ont été capturées et visualisées avec le logiciel ZenPro2.

Les images **IA**, **IB** et **IC** représentent des noyaux provenant de cellules normales. Ces noyaux étaient sphériques avec des contours réguliers et une chromatine dense. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux était environ 8 μm . Le nombre des télomères était moins élevé que dans les noyaux des cellules cancéreuses que dans ceux des cellules normales.

Les images **ID**, **IE** et **IF** représentent des noyaux de cellules cancéreuses et elles présentaient un pléomorphisme nucléaire avec des contours irréguliers de leur noyau. La chromatine des noyaux de ces cellules cancéreuses était très décondensée. La mesure moyenne du grand axe de ces noyaux était environ 22 μm .

Les images **IIA** (noyau seul), **IIB** (télomères seuls) et **IIC** (noyau et télomères) sont la représentation 3D de l'image **ID**. Les images **IID**, **IIE** et **IIF** sont les projections des différents axes xy, xz et yz de l'image **ID**.

Tableau XX : Répartition des paramètres télomériques de **P10** en fonction du type cellulaire.

Paramètres télomériques	Type cellulaire (médiane)		Valeur <i>p</i>
	Normales	Pathologiques	
Nombre total de signaux télomériques	24,00	50,00	< 0,001
Intensité moyenne de signaux télomériques	9196,11	6988,10	< 0,001
Nombre total d'agrégats télomériques	2	6	< 0,001
Indice de distribution nucléaire	2,27	9,61	< 0,001
Volume nucléaire	408,93	1153,69	< 0,001
Distance télomérique à partir du centre du noyau	1,81	0,99	< 0,001

Les paramètres télomériques des cellules cancéreuses sont statistiquement différents de ceux des cellules normales.

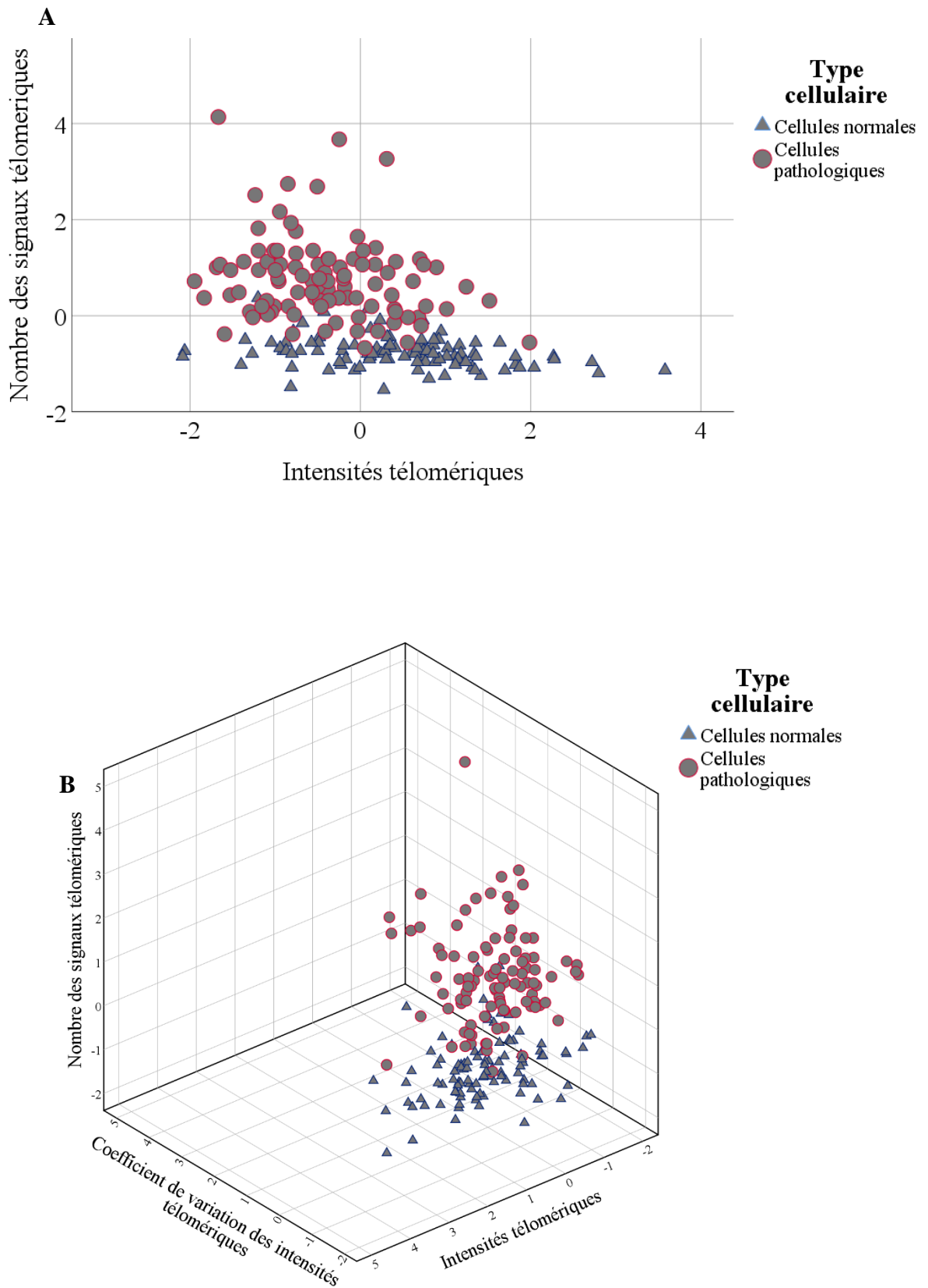


Figure 46: Diagramme de dispersion cellulaire.

La figure 55. A) est la représentation de la dispersion cellulaire en 2D en fonction du nombre des télomères et de leur intensité. La figure 55. B) représente la dispersion cellulaire en 3D fonction du nombre des télomères, de leur intensité, et du coefficient de variation de l'intensité télomérique.

Les index d'hétérogénéité cellulaire en 2D des télomères étaient de 1,4033 et 1,2734 pour les cellules cancéreuses et normales, respectivement ($p=1,8207^{E-14}$). En 3D, l'index d'hétérogénéité cellulaire des cellules cancéreuses (2,0128) étaient statistiquement plus élevées que celui des cellules normales (1,6186) ($p=3,7111^{E-87}$).

5.4.2 Résumé des données cliniques et télégénomique des patients

Tableau XXI : Résumé des données cliniques des patients.

Patients	Paramètres cliniques				
	Présence de ganglions	Présence de métastases	Différentiation tumorale	Infiltration de la musculature	Taux de survie (Jours)
P1	+	+	Moyennement	+	120
P2	N/A	+	N/A	+	60
P3	+	+	N/A	N/A	1
P4	N/A	+	Moyennement	+	210
P5	+	+	N/A	N/A	30
P6	N/A	N/A	Moyennement (épidermoïde)	+	150
P7	-	-	Moyennement (épidermoïde)	-	210
P8	+	-	Moyennement (épidermoïde)	-	270
P9	N/A	+	N/A	N/A	30
P10	-	-	Haut grade (uropapillaire)	-	180

+ : Présent

- : Absent

N/A : Pas de données disponibles

Nous avons retrouvé chez 7 des 9 patients dont les données étaient disponibles, la présence d'invasion ganglionnaire de la tumeur et/ou de métastases (invasion locorégionale ou métastases à distance). Lorsque les données anatomopathologiques étaient disponibles, la tumeur était moyennement différenciée ou de haut grade. En général, les patients qui ont présenté un taux de survie relativement long n'avaient pas de métastases.

Tableau XXII: Comparaison entre les paramètres de l'organisation nucléaire des télomères des cellules normales et ceux des cellules cancéreuses.

