

DÉTECTER LE CANCER DE LA VESSIE À PARTIR D'ÉCHANTILLONS D'URINE

A. THOMAS (1), I. RENARD (2), D. WALTREGNY (3)

RESUME : Le cancer de vessie touche principalement la population d'âge mûr et nécessite une surveillance rapprochée et répétée. La cystoscopie souple associée à la cytologie urinaire sont actuellement les méthodes recommandées dans le diagnostic et le suivi. Parce que les techniques d'imagerie médicale restent aujourd'hui peu performantes pour la détection des tumeurs vésicales, la recherche s'est orientée vers la mise en évidence de marqueurs urinaires des cellules cancéreuses. Différentes approches ont été testées avec des résultats insuffisants pour supplanter la cystoscopie. Récemment, le Service d'Urologie du CHU et la Société de Biotechnologie OncoMethylome Sciences ont évalué l'intérêt de la mise en évidence de gènes hypermethylés à partir d'échantillons d'urine pour le diagnostic du cancer de vessie. Cette méthode est basée sur la technologie de la Methylation-Specific PCR (MSP). L'approche a l'avantage théorique d'être non invasive, reproductible, et basée sur l'analyse de l'ADN dont la stabilité, dans les urines, est supérieure à celle des protéines. Les résultats d'une large étude prospective, récemment publiés dans European Urology, ont montré que l'identification par MSP de 2 gènes méthylés, TWIST1 et NID2, dans les urines est un test sensible ($\pm 90\%$) et spécifique ($\pm 93\%$) pour la détection du cancer de la vessie. La sensibilité du test est largement supérieure à celle de la cytologie alors que la spécificité des 2 méthodes est similaire. Sur base de ces résultats prometteurs, une évaluation de ce test de méthylation dans le cadre du suivi de patients porteurs de tumeurs vésicales superficielles est en cours.

MOTS-CLÉS : *Cancer de vessie - Marqueurs urinaires - Diagnostic - ADN - Méthylation*

INTRODUCTION

EPIDÉMIOLOGIE

Le cancer de vessie affecte principalement la population d'âge mûr, après 50 ans. Le taux d'incidence est de $\pm 1/3.000$ hommes; les hommes sont 4 à 5 fois plus touchés que les femmes. Bien qu'il n'existe actuellement pas de campagne de dépistage du cancer de la vessie, on assiste à une augmentation de son incidence dont l'explication réside principalement dans l'amélioration des techniques diagnostiques, le vieillissement des populations, et le tabagisme qui s'est largement répandu après guerre (1). Le cancer de la vessie représente 7% de tous les cancers chez l'homme, et occupe la 4^{ème} place en termes d'incidence et de mortalité.

DETECTION OF BLADDER CANCER IN VOIDED URINE SAMPLES

SUMMARY : Bladder cancer mainly affects patients aged 50 years or more and requires close and repeated surveillance. Flexible cystoscopy associated with urinary cytology are the currently recommended diagnostic and follow-up methods. Because medical imaging techniques remain rather unsatisfying for bladder carcinoma detection, research efforts have focused on urinary markers of the disease. Various approaches were tested with results generally too unconsistant to replace cystoscopy. Recently, the department of Urology at the University of Liège together with the Biotechnology Company OncoMethylome Sciences have been interested in testing whether the detection of hypermethylated genes in voided urine samples would be of value for the detection of bladder cancer. The method is based on the Methylation-Specific PCR technology (MSP). This approach has the theoretical advantage of being non invasive, reproducible and based on DNA, whose stability, in urine, is higher than that of proteins. The results of a large prospective study, recently published in European Urology, have shown that the identification by MSP of 2 methylated genes, TWIST1 and NID2, in voided urine samples, is a sensitive ($\pm 90\%$) and specific ($\pm 93\%$) test for the detection of bladder cancer. The test is largely more sensitive than cytology while both techniques have similar specificity. Based on these promising results, we are currently evaluating this novel, non invasive MSP approach for the follow-up of patients with non-muscle invasive bladder cancer.