Paramètres télomériques	Patients									
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Nombre total de signaux télomériques	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Intensité moyenne de signaux télomériques	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
Nombre total d'agrégats télomériques	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Indice de distribution nucléaire	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Volume nucléaire	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Distance télomérique à partir du centre du noyau	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Présence différence statistique significative ($p < 0.05$) entre les cellules normales et cancéreuses

- : Absence de différence statistique significative ($p > 0.05$) entre les cellules normales et cancéreuses

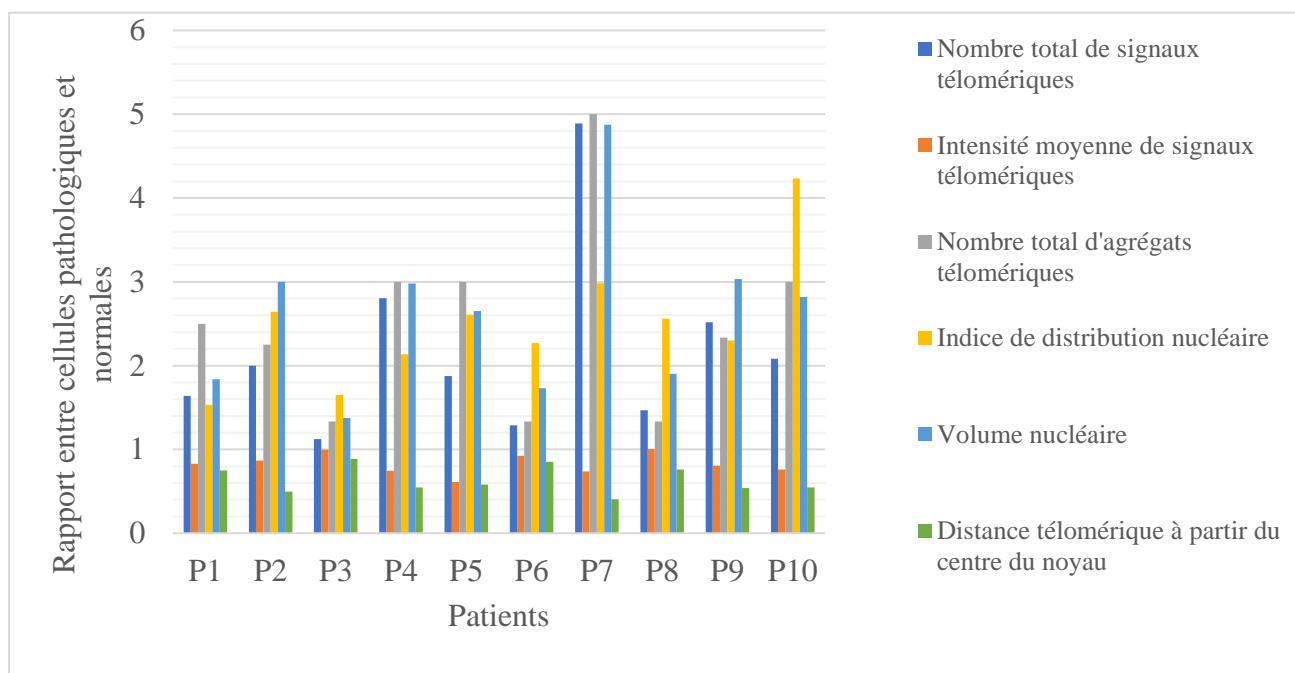


Figure 47: Résumé des paramètres télomériques des patients

Les valeurs des paramètres des cellules pathologiques ont été divisées par celles des cellules normales.

6 COMMENTAIRES ET DISCUSSION

L'instabilité génomique est une des caractéristiques du cancer de la vessie et cette instabilité est plus prononcée au cours de l'évolution de la maladie (43-47). L'altération de l'organisation nucléaire des télomères est un des indicateurs précoces de l'instabilité génomique (75,76) et cette altération a été utilisée dans plusieurs cancers comme biomarqueurs de diagnostic, de pronostic ou de surveillances thérapeutiques (4-7). Dans la perspective de développer un biomarqueur de pronostic ou de suivi thérapeutique dans le cancer de la vessie, nous avons développé une approche innovante qui est d'étudier l'organisation nucléaire des télomères des cellules circulantes urinaires dans le cancer de la vessie. C'est dans ce cadre que nous avons mené cette étude prospective qui s'est déroulée de février 2019 à avril 2021 à l'hôpital du Point G et la FMOS. Nous avons collecté des données cliniques chez 10 patients atteints du cancer de la vessie. Ensuite, nous avons fait la mise au point de la technique Q-FISH-3D télomère sur des cellules circulantes urinaires et évalué les paramètres définissant l'organisation nucléaire des télomères (données télégénomiques). Enfin, nous avons corrélé les données cliniques à celles télégénomiques chez l'ensemble des 10 patients.

Bien vrai que la population d'étude était de petite taille, les profils cliniques et pathologiques des patients de notre étude étaient similaires aux études précédentes (21,23,34,97). En effet, chez l'ensemble des patients, nous avons noté des antécédents de bilharziose qui ont été incriminés dans plusieurs études faites au Mali et en Afrique comme le facteur de risque majeur dans la survenue du cancer de la vessie (98). En outre, nous avons observé que 4 patients sur 7 présentaient, sur le plan anatomopathologique, un carcinome épidermoïde. D'autres études faites au Mali corroborent ces données pathologiques car le carcinome épidermoïde est le type histologique le plus fréquent au Mali avec une proportion variant de 74 à 80% (21,34). La fréquence élevée du carcinome épidermoïde dans nos contrées est due à son association avec la bilharziose urinaire (16,23,97). La majorité des patients (8/10) était diagnostiquée à un stade avancé de la maladie et ceux-ci présentaient soit une invasion de la musculature, une atteinte des ganglions, une invasion locorégionale ou des métastases à distance. Les études faites au Mali ont trouvé des données comparables aux nôtres (23,34). Le stade avancé du cancer de la vessie au Mali est dû à son diagnostic tardif car c'est une pathologie qui évolue à bas bruit (23,34). La conséquence immédiate du stade avancé de cette pathologie est son taux de mortalité très élevé. En effet, la médiane de survie des 10 patients dans notre étude était de 90 jours après le diagnostic. La petite taille de l'échantillon ne permet pas de faire des conclusions définitives, mais notre étude montre une tendance vers un taux de survie très bas du cancer de

la vessie au Mali. Le taux bas de survie du cancer de la vessie a été attesté par d'autres études faites au Mali et en Afrique (23,99–101). Pour juguler à cette mortalité élevée associée au cancer de la vessie, il faut trouver des biomarqueurs qui permettent de faire le diagnostic précoce, prédire le pronostic des patients et faire la surveillance thérapeutique.

La mise au point de la technique Q-FISH-3D télomère sur des cellules circulantes urinaires provenant des patients atteints du cancer de la vessie entre dans ce cadre de recherche de biomarqueurs. À notre connaissance dans la littérature, c'est une première dans le monde qu'une étude utilise la technique Q-FISH-3D télomère dans le cancer de vessie et sur des cellules circulantes urinaires. En effet, la technique Q-FISH-3D télomère a été appliquée sur plusieurs types de cancers tels que le cancer de la prostate, le cancer de l'œsophage, les glioblastomes, le myélome multiple, le syndrome myélodysplasique, la leucémie myéloïde chronique, la maladie de Hodgkin etc. comme outils de diagnostic, de pronostic ou de surveillance thérapeutique (4–7,76,77,95). Une autre originalité de notre étude est l'application de cette technique sur les cellules circulantes urinaires. Il est à signaler que des études antérieures ont montré l'application de la technique Q-FISH-3D télomère sur différents types cellulaires et différentes préparations pathologiques (4–7,76,77,95). L'application la plus proche à la nôtre a été faite sur des cellules tumorales circulantes du sang provenant du cancer de la prostate (7).