KEYWORDS : *Bladder cancer - Urinary markers - Diagnosis - DNA - Methylation*

TYPES HISTOLOGIQUES DE CANCER VÉSICAL

Dans les pays industrialisés occidentaux, le type histologique presque exclusivement rencontré est le carcinome urothélial (ou carcinome à cellules transitionnelles). Les principaux facteurs de risque sont le tabagisme et l'exposition professionnelle à certains carcinogènes. En Afrique et au Moyen-Orient, les tumeurs épidermoïdes de vessie sont fréquentes et liées à l'infection endémique par *Schistosomia Haematobium* (bilharziose).

Les cancers urothéliaux sont divisés en deux grands groupes selon leur caractère superficiel ou infiltrant. On définit un cancer de vessie comme infiltrant si les cellules cancéreuses infiltrent le muscle propre de la vessie dans les copeaux de résection endoscopique. Par contre, si le développement de la tumeur reste limité à l'urothélium ou à la lamina propria (muqueuse/sous-muqueuse), le cancer est étiqueté comme superficiel. Cependant, cette classification pathologique reste sub-optimale lorsqu'on connaît le taux de mortalité non négligeable des cancers

(1) Assistant, Service d'Urologie, CHU de Liège, (2) Senior Project Leader, OncoMethylome Sciences, Tour GIGA, CHU de Liège, (3) Chef de Service, Chargé de Cours, Maître de Recherches FRS-FNRS, Service d'Urologie, CHU de Liège.

stadifiés pT1 de haut grade et des carcinomes *in situ* (CIS ou Tis) qui sont considérés pathologiquement comme superficiels mais qui, du point de vue clinique, sont associés à un risque très élevé de progression vers un cancer infiltrant. Au diagnostic initial, 70% et 30% des tumeurs sont stadiées superficielles et infiltrantes, respectivement. Plus ou moins 10% sont d'emblée métastatiques.

COÛT DE LA PRISE EN CHARGE DES CANCERS DE VESSIE

Le taux de récidive des cancers superficiels de vessie est important, de 15 à 61% à 1 an et de 31 à 78% à 5 ans. La progression d'un stade superficiel vers un stade invasif est la raison principale de la nécessité d'une surveillance stricte des patients. Les facteurs principaux de progression sont le grade élevé de la tumeur, un stade pathologique pT1 (infiltration de la lamina propria), et la présence concomitante de carcinome *in situ*. Le risque de progression varie de 1 à 45% à 5 ans, selon les caractéristiques cliniques et pathologiques de la tumeur, telles que définies par les tables de l'European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC).

Si l'on respecte les protocoles de surveillance recommandés par l'European Association of Urology, qui a édité des lignes de conduite très utiles et revues en 2008, le traitement et le suivi du cancer de vessie sont considérés comme parmi les plus onéreux de l'ensemble des cancers. Ce coût important pour la Sécurité Sociale est lié au fait que la survie de la plupart des patients, après diagnostic initial d'un cancer de vessie, est longue et nécessite des consultations fréquentes, la répétition d'examens relativement onéreux, et des prises en charge chirurgicales répétées (résection endoscopique des récidives, biopsies, cystectomie...) (2). De longue date, de nombreuses équipes de recherche tentent de mettre au point de nouvelles méthodes de diagnostic et de suivi moins invasives et potentiellement moins coûteuses. Détaillons brièvement les modalités diagnostiques actuelles du cancer vésical.

MODALITÉS DIAGNOSTIQUES ACTUELLES

L'hématurie macroscopique monosymptomatique est le symptôme d'appel le plus fréquent du cancer de vessie; elle est liée à un saignement à point de départ tumoral. Toute hématurie macroscopique doit faire rechercher un carcinome urothelial, jusqu'à preuve du contraire. La mise au point de l'hématurie inclura de principe une cystoscopie, une cytologie, et une tomodensitométrie abdomino-pelvienne qui recherchera

une origine haute au saignement (par exemple carcinome rénal ou carcinome urothelial du haut appareil).

L'hématurie microscopique, quant à elle, est définie par la présence de plus de 5 globules rouges par champ sur le sédiment urinaire. Sa sensibilité pour détecter un carcinome urothelial est élevée uniquement si elle est retrouvée à plusieurs reprises sur des échantillons d'urine différents. Par contre, sa spécificité est faible car de nombreuses pathologies urologiques bénignes telles que la lithiasis urinaire, l'hyperplasie bénigne de la prostate, les traumatismes uro-génitaux et certains états inflammatoires ou infectieux peuvent s'accompagner de sang dans les urines.