Après avoir fait la mise au point de la technique Q-FISH-3D télomère sur les cellules circulantes urinaires dans le cancer de la vessie, nous avons évalué les paramètres définissant l'organisation nucléaire de leurs télomères dans les cellules normales et cancéreuses. Cette étude est l'une des rares qui a fait des comparaisons entre les profils 3D-télomères des cellules normales et cancéreuses. L'intérêt majeur de cette comparaison est que dans chaque échantillon on aura un contrôle interne expérimental et biologique. En outre, les données sur l'organisation nucléaire des télomères permettent l'analyse de plusieurs caractéristiques de la biologie néoplasique dans une même cellule tumorale (7, 54,101).

En faisant une comparaison globale entre les cellules normales et celles cancéreuses des échantillons de l'ensemble des 10 patients, nous avons observé que tous les paramètres des cellules cancéreuses étaient statistiquement différents de ceux des cellules normales. Ces résultats attestent qu'on peut faire une différence entre l'organisation nucléaire des télomères entre les cellules normales et celles cancéreuses à partir des cellules circulantes urinaires des patients atteints du cancer de la vessie.

Ensuite, nous avons analysé les échantillons (cellules normales comparées aux cellules cancéreuses) de chaque patient. Nous avons trouvé que 4 des 6 paramètres qui sont le nombre

des télomères par cellules, l'index de distribution nucléaire des télomères, la distance relative des télomères par rapport au centre nucléaire, et le volume nucléaire étaient plus élevés dans les cellules cancéreuses que celles normales chez chaque patient. En outre, chez 9 des 10 patients, les agrégats télomériques étaient aussi plus nombreux dans les cellules cancéreuses que dans celles normales. L'élévation de ces différents paramètres est un indicateur d'un degré plus élevé de l'instabilité génomique et par conséquent du stade avancé de ces cellules tumorales (54).

Le nombre élevé des télomères est un indicateur d'aneuploïdie. Le changement du nombre de copies chromosomiques est caractéristique du cancer de la vessie. En effet, l'augmentation du nombre de copies de certains chromosomes a été associée à un mauvais pronostic dans le cancer de la vessie (102,105). Nous avons observé une augmentation de l'index de distribution nucléaire des télomères chez tous les patients et une élévation de la valeur de cet index a été associée à une prolifération excessive des cellules cancéreuses (70,77). Il a été démontré que des tumeurs vésicales présentant une prolifération cellulaire accrue est associée à un stade pathologique avancé de la maladie (103). L'augmentation du volume nucléaire, le pléomorphisme nucléaire, l'irrégularité du contour nucléaire et le relâchement de la chromatine étaient des caractéristiques nucléaires des cellules cancéreuses qu'on a observées chez chaque patient. Ces différentes caractéristiques attestent que ces cellules étaient de haut grade qui est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer de la vessie (104). Un autre élément de l'altération de l'organisation nucléaire des télomères des cellules cancéreuses vésicales que nous avons retrouvé dans cette étude était l'augmentation du nombre d'agrégats télomériques. Un nombre élevé d'agrégats télomériques témoigne de réarrangements chromosomiques et d'instabilité génomique plus accrue (54,74,101). Dans cette étude, les télomères des cellules cancéreuses vésicales avaient une localisation nucléaire plus centrale que celles des cellules normales. Très peu d'études ont été faites pour élucider l'impact biologique de la location nucléaire des télomères dans les cellules cancéreuses. Il a été quand même suggéré que le changement de la position des télomères est associé à des anomalies chromosomiques et à un remaniement de l'échafaudage nucléaire (54,68). Enfin, nous avons observé que l'intensité des télomères, qui est l'indicateur de la longueur des télomères, était diminuée dans les cellules cancéreuses de 7 des 10 patients. Le raccourcissement des télomères a été associé aux stades avancés de la néoplasie vésicale et à un mauvais pronostic des patients (81–84).

Dans cette étude, nous avons aussi fait une analyse statistique, qui n'a jamais été faite auparavant, pour déterminer l'hétérogénéité cellulaire à partir de l'évaluation de l'organisation nucléaire des télomères. Nous avons comparé les deux catégories de cellules (cancéreuses et

normales) en termes d'homogénéité cellulaire. Nous avons constaté que chez 9 des 10 patients, les cellules cancéreuses étaient plus hétérogènes, en fonction de la longueur des télomères et de leur nombre, que celles normales. Cette hétérogénéité peut évoquer une évolution clonale et une instabilité génomique. Cependant, nous devons analyser plusieurs échantillons pour pouvoir démontrer cette évolution clonale. Cette nouvelle méthode d'analyse des données télégénomiques ouvre des perspectives pour déterminer avec plus de précision des caractéristiques des cellules cancéreuses telles que l'évolution clonale, l'instabilité génomique, l'expansion tumorale et le processus d'invasion du stroma et des tissus de voisinage.

Nous n'avons pas pu faire des analyses statistiques pour déterminer la corrélation entre les données cliniques et télégénomiques à cause de la petite taille de l'échantillon. Cependant, à partir de la description clinique et télégénomique de chaque patient, on peut suggérer qu'il y a une tendance vers une association entre le stade avancé du cancer de la vessie et le niveau d'altération de l'organisation nucléaire des télomères. Par conséquent, il est essentiel d'étudier des échantillons provenant d'un nombre important de patients. Ainsi, cette étude permettra de faire des analyses statistiques de corrélation et d'association dans la perspective de découvrir des biomarqueurs de diagnostic, de pronostic, prédictif ou de surveillance thérapeutique dans le cancer de la vessie.

7 CONCLUSION

Le cancer de la vessie est un véritable problème de santé publique au Mali. L'acquisition d'un biomarqueur pourrait être un tournant décisif dans la prise en charge de cette pathologie au Mali et même dans le monde. Les études de l'instabilité génomique et d'hétérogénéité génétique sont essentielles pour comprendre l'initiation, l'évolution et la progression du cancer. Beaucoup d'auteurs ont utilisé l'analyse 3D des télomères pour l'identification et validation de nouveaux marqueurs du cancer. Ils ont également utilisé les cellules circulantes pour suivre les changements génétiques acquises au cours de la croissance et du développement de la tumeur et pour surveiller la progression d'une tumeur et la résistance au traitement. Avec certains avantages et limites, les analyses 3D des télomères dans les cellules isolées dans les urines des patients peuvent ajouter une valeur prédictive et pronostique importante. Enfin vu le nombre restreint de notre échantillon et les résultats obtenus nous pourrions dire qu'il pourrait avoir une corrélation entre l'altération de l'organisation des télomères et l'agressivité du cancer de la vessie. D'autres études avec des échantillons plus élargies sont nécessaires pour nous éclairer plus sur nos résultats obtenus.

8 RECOMMANDATIONS

➤ Aux autorités

- Renforcer la communication sur le cancer en général en particulier sur le cancer de la vessie.
- Promouvoir la recherche sur le cancer de la vessie.
- Renforcer les compétences des prestataires des structures sanitaires de premier échelon au diagnostic du cancer de la vessie.
- Lutter efficacement contre la bilharziose urinaire.
- Encourager les étudiants à aller vers la recherche en leur offrant un prix de thèse ou une bourse.
- Introduire et développer les tests génétiques comme outils de diagnostic, de pronostic et surveillance du cancer.

➤ Aux personnels soignants

- Sensibiliser la population sur la nécessité d'une prise en charge rapide face à un des symptômes du cancer de la vessie.
- Rendre disponible les données épidémiologiques, cliniques et biologiques des patients atteints du cancer de la vessie.
- Participer à la recherche sur le cancer de la vessie.

➤ A la population

- S'informer sur le cancer de la vessie.
- Éviter les retards de consultation face aux symptômes évoquant le cancer de la vessie.
- Réduire les risques liés au cancer de la vessie tels que : le tabagisme, la bilharziose, les produits chimiques etc.