Differentes études n'ont pas montré l'intérêt d'un dépistage systématique de l'hématurie microscopique dans la population générale. De même, la tigette urinaire ne fait pas partie du suivi habituel du cancer de vessie (3). Il n'existe pas, à ce jour, de test de dépistage du cancer vésical.

CYSTOSCOPIE FLEXIBLE

L'uréthro-cystoscopie reste l'examen de référence recommandé pour le diagnostic initial et la surveillance des cancers vésicaux (4), même si certaines lésions peuvent être non détectées, en particulier des petites plages de carcinome *in situ*. En consultation, le développement de l'endoscopie souple a supplanté l'utilisation des cystoscopes rigides, moins confortables. Néanmoins, cet examen reste invasif et souvent appréhendé par le patient. Il peut être également à l'origine d'une infection iatrogène, d'une hématurie, voire d'une rétention urinaire. Les différents gels lubrifiants utilisés, y compris ceux qui contiennent un anesthésique local, ne permettent pas de rendre l'examen totalement confortable.

CYTROLOGIE URINAIRE

La cytologie urinaire, utilisée depuis de nombreuses années en association avec la cystoscopie, est très spécifique ($\approx 94\%$) mais manque de sensibilité ($\approx 35\%$), en particulier pour la détection des carcinomes urothéliaux de bas grade. Son interprétation est opérateur-dépendante et largement influencée par certaines pathologies vésicales. La cytologie urinaire est souvent ininterprétable en cas d'hématurie massive. Notons également que l'échantillon urinaire doit idéalement ne pas être les premières urines du matin en raison de la lyse des cellules urothéliales qui ont séjourné dans la vessie pendant la nuit.

RÉSECTION ENDOSCOPIQUE

La résection endoscopique de la tumeur primitive constitue la prise en charge diagnostique initiale des cancers de vessie. Elle permet, par une analyse anatomopathologique précise, de connaître la nature exacte de la lésion et de distinguer les carcinomes superficiels des carcinomes infiltrants. Pour la majorité des tumeurs superficielles, la résection endoscopique est suffisante pour éradiquer la lésion; dans certains cas, une ou plusieurs instillations complémentaires d'agent chimiothérapeutique (mitomycine, épirubicine, farmorubicine...) ou de BCG sont recommandées.

HEXAMINOLEVULINATE

L'hexaminolevulinate est une substance fluorescente pouvant être instillée dans la vessie une heure avant la résection endoscopique. Elle a la particularité de se fixer aux cellules tumorales et permet de détecter précocement des plages urothéliales malades non détectées en lumière blanche (6). Néanmoins, l'utilisation de ce produit en routine n'est pas unanimement admise car l'hexaminolevulinate reste relativement coûteux et nécessite un matériel spécifique. De plus, il n'a pas été établi qu'une résection endoscopique, assistée de la fluorescence, réduit le risque de progression de la maladie. Certaines publications suggèrent que l'utilisation de la fluorescence pourrait réduire significativement le risque de récidive, mais ceci reste actuellement débattu.

IMAGERIE MÉDICALE

Les examens d'imagerie médicale, incluant l'échographie, la tomodensitométrie, et la RMN, ont peu de place dans la mise au point diagnostique des cancers de vessie. Néanmoins, la découverte d'une lésion vésicale sur un examen radiologique permet souvent de s'abstenir de réaliser une cystoscopie souple à visée diagnostique en ambulatoire. La résection endoscopique de la lésion est, dans ce cas, d'emblée programmée.

ECHOGRAPHIE VÉSICALE

L'échographie vésicale par voie trans-abdominale a une sensibilité faible pour le diagnostic et le suivi des tumeurs vésicales (tumeur ≥ 5 mm de grand axe). La spécificité est aussi limitée car le diagnostic différentiel d'un «polype» vésical inclut des trabéculations vésicales (obstacle fréquemment lié à une hyperplasie bénigne de prostate au delà de 50 ans), des caillots, et un

lobe médian prostatique. L'échographie par voie intra-vésicale a été abandonnée car elle n'offrait pas plus d'avantage que la cystoscopie. Elle ne permettait notamment pas d'établir un niveau d'infiltration au niveau de la paroi vésicale. L'abord trans-rectal ou trans-vaginal peut parfois s'avérer utile pour certaines localisations, en particulier trigonales (7).

TOMODENSITOMÉTRIE ABDOMINO-PELVienne

Pour le diagnostic initial d'une tumeur vésicale, la spécificité et la sensibilité du scanner est moins importante que la cystoscopie. L'interprétation dépend notamment de l'état de réplétion vésicale lors de l'acquisition des images; il est très difficile d'interpréter un épaissement vésical sur une vessie peu distendue et les petites lésions intra-vésicales peuvent passer inaperçues. Néanmoins, la tomodensitométrie abdomino-pelvienne est toujours demandée en cas de diagnostic initial de tumeur vésicale afin, notamment, d'exclure une lésion concomitante du haut appareil urinaire. Les adénopathies loco-régionales sont également recherchées ainsi que d'éventuelles métastases à distance en cas de tumeur infiltrante.

IMAGERIE PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN)

Elle n'est pas recommandée dans le diagnostic initial d'un cancer de vessie ou dans son suivi.

PET-SCAN

Il n'est pas utilisé pour détecter un carcinome de vessie en routine clinique en raison de nombreux artefacts liés à l'excrétion urinaire du fluoro-deoxy-glucose radiomarqué (7).

TESTS EN COURS DE DÉVELOPPEMENT

Afin de réduire la mortalité due au cancer de vessie, plusieurs pistes peuvent être poursuivies. La première réside évidemment dans la réduction de l'incidence de ces tumeurs en agissant sur leur prévention, notamment en réduisant le tabagisme. Au cours des 20 dernières années, nous avons pas connu d'avancée significative dans le traitement des maladies avancées, en particulier dans le domaine chimiothérapeutique des cancers vésicaux métastatiques. La détection précoce des lésions, grâce à des tests urinaires performants, idéalement sensibles, spécifiques, non invasifs, reproductibles, et «cost-effective», permettrait de préserver la vessie (et ainsi l'agression chirurgicale et la qualité de vie) et d'améliorer la survie. C'est une des raisons pour

lesquelles la mise au point de tels tests serait une avancée significative dans la prise en charge du cancer de vessie.

ANTIGÈNES SOLUBLES

Certains de ces tests reposent sur l'identification, dans des échantillons d'urines, de différents antigènes tumoraux sécrétés ou non, associés au cycle de division cellulaire, à la cascade pro-apoptotique, à la sénescence cellulaire... (BTA-Stat, NMP-22, HA-Haase, survivine, télomerase, cytokératines, BLCA-4, Fas, uCyt, ...). Les différentes études réalisées à ce jour montrent une sensibilité variable, mais surtout, une spécificité souvent inférieure à la cytologie urinaire, menant à la détection de nombreux faux positifs c'est-à-dire de patients présentant des pathologies urinaires bénignes (8-11).

ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

D'autres tests urinaires consistent à identifier des aberrations chromosomiques (délétions chromosomiques, pertes d'allèle, répétition de séquences d'ADN) qui seraient présentes dans les cellules tumorales éliminées dans les urines (UroVysis, DNA microsatellites, ...). La détection se fait principalement par des méthodes d'hybridation en fluorescence relativement coûteuses. Les résultats sont variables et parfois inconstants en raison de critères d'interprétation qui restent flous, et générant de nombreux faux positifs (8-11).

DÉTECTION PAR METHYLATION-SPECIFIC PCR (MSP) DE GÈNES HYPERMÉTHYLÉS POUR LE DIAGNOSTIC NON INVASIF DU CANCER DE VESSIE

Le Service d'Urologie du CHU de Liège et la Société de Biotechnologie OncoMethylome Sciences, implantée dans la tour GIGA du CHU de Liège, ont récemment joint leurs efforts pour évaluer l'intérêt de la détection de gènes hypermethylés dans les urines pour identifier les patients porteurs de néoplasie vésicale. Nous retracrons ci-après l'hypothèse de travail, la stratégie utilisée, les résultats obtenus, publiés dans la revue «European Urology», et les perspectives qui en découlent.

HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Le développement cancéreux résulte de nombreuses interactions entre environnement, anomalies géniques et facteurs épigénétiques. Alors que les mutations géniques ont fait l'objet d'intenses investigations, de telles altérations sont

responsables du développement de seulement un petit pourcentage de tous les cancers. Les anomalies épigénétiques représentent en réalité les altérations les plus fréquentes de l'ADN pouvant conduire au développement et à la progression des cancers. Plus spécifiquement, l'hyperméthylation de l'ADN, le mécanisme épigénétique le plus étudié à ce jour, survient quand l'ADN devient méthylé au niveau de régions riches en îlots CpG localisées dans les régions géniques promotrices, ce qui conduit à l'inactivation de la transcription du gène (Fig. 1). Il est aujourd'hui largement reconnu que la méthylation de l'ADN de gènes critiques, tels que les gènes suppresseurs de tumeur, est un événement fréquent et précoce dans le développement néoplasique (12).

Des tests moléculaires permettant de déterminer le statut de méthylation de gènes spécifiques pourraient ainsi être très utiles pour la détection de cellules cancéreuses dans des échantillons cliniques, tels que des biopsies ou des fluides biologiques (sang, urines, selles, salive...). L'ADN est théoriquement une cible moléculaire idéale car il est relativement stable et peut être amplifié par des techniques de PCR («Polymérase Chain Reaction») largement disponibles dans les laboratoires de biologie clinique. La stabilité de l'ADN peut aussi être accrue par l'adjonction au fluide biologique d'inhibiteurs de DNases, les enzymes capables de dégrader l'ADN. La technologie PCR permet, en outre, d'évaluer de toutes petites quantités d'ADN et de détecter l'anomalie ciblée, à savoir l'ADN altéré des cellules cancéreuses dans un environnement beaucoup plus large de cellules non néoplasiques. Les gènes suppresseurs de tumeur

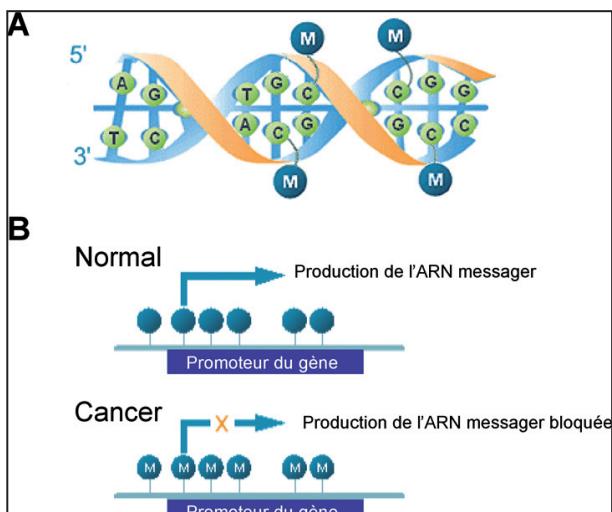


Figure 1. Méthylation des résidus cytosine dans les îlots CpG de la région promotrice d'un gène et répression subséquente de l'expression de l'ARN messager de ce gène. M = résidu méthylé.

sont rarement méthylés dans les cellules non tumorales; dès lors, la méthylation aberrante (hyperméthylation) de ces gènes est aujourd’hui largement reconnue comme un biomarqueur cancéreux (13-14).

La Compagnie OncoMethylome Sciences détient une licence exclusive obtenue auprès de l’Université Johns Hopkins pour exploiter une technologie brevetée appelée la «Methylation-Specific PCR» ou MSP. Cette technologie de référence permet de déterminer quantitativement le statut de méthylation de gènes spécifiques. De nombreux travaux ont montré les avantages de cette méthode, qui incluent une sensibilité, une spécificité et une reproductibilité accrues, par rapport aux méthodes conventionnelles basées sur l’analyse cellulaire (15).