9 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Nicholson JM, Cimini D. Cancer karyotypes: survival of the fittest. *Front Oncol.* 2013 Jun 7;3:148.
2. Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JWW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;107(3):309–30.
3. Tanaka K, Hirota T. Chromosomal instability: A common feature and a therapeutic target of cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2016 Aug 1;1866(1):64–75.
4. Knecht H, Kongruttanachok N, Sawan B, Brossard J, Prévost S, Turcotte E, et al. Three-dimensional Telomere Signatures of Hodgkin- and Reed-Sternberg Cells at Diagnosis Identify Patients with Poor Response to Conventional Chemotherapy. *Transl Oncol.* 2012 Aug;5(4):269–77.
5. Samassekou O, Hébert J, Mai S, Yan J. Nuclear remodeling of telomeres in chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013 May;52(5):495–502.
6. Sunpaweravong S, Sunpaweravong P, Sathitruangsak C, Mai S. Three-dimensional telomere architecture of esophageal squamous cell carcinoma: comparison of tumor and normal epithelial cells. *Dis Esophagus.* 2016 May;29(4):307-13.
7. Awe JA, Saranchuk J, Drachenberg D, Mai S. Filtration-based enrichment of circulating tumor cells from all prostate cancer risk groups. *Urol Oncol.* 2017 May;35(5):300–9.
8. Kamina P. Anatomie clinique Tome 4: Organes urinaires et génitaux pelvis - coupes du tronc. 3th ed. Paris: Maloine; 2014.
9. Comprendre le cancer de la vessie [Internet]. Bruxelles: Roche Belgique; 2020 Dec 07. [cited 2021 Sep 23]. Available from: <https://www.roche.be/fr/patients/maladies/cancer-de-la-vessie/comprendre.html>.
10. Ruddon RW. *Cancer Biology.* 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.
11. Niederhuber JE, Armitage JO, Doreoshow JH, Kastan MB, Tepper JE. *Abeloff's Clinical Oncology.* 6th ed. Philadelphia: ELSEVIER; 2020.
12. Uhry Z, Remontet L, Colonna M, Belot A, Grosclaude P, Mitton N, et al. Cancer incidence estimation at a district level without a national registry: a validation study for 24 cancer sites using French health insurance and registry data. *Cancer Epidemiol.* 2013 Apr;37(2):99–114.
13. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018

- Jan;68(1):7–30.
14. Descazeaud A, Mignard JP, Davin JL, Irani J. Traitement par instillations vésicales de BCG et mitomycine C dans les tumeurs de vessie n'infiltrant pas le muscle : enquête de pratique de l'Afu auprès des urologues français [Treatment of non-muscle invasive bladder tumours by instillations of mitomycin C and BCG: a survey on French urologists by the French Urological Association]. *Prog Urol*. 2009 Oct;19(9):624-31.
 15. 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 Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
 16. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol*. 2017 Jan;71(1):96-108.
 17. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
 18. ARCAGY-GINECO. Épidémiologie de la tumeur de vessie [Internet]. Paris: InfoCnacer; 2020 march 30 [cited 2021 Sep 11]. Available from: <https://www.arcagy.org/infocancer/localisations/rein-et-voies-urinaires/cancer-vessie/maladie/avant-propos.html/>.
 19. Desgrippes A, Meria P, Cortesse A, Cochand-Priollet B, Cariou G. Carcinome épidermoïde de la vessie [Epidermoid carcinoma of the bladder]. *Prog Urol*. 1998 Jun;8(3):321-9.
 20. Adeloye D, Harhay MO, Ayepola OO, Dos Santos JP, David RA, Ogunlana OO, Gadanya M, Osamor VC, Amuta AO, Iweala EE, Auta A, Rebbeck TR. Estimate of the incidence of bladder cancer in Africa: A systematic review and Bayesian meta-analysis. *Int J Urol*. 2019 Jan;26(1):102-112.
 21. Lamine S. Aspects épidémiologiques et anatomopathologiques des cancers de la vessie au Mali [Thèse de Médecine]. Bamako (Mali): Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2014.
 22. World Health Organization, Cancer country profile, 2014. [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2014. [cited 2021 Sep 8]. Available from https://www.who.int/cancer/country-profiles/mli_en.pdf
 23. Issiaka K. Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques des tumeurs de vessie au service d'urologie du chu du pointg a propos de 74 cas [Thèse de Médecine]. Bamako

- (Mali): Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2015.
24. Badiaga CC. Aspects épidémiologiques des tumeurs de vessie dans le service d'urologie du CHU Point-G à propos de 185 cas. *URO ANDRO*. 2018 Dec;1(11).
 25. Vahr S, De Blok W, Love-Retinger N, Thoft Jensen B, Turner B, Villa G, et al. Evidence-based Guidelines for Best Practice in Urological Health Care Intravesical instillation with mitomycin C or bacillus Calmette-Guérin in non-muscle invasive bladder cancer. 2015;(July):88.
 26. Fankhauser CD, Mostafid H. Prevention of bladder cancer incidence and recurrence: nutrition and lifestyle. *Curr Opin Urol*. 2018 Jan;28(1):88-92.
 27. Cancer Research UK. Bladder cancer risk [Internet]. Oxford (England): Cancer Research UK; 2017 [cited 2021 Oct 4]. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/bladder-cancer/risk-factors>.
 28. Bokarica P, Hrkac A, Gilja I. Re: J. Alfred Witjes, Thierry Lebret, Eva M. Compérat, et al. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol* 2017;71:462-75. *Eur Urol*. 2017 Aug;72(2):e45.
 29. Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, et al. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol*. 2017 Mar;71(3):447–61.
 30. Rouprêt M, Neuzillet Y, Pignot G, Compérat E, Audenet F, Houédé N, Larré S, Masson-Lecomte A, Colin P, Brunelle S, Xylinas E, Roumiguié M, Méjean A. Recommandations françaises du Comité de Cancérologie de l'AFU – Actualisation 2018–2020 : tumeurs de la vessie [French ccAFU guidelines – Update 2018–2020: Bladder cancer]. *Prog Urol*. 2019 Sep 20;28(S1):R48-R80.
 31. Rouprêt M, Babjuk M, Compérat E, Zigeuner R, Sylvester RJ, Burger M, Cowan NC, Gontero P, Van Rhijn BWG, Mostafid AH, Palou J, Shariat SF. European Association of Urology Guidelines on Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma: 2017 Update. *Eur Urol*. 2018 Jan;73(1):111-122.
 32. Johnson DE, Schoenwald MB, Ayala AG, Miller LS. Squamous cell carcinoma of the bladder. *J Urol*. 1976 May;115(5):542-4.
 33. Dahm P, Gschwend JE. Malignant non-urothelial neoplasms of the urinary bladder: a review. *Eur Urol*. 2003 Dec;44(6):672–81.
 34. Adama D. Prise en charge des tumeurs de vessie au service d'urologie du CHU Gabriel Toure.[Thèse de Médecine]. Bamako (Mali): Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2012.