Un certain nombre d’études antérieures avaient montré que plusieurs gènes sont fréquemment méthylés dans le cancer de vessie (16-21). Afin de tester l’intérêt de la détection de gènes hypermethylés dans les urines pour la mise en évidence du cancer de vessie, nous avons utilisé une stratégie expérimentale en 3 étapes.

STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE

Dans une première étape, 4 lignées humaines de cancer de vessie ont été traitées par la 5-aza-2'-déoxycytidine, un agent inhibant les méthyltransférases d’ADN, enzymes responsables de l’addition du groupement méthyl sur les résidus cytosine des îlots CpG. Les gènes dont l’expression est (ré-)apparue ont été identifiés par la technologie des microdamiers d’ADN («microarrays»). Cette approche pharmacologique de démasquage a permis d’identifier plus de 1.000 gènes.

Dans une seconde étape, des tests de méthylation par MSP ont été réalisés pour une série des gènes réexprimés identifiés au cours de la première étape. L’ADN testé a été extrait à partir d’échantillons de tissus vésicaux normaux ou cancéreux. Au cours de cette analyse, une dizaine de gènes sont apparus être uniquement méthylés dans les tissus tumoraux (spécificité de 100%) avec une sensibilité allant de 73% à 34%.

La troisième étape a consisté à évaluer le niveau de méthylation de ces gènes - spécifiquement hypermethylés dans les tissus cancéreux - dans des échantillons urinaires provenant de patients porteurs ou non de cancer de vessie et à comparer les résultats avec ceux de la cytologie en termes de sensibilité et de spécificité. Au total, des échantillons urinaires ont été récoltés chez 496 patients dans 3 centres belges d’Urologie (Centre Hospitalier Universitaire de Liège,

	MSP	Cyto	MSP + Cyto
Sensibilité	90%	48%	96%
Spécificité	93%	96%	90%
VPP	86%	85%	83%
VPN	96%	80%	98%

Figure 2. Sensibilité, spécificité, et valeurs prédictives négatives et positives du test de méthylation TWIST1/NID2 (MSP) et de la cytologie urinaire (Cyto) pour le diagnostic du cancer vésical.

Centre Hospitalier Régional de la Citadelle et Katholieke Universiteit Leuven). Parmi ces 496 patients, 339 étaient porteurs de néoplasie vésicale et 157, présentant une pathologie urologique bénigne (infection urinaire, incontinence, hyperplasie bénigne de prostate...), constituaient le groupe «contrôle». La majorité des patients cancéreux (92%) étaient porteurs d’une tumeur superficielle.

RÉSULTATS

Parmi les différents gènes hypermethylés testés sur les échantillons urinaires, les analyses successives ont permis de démontrer que la détection par MSP dans les urines de 2 gènes hypermethylés, TWIST1 et NID2, est associée à une sensibilité de 90%, largement supérieure à celle de la cytologie (48%) alors que la spécificité était similaire pour les 2 techniques (93% et 96%, respectivement) (Fig. 2) (22). Le test de méthylation était supérieur à la cytologie surtout pour les tumeurs superficielles pTa et de bas grade, pour lesquelles il est connu que la cytologie est généralement peu performante.

L’évaluation des valeurs prédictives négative et positive du test de méthylation et de la cytologie soulignent à nouveau la supériorité du test de méthylation (Fig. 2). Lorsque les tests de méthylation et la cytologie sont combinés, la valeur prédictive négative est de 98%; en d’autres termes, l’utilisation combinée du test de méthylation et de la cytologie permet d’affirmer avec une probabilité de 98% qu’un patient dont les urines ne montrent pas d’anomalie cytologique néoplasique ni de méthylation de TWIST1 et NID2, n’est pas porteur de cancer vésical.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L’identification et la validation de nouveaux marqueurs urinaires du cancer vésical font l’objet d’intenses recherches. Certains d’entre eux

ont déjà été testés à titre individuel mais leur sensibilité et/ou leur spécificité restent trop faibles pour remplacer la cystoscopie souple dans le diagnostic et le suivi des cancers vésicaux.