35. Anderson B. Bladder cancer: Overview and management. Part 2: Muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *Br J Nurs*. 2018;27(18):S8–20.
36. Pai A, Ayres BE, Nair R, Corbishley C, Naji Z, Bailey M, et al. 1105 The efficacy and safety of mitomycin-C hyperthermia in the treatment of high risk non-muscle invasive bladder cancer in a single regional centre. *Eur Urol Suppl*. 2014 Apr;13(1):e1105.
37. Droller MJ. Bladder cancer. *J Urol*. 1997;157(4):1266–7.
38. He F, Mo L, Zheng X-Y, Hu C, Lepor H, Lee EY-HP, et al. Deficiency of pRb family proteins and p53 in invasive urothelial tumorigenesis. *Cancer Res*. 2009 Dec;69(24):9413–21.
39. Fumagalli C, Ranghiero A, Gandini S, Corso F, Taormina S, De Camilli E, et al. Inter-tumor genomic heterogeneity of breast cancers: comprehensive genomic profile of primary early breast cancers and relapses. *Breast Cancer Res*. 2020 Oct;22(1):107.
40. Andor N, Maley CC, Ji HP. Genomic Instability in Cancer: Teetering on the Limit of Tolerance. *Cancer Res*. 2017 May;77(9):2179–85.
41. Samassekou O, Bastien N, Lichtensztein D, Yan J, Mai S, Drouin R. Different TP53 mutations are associated with specific chromosomal rearrangements, telomere length changes, and remodeling of the nuclear architecture of telomeres. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014 Nov;53(11):934–50.
42. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, Murphy WM, Hautmann SH, Hemstreet GP 3rd, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology*. 2005 Dec;66(6 Suppl 1):35–63.
43. Vargas-Rondón N, Villegas VE, Rondón-Lagos M. The Role of Chromosomal Instability in Cancer and Therapeutic Responses. *Cancers (Basel)*. 2017 Dec;10(1).
44. McClelland SE. Role of chromosomal instability in cancer progression. *Endocr Relat Cancer*. 2017 Sep;24(9):T23-T31.
45. Abraham R, Pagano F, Gomella LG, Baffa R. Chromosomal deletions in bladder cancer: Shutting down pathways. Vol. 12, *Frontiers in Bioscience*. 2007. p. 826–38.
46. Wagner U, Bubendorf L, Gasser TC, Moch H, Görög JP, Richter J, et al. Chromosome 8p deletions are associated with invasive tumor growth in urinary bladder cancer. *Am J Pathol*. 1997 Sep;151(3):753–9.
47. Choi C, Kim MH, Juhng SW, Oh BR. Loss of heterozygosity at chromosome segments 8p22 and 8p11.2-21.1 in transitional-cell carcinoma of the urinary bladder. *Int J cancer*. 2000 May;86(4):501–5.
48. Gibbs M, Stanford JL, McIndoe RA, Jarvik GP, Kolb S, Goode EL, et al. Evidence for

- a rare prostate cancer-susceptibility locus at chromosome 1p36. *Am J Hum Genet.* 1999 Mar;64(3):776–87.
49. Li M, Zhang ZF, Reuter VE, Cordon-Cardo C. Chromosome 3 allelic losses and microsatellite alterations in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol.* 1996 Jul;149(1):229–35.
 50. Bernués M, Casadevall C, Caballín MR, Miró R, Ejarque MJ, Chéchile G, et al. Study of allelic losses on 3p, 6q, and 17p in human urothelial cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999 Jul;112(1):42–5.
 51. de Lange T. How telomeres solve the end-protection problem. *Science.* 2009 Nov;326(5955):948–52.
 52. Griffith JK, Bryant JE, Fordyce CA, Gilliland FD, Joste NE, Moyzis RK. Reduced telomere DNA content is correlated with genomic instability and metastasis in invasive human breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 1999 Mar;54(1):59–64.
 53. de Lange T. Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu Rev Genet.* 2018 Nov;52:223–47.
 54. Samassékou O. Dynamique des changements de la longueur des télomères individuels et de leur architecture nucléaire dans les cellules néoplasiques. PhD [Dissertation]. Sherbrooke (Canada) : Université de Sherbrooke; 2011.
 55. Holmquist GP, Ashley T. Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenet Genome Res.* 2006;114(2):96–125.
 56. Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature.* 2008 Mar;452(7186):492–6.
 57. Schoeftner S, Blasco MA. Chromatin regulation and non-coding RNAs at mammalian telomeres. *Semin Cell Dev Biol.* 2010 Apr;21(2):186–93.
 58. McClintock B. The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1939 Aug;25(8):405–16.
 59. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Sep;85(18):6622–6.
 60. Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P, et al. A human telomeric protein. *Science.* 1995 Dec;270(5242):1663–7.
 61. De Boeck G, Forsyth RG, Praet M, Hogendoorn PCW. Telomere-associated proteins:

- cross-talk between telomere maintenance and telomere-lengthening mechanisms. *J Pathol.* 2009 Feb;217(3):327–44.
62. Mai S, Garini Y. The significance of telomeric aggregates in the interphase nuclei of tumor cells. *J Cell Biochem.* 2006 Apr;97(5):904–15.
63. Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol.* 1973 Sep;41(1):181–90.
64. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Oct;91(21):9857–60.
65. Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, Pettengell R, Han W, Moore MA. Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood.* 1997 Jul;90(1):182–93.
66. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell.* 1985 Dec;43(2 Pt 1):405–13.
67. Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell.* 1987 Dec;51(6):887–98.
68. Gonzalez-Suarez I, Gonzalo S. Crosstalk between chromatin structure, nuclear compartmentalization, and telomere biology. *Cytogenet Genome Res.* 2008;122(3–4):202–10.
69. Gonzalez-Suarez I, Redwood AB, Perkins SM, Vermolen B, Lichtensztejn D, Grotsky DA, et al. Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. *EMBO J.* 2009 Aug;28(16):2414–27.
70. Chuang TCY, Moshir S, Garini Y, Chuang AY-C, Young IT, Vermolen B, et al. The three-dimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *BMC Biol.* 2004 Jun;2:12.
71. Vermolen BJ, Garini Y, Mai S, Mougey V, Fest T, Chuang TC-Y, et al. Characterizing the three-dimensional organization of telomeres. *Cytometry A.* 2005 Oct;67(2):144–50.
72. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature.* 1990 Aug;346(6287):866–8.
73. Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr;91(8):2900–4.

74. Samassekou O. Dynamic length changes of telomeres and their nuclear organization in chronic myeloid leukemia. *Cancers (Basel)*. 2013 Aug;5(3):1086–102.
75. Louis SF, Vermolen BJ, Garini Y, Young IT, Guffei A, Lichtensztein Z, et al. c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul;102(27):9613–8.
76. Gadj M, Adebayo Awe J, Rodrigues P, Kumar R, Houston DS, Klewes L, et al. Profiling three-dimensional nuclear telomeric architecture of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia defines patient subgroups. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 Jun;18(12):3293–304.
77. Gadj M, Fortin D, Tsanaclis A-M, Garini Y, Katzir N, Wienburg Y, et al. Three-dimensional nuclear telomere architecture is associated with differential time to progression and overall survival in glioblastoma patients. *Neoplasia*. 2010 Feb;12(2):183–91.
78. McGrath M, Wong JYY, Michaud D, Hunter DJ, De Vivo I. Telomere length, cigarette smoking, and bladder cancer risk in men and women. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol*. 2007 Apr;16(4):815–9.
79. Pavanello S, Carta A, Mastrangelo G, Campisi M, Arici C, Porru S. Relationship between Telomere Length, Genetic Traits and Environmental/Occupational Exposures in Bladder Cancer Risk by Structural Equation Modelling. *Int J Environ Res Public Health*. 2017 Dec;15(1).
80. Kamata S, Kageyama Y, Yonese J, Oshima H. Significant telomere reduction in human superficial transitional cell carcinoma. *Br J Urol*. 1996 Nov;78(5):704–8.
81. Russo A, Modica F, Guarrera S, Fiorito G, Pardini B, Viberti C, et al. Shorter leukocyte telomere length is independently associated with poor survival in patients with bladder cancer. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol*. 2014 Nov;23(11):2439–46.
82. Zheng X, Wezel F, Azoitei A, Meessen S, Wang W, Najjar G, Wang X, Kraus JM, Kestler HA, John A, Zengerling F, Bolenz C, Günes C. Shorter Leukocyte Telomere Length Is Associated with Worse Survival of Patients with Bladder Cancer and Renal Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 27;13(15):3774
83. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet*. 2003 Feb 1;361(9355):393-5.

84. Willeit P, Willeit J, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Brandstätter A, et al. Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality. *JAMA*. 2010 Jul;304(1):69–75.
85. Broberg K, Björk J, Paulsson K, Höglund M, Albin M. Constitutional short telomeres are strong genetic susceptibility markers for bladder cancer. *Carcinogenesis*. 2005 Jul;26(7):1263–71.
86. Wu X, Amos CI, Zhu Y, Zhao H, Grossman BH, Shay JW, et al. Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Aug;95(16):1211–8.
87. Liehr T. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) - Application Guide*. Jena (Germany): 2nd ed. Springer; 2017.
88. Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet*. 1996 May;5(5):685–91.
89. Guffei A, Lichtensztejn Z, Gonçalves Dos Santos Silva A, Louis SF, Caporali A, Mai S. c-Myc-dependent formation of Robertsonian translocation chromosomes in mouse cells. *Neoplasia*. 2007 Jul;9(7):578–88.
90. Pellestor F, Paulasova P, Macek M, Hamamah S. [The peptide nucleic acids (PNAs): “high-tech” probes for genetic and molecular cytogenetic investigations]. *Med Sci (Paris)*. 2005;21(8–9):753–8.
91. Florijn RJ, Slats J, Tanke HJ, Raap AK. Analysis of antifading reagents for fluorescence microscopy. *Cytometry*. 1995 Feb;19(2):177–82.
92. Schaefer LH, Schuster D, Herz H. Generalized approach for accelerated maximum likelihood based image restoration applied to three-dimensional fluorescence microscopy. *J Microsc*. 2001 Nov;204(Pt 2):99–107.
93. Klewes L, Höbsch C, Katzir N, Rourke D, Garini Y, Mai S. Novel automated three-dimensional genome scanning based on the nuclear architecture of telomeres. *Cytometry A*. 2011 Feb;79(2):159–66.
94. Guffei A, Sarkar R, Klewes L, Righolt C, Knecht H, Mai S. Dynamic chromosomal rearrangements in Hodgkin’s lymphoma are due to ongoing three-dimensional nuclear remodeling and breakage-bridge-fusion cycles. *Haematologica*. 2010 Dec;95(12):2038–46.
95. Rangel-Pozzo A, Yu PLI, LaL S, Asbaghi Y, Sisdelli L, Tammur P, et al. Telomere Architecture Correlates with Aggressiveness in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr;13(8).
96. Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press; 1987.

97. Samassekou O, Li H, Hébert J, Ntwari A, Wang H, Cliché CG, et al. Chromosome arm-specific long telomeres: a new clonal event in primary chronic myelogenous leukemia cells. *Neoplasia*. 2011 Jun;13(6):550–60.
98. Bowa K, Mulele C, Kachimba J, Manda E, Mapulanga V, Mukosai S. A review of bladder cancer in Sub-Saharan Africa: A different disease, with a distinct presentation, assessment, and treatment. *Ann Afr Med*. 2018;17(3):99–105.
99. Heyns CF, van der Merwe A. Bladder cancer in Africa. *Can J Urol*. 2008 Feb;15(1):3899–908.
100. Chavan S, Bray F, Lortet-Tieulent J, Goodman M, Jemal A. International variations in bladder cancer incidence and mortality. *Eur Urol*. 2014 Jul;66(1):59–73.
101. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Padala SA, Barsouk A. Epidemiology of Bladder Cancer. *Med Sci (Basel, Switzerland)*. 2020 Mar;8(1).
102. Florl AR, Schulz WA. Chromosomal instability in bladder cancer. *Arch Toxicol*. 2008 Mar;82(3):173-82.
103. Kosuge N, Saio M, Matsumoto H, Aoyama H, Matsuzaki A, Yoshimi N. Nuclear features of infiltrating urothelial carcinoma are distinguished from low-grade noninvasive papillary urothelial carcinoma by image analysis. *Oncol Lett*. 2017 Sep;14(3):2715–22.
104. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*. 2016 Jul;70(1):106–19.
105. Bonberg N, Taeger D, Gawrych K, Johnen G, Banek S, Schwentner C, Sievert KD, Wellhäußer H, Kluckert M, Leng G, Nasterlack M, Stenzl A, Behrens T, Brüning T, Pesch B; UroScreen Study Group. Chromosomal instability and bladder cancer: the UroVysion(TM) test in the UroScreen study. *BJU Int*. 2013 Aug;112(4):E372-82.

ANNEXES

FICHE SIGNALITIQUE

Nom : Doumbia

Prénom : Ousmane

Email : ousbidoum1990@gmail.com

Pays d'origine : Mali

Année universitaire : 2020-2021

Ville de soutenance : Bamako

Titre de la thèse : Étude de l'Organisation Nucléaire dans les Cellules Circulantes Urinaires du Cancer de la Vessie

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) de Bamako.

Secteur d'intérêt : Urologie, Oncologie, Biologie moléculaire, Génétique, Recherche scientifique.

Résumé : Le cancer de la vessie est dû à une prolifération excessive de cellules anormales de la paroi vésicale. Il est considéré comme le 3^{ème} et le 5^{ème} cancer chez l'homme et la femme, respectivement, selon le registre malien des cancers. En 2015, elle était la première cause de décès par cancer dans le service d'urologie du CHU-Point G. Le pronostic sombre des patients atteints du cancer de la vessie pourrait être dû à la présence de formes agressives, associées à une instabilité génomique. Cette instabilité pourrait être déterminée en étudiant l'organisation nucléaire télomérique des cellules cancéreuses.

Objectifs : Étudier l'organisation nucléaire des télomères dans les cellules circulantes urinaires des patients souffrant du cancer de la vessie.

Méthodologie : Les données cliniques ont été collectées à partir des dossiers cliniques des patients. Nous avons utilisé des préparations cytologiques à partir de cellules circulantes urinaires des patients pour évaluer l'organisation nucléaire des télomères. La technique 3D-FISH télomères, la microscopie à épifluorescence 3D et le logiciel TeloView d'analyse des télomères ont été utilisés pour évaluer l'organisation nucléaires des télomères. Les données cliniques et télégénomiques ont fait l'objet d'analyses statistiques.

Résultats : Nous avons observé que 6 des 10 patients étaient des femmes. Les tranches d'âge les plus représentées étaient 40-50 ans et 60-70 ans. L'âge moyen des patients était de 56 ans avec des extrêmes de 33 ans et 87 ans. Le carcinome épidermoïde était le type histologique le

plus représenté. La médiane de survie des patients était de 90 jours et la majorité des patients était décédée au cours des 120 jours après le diagnostic.

Nous avons mis au point la technique 3D-FISH télomères pour évaluer l'organisation nucléaire des télomères à partir de cellules urinaires circulantes. La concentration et le temps de pepsine, la température et le temps d'hybridation, et le temps et la température de lavage étaient les conditions techniques qui ont été optimisées.

Nous avons observé que les cellules cancéreuses présentaient plus de télomères et d'agrégats télomériques, mais des télomères plus courts que ceux des cellules normales. Les noyaux des cellules tumorales étaient deux fois plus grands que ceux des cellules normales. L'indice de distribution nucléaires des télomères qui correspond à l'index de prolifération cellulaire était aussi deux fois plus élevé dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales. Enfin, les télomères des cellules cancéreuses avaient une localisation nucléaire plus centrale que ceux des cellules normales. En outre, nous avons constaté que les cellules cancéreuses étaient plus hétérogènes que cellules normales. Enfin, nous avons remarqué qu'il y avait une tendance vers une association entre le stade avancé du cancer de la vessie et le niveau d'altération de l'organisation nucléaire des télomères.

En conclusion le cancer de la vessie est un véritable problème de santé publique au Mali. L'acquisition d'un biomarqueur pourrait être un tournant décisif dans la prise en charge de cette pathologie au Mali et même dans le monde.

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT



Consentement de participation à une étude de recherche

IDENTIFICATION

Nom de l'étude : Étude de l'Organisation Nucléaire des Télomères dans le Cancer de la Vessie

Étudiant-chercheur responsable de l'étude : Ousmane Doumbia

Téléphone : 71607966 /66922460

Nom du participant : _____

Age : _____ Sexe : _____ Contact : _____

Introduction :

Vous êtes invité à prendre part à la présente étude de recherche entrant dans le cadre d'une thèse de Doctorat en médecine de la Faculté de Médecine, et d'odontostomatologie (FMOS) de l'université de Bamako (Mali).