La détection urinaire par MSP des gènes TWIST1 et NID2 méthylés est une nouvelle approche non invasive pour le diagnostic du cancer vésical primitif. La sensibilité de ce test est nettement supérieure à celle de la cytologie urinaire avec une spécificité comparable. Les résultats que nous avons accumulés sont très encourageants et suggèrent que la détection de gènes hyperméthylés dans les urines de patients porteurs de néoplasie vésicale, pourrait constituer une nouvelle modalité diagnostique de la maladie même à un stade précoce (tumeurs pTa et de bas grade). D'autres études sont nécessaires pour valider ce test. L'avenir de l'approche diagnostique non invasive du cancer vésical réside probablement dans la combinaison de plusieurs tests dont la rentabilité en termes de sensibilité et spécificité est très élevée, mais aussi dont le coût et la disponibilité sont acceptables. Nous poursuivons actuellement d'autres études évaluant l'intérêt de la détection urinaire de gènes hyperméthylés dans le suivi de patients atteints de cancer de vessie.

BIBLIOGRAPHIE

1. Irani J.— Epidémiologie du cancer de vessie. *Prog Urol*, 2003, **13**, 1207-1208.
2. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, et al.— The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*, 2003, **21**, 1315-1330.
3. Shirodkar SP, Lokeshwar VB. Bladder tumor markers: from hematuria to molecular diagnostics – where do we stand ?. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2008, **8**, 1111-1123.
4. Guidelines of the European Association of Urology. <http://www.uroweb.org/nc/professional-resources/guidelines/online/>
5. VanRijn BW, van der Poel HG, et al.— Urine markers for bladder cancer surveillance : a systematic review. *Eur Urol*, 2005, **47**, 736-748.
6. Schmidbauer J.— Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy. *J Urol*, 2004, **171**, 135-138.
7. Vikram R, Sandler CM, Ng CS.— Imaging and staging of transitional cell carcinoma : part I, lower urinary tract. *Am J Roentgenol*, 2009, **192**, 1481-1487.
8. Bischoff CJ, Clark PE.— Bladder cancer. *Curr Opin Oncol*, 2009, **21**, 272-277.
9. Van Tilborg AA, Bangma CH, Zwarthoff EC.— Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening. *Int J Urol*, 2009, **16**, 23-30.
10. Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS.— Bladder cancer. *Lancet*, 2009, **374**, 239-249.
11. Phé V, Rouprêt M, Irani J.— What's new in 2008 in the field of basic and clinical research in bladder cancer ? *Prog Urol*, 2009, **19**, S43-50.
12. Clark SJ, Melki J.— DNA methylation and gene silencing in cancer : which is the guilty party? *Oncogene*, 2002, **21**, 5380-87.
13. Baylin SB.— DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2005, **2**, S4-11.
14. Shames DS, Minna JD, Gazdar AF.— Methods for detecting DNA methylation in tumors : from bench to bedside. *Cancer Lett*, 2007, **28**, 187-198.
15. Derk S, Lentjes MH, Hellebrekers DM, et al.— Methylation-specific PCR unraveled. *Cell Oncol*, 2004, **26**, 291-299.
16. Brait M, Begum S, Carvalho AL, et al.— Aberrant promoter methylation of multiple genes during pathogenesis of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, **17**, 2786-2794.
17. Yu J, Zhu T, Wang Z, et al.— A novel set of DNA methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**, 7296-7304.
18. Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, et al.— Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *J Natl Cancer Inst*, 2006, **98**, 996-1004.
19. Enokida H, Nakagawa M.— Epigenetics in bladder cancer. *Int J Clin Oncol*, 2008, **13**, 298-307.
20. Cairns P.— Gene methylation and early detection of genitourinary cancer : the road ahead. *Nat Rev Cancer*, 2007, **7**, 531-543.
21. Vrooman OP, Witjes JA.— Urinary markers in bladder cancer. *Eur Urol*, 2008, **53**, 909-916.
22. Renard I, Joniau S, van Cleynenbreugel B, et al.— Identification and validation of the methylated TWIST1 and NID2 genes through real-time methylation-specific polymerase chain reaction assays for the noninvasive detection of primary bladder cancer in urine samples. *Eur Urol*, 2009, in press.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au
Pr. D. Waltregny, Service d'Urologie, Bloc Central, -1,
Bat. B35, CHU de Liège, Belgique.
Email : David.Waltregny@ulg.ac.be