Nous tenons à ce que vous ayez connaissance des points suivants :

- La participation à cette étude de recherche est entièrement volontaire.
- Vous pouvez choisir de ne pas y participer ou vous pouvez vous retirer de l'étude à tout moment; dans ce cas, les renseignements vous concernant seront détruits.
- Vous demeurez libre de ne pas répondre à une question que vous estimez embarrassante.
- Il se peut que votre participation ne vous procure aucun avantage financier. La recherche peut nous apporter des connaissances nous permettant de vous aider et d'aider d'autres personnes dans l'avenir.

BUT GÉNÉRAL :

Le but de cette étude consiste à **déterminer le désordre génétique dans le cancer de la vessie et le corrélér avec le pronostic des patients**. Cette étude est réalisée dans le cadre d'une thèse de Doctorat en médecine réalisé sous la direction du professeur Mahamadou Traore et du Docteur Oumar Samassekou de la faculté de médecine et d'odontostomatologie de l'USTTB.

PROCÉDURE(S) OU TÂCHES DEMANDÉES AU PARTICIPANT :

Un questionnaire vous sera soumis sur votre maladie et sur vos antécédents personnels et familiaux entre autres. Un prélèvement de votre sang périphérique; d'urine et de morceau de tissu après chirurgie qui seront pris en charge au cours de la visite au laboratoire de neuroscience du point G.

Des tests génétiques suivants seront réalisés sur les cellules provenant de votre urine; sang et une partie de la tumeur qui a servi au diagnostic du cancer:

- Réaction en chaîne par polymérase (PCR)
- Séquençage
- Technique d'hybridation in situ fluorescente

Risques et avantages :

-Lors du remplissage du questionnaire vous pouvez vous sentir mal à l'aise en raison de la difficulté de partager des renseignements personnels sur vos antécédents.

-Lors de la prise de sang il se peut que vous sentiez un léger inconfort et fassiez un bleu au site de ponction à l'aiguille. Il existe un faible risque d'évanouissement ou d'infection au niveau de la zone d'insertion de l'aiguille.

-Pour les tests génétiques la confidentialité de toutes les informations génétiques sera assurée.

Votre participation à cette étude peut ne pas vous procurer un avantage direct, mais peut nous permettre d'acquérir des informations susceptibles de nous aider à notre étude de recherche

ANONYMAT ET CONFIDENTIALITÉ

Il est entendu que les renseignements recueillis lors de l'entrevue sont confidentiels et que seuls, le responsable de l'étude et son directeur de recherche le professeur Mahamadou Traoré et Docteur Oumar Samassekou auront accès aux données de cette étude. Le matériel de recherche ainsi que votre formulaire de consentement seront conservés séparément sous clé par l'étudiant-chercheur responsable de l'étude.

COMPENSATION FINANCIÈRE

Votre participation à ce projet est offerte gratuitement. Un résumé des résultats de recherche vous sera transmis au moment opportun. Ce travail est effectué dans le cadre d'une thèse de doctorat en médecine

DES QUESTIONS SUR L'ETUDE OU SUR VOS DROITS :

Vous pouvez contacter l'étudiant-chercheur responsable de l'étude au numéro 71607966/66922460 ou ousbidoum1990@gmail.com pour des questions additionnelles.

Vous pouvez également échanger avec le directeur de recherche Professeur Mahamadou Traore au numéro : 66723208 ou sur E-mail seybatraore@yahoo.fr ou avec le Professeur Berthé Honoré J.G au 66783938 ou berthonore@hotmail.com des conditions dans lesquelles se déroule votre participation et de vos droits en tant que participant à cette recherche.

REMERCIEMENTS

Votre collaboration est importante à la réalisation de ce projet et nous tenons à vous en remercier par avance.

SIGNATURES

Je reconnais avoir lu le présent formulaire de consentement libre et éclairé et consens volontairement à participer à cette étude de recherche. Je reconnais aussi que le responsable de l'étude a répondu à mes questions de manière satisfaisante et que j'ai disposé suffisamment de temps pour réfléchir à ma décision de participer. Je comprends que ma participation à cette recherche est totalement volontaire et que je peux y mettre fin en tout temps, sans pénalité d'aucune forme ni justification à donner. Il me suffit d'en informer le responsable de l'étude.

Signature du participant : _____ Date _____

Nom du Témoin : _____

Signature du Témoin : _____ Date _____

Je déclare avoir expliqué le but, la nature, les avantages, les risques de l'étude et avoir répondu au meilleur de ma connaissance aux questions posées.

Signature de l'étudiant-chercheur responsable de l'étude: _____ Date _____

FICHE D'ENQUETE

Fiche No :

Code ID du Patient :

I. Identité du Patient

Nom : Prénom : Age :
Sexe : Profession : Ethnie :
Alphabétisé : 1= Oui 2= Non
Adresse : Nationalité Tel :
Statut Matrimoniale : Médecin traitant :

II. Antécédents

Personnels :
Médicaux :
Chirurgicaux :
Gynéco obstétricaux :
Familiaux :
Autres :

III. Facteurs de Risques

Oui = 1 ; Non = 2 ; Pas d'info = 3

1 Tabagisme/.../
Sevrage...../.../
Durée (en année)...../.../
Infections urinaires chroniques...../.../
Schistosomiase...../.../
Exposition chimique...../.../
Nom du Produit :
Autres :

IV. Données Cliniques

Motif d'Hospitalisation :
Etat général au moment du diagnostic :
Hématurie : 1=Terminale, 2=Totale ; 3=Initiale
Dysurie : 1=Oui 2=Non
Douleur sus Pubienne : 1=Oui 2= Non
Lombalgie : 1= Oui 2=Non

Rétention Aigue d'Urine : 1=Oui 2=Non

Rétention Chronique d'Urine : 1=Oui 2=Non

Pollakiurie : 1=Oui 2=Non

Brulure mictionnelle : 1=Oui 2=Non

Douleur osseuse : 1=Oui 2=Non

Adénopathie : 1=Oui 2=Non

Stade de la Maladie :

Aspect de l'urine :

Diagnostic principal :

V. Données Paracliniques

NFS à l'entrée :

Globules R Hémoglobine CCMHVGGM Globules B Plaquettes Lymphocytes

Créatininémie :

Acide Urique :

Urée :

ECBU + AntibioGramme :

Bandelettes urinaires : 1= Hématurie, 2= leucocytes, 3= protéinurie, 4=pH....

Présence de granulome bilharzien :

Les types de prélèvements :/.../

1= cystectomie totale ; 2= cystectomie partielle ; 3= copeaux de résection ; 4= biopsie

Date de la biopsie :

Aspects macroscopiques :/.../

1= polypoïde ; 2= Bourgeonnante ; 3= papillaire ; 3= Autres à préciser

Type histologique :/...../

1= Carcinome urothélial ; 2= Carcinome épidermoïde ; 3= Adénocarcinome ; 4= Carcinome indifférencié

Présence de métastase ou l'invasion locale :

Résultat de la cystoscopie :

Résultat de l'échographie :

Résultat de l'Uroscanner :

Type de traitement médical :

Type de chirurgie :

Date de l'intervention :

VI. Données des télomères

Nombre moyen de signaux de télomères par cellule

Intensité télomérique par cellule :

Nombre moyen d'agrégats par cellule :

Moyenne du volume nucléaire par cellule :

Indice de distribution nucléaire des télomères :

Distance moyenne des télomères du centre nucléaire :

SCRIPT D'ANALYSE DE L'HETEROGENEITE CELLULAIRE

➤ Objectif :

L'objectif de ce script est de calculer l'index d'hétérogénéité cellulaire à partir de données de l'intensité télomérique, du nombre de télomères et du coefficient de variation de l'intensité télomérique. Ces données ont été générées à partir de l'étude de Mr Ousmane Doumbia.

➤ Méthodologie :

Auteur : Modibo K Goita

Date : 22-Fevrier-2021

Langage de programmation utilisée : Python (version 3.9)

Integrated Development Environment (IDE) utilise: Pycharm (version 2021.1.1)

➤ Packages Utilisés :

Pandas : Offre des structures de données qui permettent de manipuler les données. Ici nous l'avons utilisé pour filtrer en fonction des patients et de type cellulaire. [Site web officiel](#)

SciPy : Est une bibliothèque Python, gratuite et très populaire utilisée dans l'ingénierie de l'informatique. Contient plusieurs modules notamment Stats (scipy.stats) qui contient les fonctions statistiques dont zscore pour normaliser les données d'un échantillon formule : $z = (x_i - \mu) / \sigma$ où x_i = valeur observée, μ = moyenne de l'échantillon et σ = la déviation standard de l'échantillon (l'écart-type) [Site officiel](#)

Csv : Une bibliothèque native de Python pour la création, la modification des fichiers de type csv (séparateur des valeurs par virgule)

Itertools : Module native de python qui permet aussi la manipulation des données, notamment ici utilisé pour générer des combinaisons de points, et à changer de type cellulaire en fonction de l'identifiant d'un patient dans les conditions de loop for. [Documentation](#)

Math : Aussi un package natif de python qui contient toutes les fonctions mathématiques ; ici la fonction racine carrée a été utilisée pour calculer les distances formule :

$$dist_{2D} = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}, \quad dist_{3D} = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2}$$

➤ Organisation du script :

Le script contient deux principales fonctions :

1- Fonction *normal_data* :

- Filtre le fichier csv des données brutes (Cell_data) par patient en fonction de type cellulaire (Cellule normales, Cellule pathologique) ;
- À partir du filtre les données sont normalisées (signifie l'ajustement des valeurs mesurées sur différentes échelles à une échelle théoriquement commune), et

stocké dans un fichier csv appelé **Cell_Data_normal.csv** qui sera utilisé par la seconde fonction pour calculer les distances

2- Fonction **distance_calc** :

- Filtre le fichier csv **Cell_Data_normal.csv** par patient
- Génère une combinaison de point de coordonnée x, y puis x, y et z entre chaque variable
- La distance est calculée entre chaque point x et y (distance 2D) puis x, y et z (distance 3D)
- Le résultat est stocké dans un fichier csv appelé **Distance**.

NB : Après la normalisation, si nous la moyenne de l'échantillon $(M1+M2+\dots+M10/10)=0$ et la déviation standard =1.

➤ **Script**

```
Import pandas as pd
import os
from scipy.stats import zscore
import csv
import itertools
from math import sqrt
```

"""

Ce script a pour objectif de normaliser les données brute indépendamment du type cellulaire
En générant un fichier csv nommé Cell_data_normal.csv à la fin qui sera utilisé par la suite
pour calculer les distance.

Les packages utilisées sont: pandas et itertools doivent être installer si c'est déjà fait

Avec le prompt shell faite pip install pandas pour install pandas

et pip install itertools pour installer itertools

Auteurs Modibo K Goita

Date 22/2/2021

"""

```
id_patient = ["P1", "P2", "P3", "P4", "P5", "P6", "P7", "P8", "P9", "P10"]
```



```
cell_type = ["Cellules normales", "Cellules pathologiques"]
headerlist = ['Patient', 'Cell_type', 'Intesites_telomerique', 'Signaux_telomerique',
'Variation_intensites']
headerlist1 = ['Patient', 'Cell_type', 'Distance_2d', 'Distance_3d']
couple_point = []
```

```
# Definitions des fonctions
```

```
def normalize_csv(file):
```

```
    """Fonction pour créer un fichier csv qui contiendra les données normalisé"""
    with open(file, 'w', newline="") as f:
        writer = csv.DictWriter(f, fieldnames=headerlist)
        writer.writeheader()
    return None
```

```
def distance_csv(file):
```

```
    """Fonction pour créer un fichier csv qui contiendra les distances"""
    with open(file, 'w', newline="") as f:
        writer = csv.DictWriter(f, fieldnames=headerlist1)
        writer.writeheader()
    return None
```

```
def dist_d2(x1, x2, y1, y2):
```

```
    """ Fonction de calcul de la distance 2 dimension """
    d2_dist = sqrt((x2 - x1)**2 + (y2 - y1)**2)
    return d2_dist
```

```
def dist_d3(x1, x2, y1, y2, z1, z2):
```

```
    """ Fonction de calcul de la distance 3 dimension """
    d3_dist = sqrt((x2 - x1)**2 + (y2 - y1)**2 + (z2 - z1)**2)
    return d3_dist
```

```
normalize_csv('Cell_Data_normal.csv')
```

```
distance_csv('Distance.csv')
```

```
"""
```

La fonction ci-dessous permet le filtrage et la normalisation de: Intensités télomériques, Nombre de Signaux télomériques et la Variation de l'intensités télomériques. La sortie est un fichier

csv du nom de Cell_Data_normal.csv qui sera par la suite utilisé pour calculer les distance

```
"""
```

```
def normal_data(id_patient, cell_type, file):
```

```
    data = pd.read_table(file, sep=',', decimal='.')
```

```
    data_short = data.loc[(data['Patients'] == id_patient) & (data['Type_cellulaire'] == cell_type), :]
```

```
    zcr_intensite = list(zscore(data_short['Intensites_telomeriques'][:]))
```

```
    zcr_signaux = list(zscore(data_short['Signaux_telomeriques'][:]))
```

```
    zcr_variation = list(zscore(data_short['Variation_intensites_telomeriques'][:]))
```

```
    with open('Cell_Data_normal.csv', "a", newline=") as file:
```

```
        write = csv.writer(file)
```

```
        for (m, n, k) in zip(zcr_intensite, zcr_signaux, zcr_variation):
```

```
            write.writerow([id_patient, cell_type, m, n, k])
```

```
    return None
```

```
# La fonction pour le calcul des distances
```

```
def distance_calc(id_patient1, cell_type1, file):
```

```
    data = pd.read_table(file, sep=',', decimal='.')
```

```
    short_file = data.loc[(data['Patient'] == id_patient1) & (data['Cell_type'] == cell_type1), :]
```

```
    nombre_telomerique = list(short_file['Signaux_telomerique'][:])
```

```
    itensite_moy = list(short_file['Intesites_telomerique'][:])
```

```
    variation = list(short_file['Variation_intensites'][:])
```

```
# Génération de combinaison entre les points
for x, y, z in zip(nombre_telomerique, itensite_moy, variation):
    couple_point.append(list([x, y, z]))

all_comb = list(itertools.combinations(couple_point, 2))

# Calcule de distance entre chaque points
for k in all_comb:
    pt1, pt2 = k[0], k[1]
    x1, y1, z1 = pt1[0], pt1[1], pt1[2]
    x2, y2, z2 = pt2[0], pt2[1], pt2[2]
    distance_2d = dist_d2(x1, x2, y1, y2)
    distance_3d = dist_d3(x1, x2, y1, y2, z1, z2)
    # le nom du fichier ici doit être le même que vous avez donné en haut
    with open('Distance.csv', "a", newline=") as file:
        write = csv.writer(file)
        write.writerow([id_patient1, cell_type1, distance_2d, distance_3d])
    couple_point.clear()
return None

# Appel à la fonction dans un loop for pour permuter les id_patient et type cellulaire
# le nom du fichier dans la fonction depend du nom de votre fichier qui contient les données
for i, j in itertools.product(id_patient, cell_type):
    normal_data(i, j, 'Cell_Data.csv')

# Appel à la fonction dans un loop for pour permuter les id_patient et type cellulaire
# Ici on ne change pas le nom du fichier csv
for i, j in itertools.product(id_patient, cell_type):
    distance_calc(i, j, 'Cell_Data_normal.csv')

os.remove("Cell_Data_normal.csv")
```

SERMENT D'HYPPOCRATE

En présence des maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure au nom de l'être suprême d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient. Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !