

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Année 2012

N°

Thèse

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'Etat

Par

BRICHART Nicolas
13 avril 1982 à Nevers

Présentée et soutenue publiquement le 28 septembre 2012

Etude comparative du polymorphisme du VEGF chez les patients ayant développé un cancer du rein dans la population des transplantés rénaux

Jury

Président de Jury : Monsieur le Professeur Olivier HAILLOT

Membres du jury : Monsieur le Professeur Franck BRUYERE

Monsieur le Professeur Christophe BARON

Monsieur le Docteur Benjamin FAIVRE D'ARCIER

Résumé

INTRODUCTION : La population des greffés rénaux présente un risque accru de tumeurs solides et notamment de tumeurs sur leurs reins propres par rapport à la population générale. Le VEGF est un facteur connu intervenant dans l'angiogenèse tumorale. L'objectif de l'étude était d'étudier le polymorphisme du VEGF comme un facteur pronostic de survenue d'un cancer du rein après transplantation rénale.

MATERIEL ET METHODES : Entre 1985 et 2011, 1619 transplantations rénales ont été effectuées dans notre centre. Parmi ces patients, 16 cas de tumeurs rénales sur reins propres ont été diagnostiqués. Ils ont été appariés à 55 témoins sur l'âge, le sexe, l'année de transplantation, le traitement immunosuppresseur et la durée de suivi. Le polymorphisme du VEGF a été déterminé par une technique validée de biologie moléculaire sur du sérum pour 5 polymorphismes du gène codant le VEGF : - 2549, - 1154, - 460, + 405 et + 936 et a été comparé entre les deux groupes.

RESULTATS : Les deux groupes étaient comparables en ce qui concerne la durée de dialyse ou la présence d'une polykystose rénale. Le groupe cancer était constitué de 44% de carcinomes à cellules claires et 56% de tubulo-papillaires. L'analyse d'association allélique et génotypique n'a pas retrouvé de différence significative. De même, un modèle de régression logistique conditionnelle sur les génotypes n'a pas retrouvé de différence significative entre un certain polymorphisme et le risque de survenue de cancer du rein. Une estimation des haplotypes a été faite et il n'y avait pas de différences entre les cas et les témoins.

CONCLUSION : Dans cette étude, le polymorphisme du VEGF n'est pas associé à la survenue d'un cancer du rein après transplantation rénale. Une étude sur un échantillon plus important et de manière multicentrique est nécessaire afin de confirmer cette hypothèse.

Mots-clés : Cancer rénal, polymorphisme du VEGF, transplantation rénale

Comparative study of VEGF polymorphism in patients with renal cancer in renal transplantation population

Résumé en anglais

INTRODUCTION: The renal transplant population has an increased risk of solid tumors including kidney tumors compared to the general population. VEGF is a known factor involved in tumor angiogenesis. The objective of the study was to investigate the polymorphism of VEGF as a prognostic factor for the occurrence of kidney cancer after renal transplantation.

MATERIALS AND METHODS: Between 1985 and 2011, 1619 kidney transplants were performed at our center. Of these patients, 16 cases of renal tumors were diagnosed. They were matched to 55 controls on age, sex, year of transplantation, immunosuppressive therapy and the duration of follow-up. VEGF polymorphism was determined by a validated molecular biology serum for 5 polymorphisms of the gene encoding VEGF: -2549, -1154, -460, +405 and +936 and was compared between the two groups.

RESULTS: Both groups were comparable with regard to the duration of dialysis and the presence of polycystic kidney disease. The cancer group consisted of 44% of clear cell renal carcinomas and 56% of tubulo-papillary carcinomas. The analysis of genotypic and allelic association was not found significant difference. Similarly, a logistic conditional regression model on genotypes did not find a significant difference between a polymorphism and the risk of developing kidney cancer. An estimate of haplotypes was made and there were no differences between cases and controls.

CONCLUSION: In this study, the VEGF polymorphism is not associated with the occurrence of kidney cancer after renal transplantation. A study on a larger sample and in several centers is needed to confirm this hypothesis.

Key-words: Renal cancer, VEGF polymorphism, renal transplantation

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Professeur Dominique PERROTIN

VICE-DOYEN

Professeur Daniel ALISON

ASSESEURS

Professeur Christian ANDRES, Recherche

Docteur Brigitte ARBEILLE, Moyens

Professeur Christian BINET, Formation Médicale Continue

Professeur Laurent BRUNEREAU, Pédagogie

Professeur Patrice DIOT, Recherche clinique

SECRETAIRE GENERALE

Madame Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Professeur Emile ARON (†) – 1962-1966

Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962

Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- 1966-1972

Professeur André GOUAZÉ - 1972-1994

Professeur Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004

PROFESSEURS EMERITES

Professeur Alain AUTRET

Professeur Jean-Claude BESNARD

Professeur Patrick CHOUTET

Professeur Guy GINIES

Professeur Olivier LE FLOCH

Professeur Chantal MAURAGE

Professeur Léandre POURCELOT

Professeur Michel ROBERT

Professeur Jean-Claude ROLLAND

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Ph. ANTHONIOZ - A. AUDURIER – Ph. BAGROS - G. BALLON – P.BARDOS - J. BARSOTTI

A. BENATRE - Ch. BERGER –J. BRIZON - Mme M. BROCHIER - Ph. BURDIN - L. CASTELLANI

J.P. FAUCHIER - B. GRENIER – M. JAN –P. JOBARD - J.-P. LAMAGNERE - F. LAMISSE – J. LANSAC

J. LAUGIER - G. LELORD - G. LEROY - Y. LHUINTE - M. MAILLET - Mlle C. MERCIER - E/H. METMAN

J. MOLINE - Cl. MORAINÉ - H. MOURAY - J.P. MUH - J. MURAT - Mme T. PLANIOL - Ph. RAYNAUD

Ch. ROSSAZZA - Ph. ROULEAU - A. SAINDELLE - J.J. SANTINI - D. SAUVAGE - M.J. THARANNE

J. THOUVENOT - B. TOUMIEUX - J. WEILL.

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

MM.	ALISON Daniel	Radiologie et Imagerie médicale
	ANDRES Christian	Biochimie et Biologie moléculaire
	ARBEILLE Philippe	Biophysique et Médecine nucléaire
	AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
Mme	AUTRET-LECA Elisabeth	Pharmacologie fondamentale ; Pharmacologie clinique
MM.	BABUTY Dominique	Cardiologie
Mme	BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; Radiothérapie
MM.	BARON Christophe	Néphrologie
Mme	BARTHELEMY Catherine	Physiologie
MM.	BAULIEU Jean-Louis	Biophysique et Médecine nucléaire
	BERNARD Louis	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
	BEUTTER Patrice	Oto-Rhino-Laryngologie
	BINET Christian	Hématologie ; Transfusion
	BODY Gilles	Gynécologie et Obstétrique
	BONNARD Christian	Chirurgie infantile
	BONNET Pierre	Physiologie
Mme	BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
MM.	BOUGNOUX Philippe	Cancérologie ; Radiothérapie
	BRUNEREAU Laurent	Radiologie et Imagerie médicale
	BRUYERE Franck	Urologie
	BUCHLER Matthias	Néphrologie
	CALAIS Gilles	Cancérologie ; Radiothérapie
	CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
	CHANDENIER Jacques	Parasitologie et Mycologie
	CHANTEPIE Alain	Pédiatrie
	CHARBONNIER Bernard	Cardiologie
	COLOMBAT Philippe	Hématologie ; Transfusion
	CONSTANS Thierry	Médecine interne ; Gériatrie et Biologie du vieillissement
	CORCIA Philippe	Neurologie
	COSNAY Pierre	Cardiologie
	COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et Imagerie médicale
	COUET Charles	Nutrition
	DANQUECHIN DORVAL Etienne	Gastroentérologie ; Hépatologie
	DE LA LANDE DE CALAN Loïc	Chirurgie digestive
	DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
	DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique ; médecine d'urgence
	DESTRIEUX Christophe	Anatomie
	DIOT Patrice	Pneumologie
	DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & Cytologie pathologiques
	DUMONT Pascal	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	FAUCHIER Laurent	Cardiologie
	FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	FETISSOF Franck	Anatomie et Cytologie pathologiques
	FOUQUET Bernard	Médecine physique et de Réadaptation
	FRANCOIS Patrick	Neurochirurgie
	FUSCIARDI Jacques	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	GAILLARD Philippe	Psychiatrie d'Adultes
	GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et Stomatologie
	GOUDEAU Alain	Bactériologie -Virologie ; Hygiène hospitalière
	GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
	GRUEL Yves	Hématologie ; Transfusion
	GUILMOT Jean-Louis	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
	GUYETANT Serge	Anatomie et Cytologie pathologiques
	HAILLOT Olivier	Urologie
	HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique ; médecine d'urgence (Néphrologie et Immunologie clinique)
	HERAULT Olivier	Hématologie ; transfusion
	HERBRETEAU Denis	Radiologie et Imagerie médicale
Mme	HOMMET Caroline	Médecine interne, Gériatrie et Biologie du vieillissement
MM.	HUTEN Noël	Chirurgie générale
	LABARTHE François	Pédiatrie
	LAFFON Marc	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	LANSON Yves	Urologie

	LARDY Hubert	Chirurgie infantile
	LASFARGUES Gérard	Médecine et Santé au Travail
	LEBRANCHU Yvon	Immunologie
	LECOMTE Pierre	Endocrinologie et Maladies métaboliques
	LECOMTE Thierry	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
	LEMARIE Etienne	Pneumologie
	LESCANNE Emmanuel	Oto-Rhino-Laryngologie
	LINASSIER Claude	Cancérologie ; Radiothérapie
	LORETTE Gérard	Dermato-Vénérologie
	MACHET Laurent	Dermato-Vénérologie
	MAILLOT François	Médecine Interne
	MARCHAND Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	MARRET Henri	Gynécologie et Obstétrique
	MULLEMAN Denis	Rhumatologie
	NIVET Hubert	Néphrologie
	PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
	PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, Pharmacologie clinique
	PATAT Frédéric	Biophysique et Médecine nucléaire
	PERROTIN Dominique	Réanimation médicale ; médecine d'urgence
	PERROTIN Franck	Gynécologie et Obstétrique
	PISELLA Pierre-Jean	Ophthalmologie
	QUENTIN Roland	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	RICHARD-LENOBLE Dominique	Parasitologie et Mycologie
	ROBIER Alain	Oto-Rhino-Laryngologie
	ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
	ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	ROYERE Dominique	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
	RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
	SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
	SALIBA Elie	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
Mme	SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et Médecine Nucléaire
	SIRINELLI Dominique	Radiologie et Imagerie médicale
	THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
	TOUTAIN Annick	Génétique
	VAILLANT Loïc	Dermato-Vénérologie
	VELUT Stéphane	Anatomie
	WATIER Hervé	Immunologie.

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie Médecine Générale

PROFESSEURS ASSOCIES

MM. HUAS Dominique Médecine Générale
LEBEAU Jean-Pierre Médecine Générale
MALLET Donatien Soins palliatifs
POTIER Alain Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme ARBEILLE Brigitte Biologie cellulaire
M. BARON Christophe Immunologie
Mme BAULIEU Françoise Biophysique et Médecine nucléaire
M. BERTRAND Philippe Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de Communication
Mme BLANCHARD-LAUMONIER Emmanuelle Biologie cellulaire
M BOISSINOT Eric Physiologie
MM. BRILHAULT Jean Chirurgie orthopédique et traumatologique
CORTESE Samuele Pédiopsychiatrie
Mmes DUFOUR Diane Biophysique et Médecine nucléaire

	EDER Véronique	Biophysique et Médecine nucléaire
	FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et Cytologie pathologiques
	GAUDY-GRAFFIN Catherine	Bactériologie - Virologie ; Hygiène hospitalière
M.	GIRAudeau Bruno	Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de Communication
Mme	GOUILLEUX Valérie	Immunologie
MM.	GUERIF Fabrice	Biologie et Médecine du développement et de la reproduction
	GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
M.	HOARAU Cyrille	Immunologie
M.	HOURIOUX Christophe	Biologie cellulaire
Mme	LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
Mmes	LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale ; Pharmacologie clinique
	MACHET Marie-Christine	Anatomie et Cytologie pathologiques
MM.	MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
	MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
M.M	PIVER Eric	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et Droit de la santé
M.	VOURC'H Patrick	Biochimie et Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFERENCES

Mlle	BOIRON Michèle	Sciences du Médicament
	ESNARD Annick	Biologie cellulaire
M.	LEMOINE Maël	Philosophie
Mlle	MONJAUZE Cécile	Sciences du langage - Orthophonie
M.	PATIENT Romuald	Biologie cellulaire

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M.	ROBERT Jean	Médecine Générale
----	-------------	-------------------

CHERCHEURS C.N.R.S. - INSERM

MM.	BIGOT Yves	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
	BOUAKAZ Ayache	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
Mmes	BRUNEAU Nicole	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
MM.	COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – U 618
	GAUDRAY Patrick	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
	GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
Mmes	GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – U 618
MM.	LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR CNRS-INSERM 930
	LE PAPE Alain	Directeur de Recherche CNRS – U 618
Mmes	MARTINEAU Joëlle	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	POULIN Ghislaine	Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS-INSERM 930

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

Mme	DELORE Claire	Orthophoniste
M	GOUIN Jean-Marie	Praticien Hospitalier
M.	MONDON Karl	Praticien Hospitalier
Mme	PERRIER Danièle	Orthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

Mme	LALA Emmanuelle	Praticien Hospitalier
M.	MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale

Mme	BIRMELE Béatrice	Praticien Hospitalier
-----	------------------	-----------------------

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure 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.

Admis dans 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.

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.

Remerciements

Je tiens à remercier le professeur Olivier Haillot d'avoir accepté d'être mon président de thèse. Je vous remercie pour votre bienveillance et pour la justesse de vos décisions.

Je remercie le professeur Franck Bruyère d'avoir accepté d'encadrer mon travail. Je te remercie pour tes nombreuses idées de travaux scientifiques et de recherches, pour tes remarques constructives et tes corrections dans les plus brefs délais, dont tous les étudiants rêveraient. Merci pour ta disponibilité, ta prévenance, tes qualités chirurgicales et ta motivation pour la recherche, que tu nous transmets.

Je remercie le professeur Christophe Baron d'avoir accepté de critiquer mon travail. Je te remercie pour le temps que tu m'as accordé et pour la rigueur scientifique que tu as cherché à me transmettre.

Je remercie le docteur Benjamin Faivre d'Arcier d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je te remercie pour ton enseignement chirurgical, tes judicieuses remarques cliniques et ton amitié.

Je remercie l'équipe du service d'immunologie clinique du professeur H Watier, et notamment Valérie Gouilleux pour son intérêt à travailler sur le VEGF, Marie-Noëlle Marson pour son aide précieuse sur les manip de biologie moléculaire et Marc Ohresser pour son aide sur les logiciels de génétique.

Je remercie le laboratoire « Cellules dendritiques, immunomodulation et greffes » et notamment le professeur Yvon Lebranchu pour m'avoir donné l'autorisation de travailler sur les échantillons de patients transplantés et Catherine Forconi pour ses explications et ses nombreuses recherches en biologie moléculaire.

Je remercie Jean-Frédéric Marlière pour sa disponibilité et son efficacité pour la recherche des patients adéquats.

Je remercie le docteur Bruno Giraudeau et Mathieu Lemaire pour leur aide en statistiques.

Je remercie mes parents pour leur présence bienveillante. Votre confiance et votre soutien sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis.

Je remercie ma femme Elodie et mes enfants Louis et Augustine pour leur adaptation à mon internat dur et exigeant, pour toutes les concessions qu'ils ont faites, pour leurs encouragements sans faille, pour tout l'Amour dont vous m'entourez au quotidien.

Sommaire

Résumé	2
Résumé en anglais.....	4
Serment d’Hippocrate	10
Remerciements	11
Sommaire	13
Abréviations	15
I. INTRODUCTION.....	16
a. Préambule : contexte général	16
b. Problématique des cancers chez les transplantés rénaux	16
c. Le VEGF : un facteur d’angiogenèse	18
d. Les polymorphismes du VEGF	22
e. Objectif de l’étude	23
II. PATIENTS ET METHODE	24
a. Population et appariement	24
b. Transplantation rénale et suivi.....	24
c. Classification des tumeurs	25
d. Evaluation du terrain.....	25
e. Biologie moléculaire.....	26
1. Extraction d’ADN	26
2. Principes et présentation.....	26
3. Etape de polymerase chain reaction.....	28
4. Digestion enzymatique des produits amplifiés	29
5. Migration électrophorétique	29
f. Statistiques	31
III. RESULTATS	32
a. Groupes étudiés.....	32
b. Données de biologie moléculaire	34
c. Génotypes	36
d. Haplotypes	36

IV. DISCUSSION	37
a. Forces de notre travail	38
b. Faiblesses de notre étude	39
c. Comparaison par rapport à la littérature	39
d. Perspectives	41
V. CONCLUSION	42
Références	43

Abréviations

ADN : Acide DéoxyriboNucléique
ARN : Acide RiboNucléique
ATG : Antithymocytaire Globulin
CPP : Comité de Protection des Personnes
DGF : Delayed Graft Function
DS : Déviation Standard
ECOG-PS : Eastern Cooperative Oncology Group-Performance Status
FH : Fumarate Hydratase
HIF : Hypoxia Induced Factor
HPH : HIF prolylhydroxylase
KO : Knock-Out
Pb : paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
SGF : Slow Graft Function
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SAL : Sérum anti-lymphocytaire
TNM : Tumor Node Metastasis
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VHL: Von Hippel-Lindau
WHO : World Health Organisation

I. INTRODUCTION

a. Préambule : contexte général

La transplantation est une thérapeutique efficace d'amélioration de la qualité de vie chez des malades atteints d'insuffisance rénale terminale. En 2010, 4708 transplantations d'organes ont été réalisées en France dont 2892 greffes rénales.

Des progrès substantiels ont été accomplis au cours des vingt dernières années dans la prévention du rejet aigu de greffe rénale survenant actuellement chez environ 10 à 15% des patients. Ces progrès ont été principalement obtenus grâce à de meilleures stratégies thérapeutiques (nouveaux immunosuppresseurs, amélioration de la prise en charge des donneurs et des receveurs, machines de perfusion). Cependant l'immunosuppression au long cours pose le problème d'effets secondaires tels que l'augmentation du risque de survenue de cancers.

b. Problématique des cancers chez les transplantés rénaux

Le cancer du rein est le 3^{ème} cancer urologique le plus fréquent, après la prostate et la vessie. La majorité des cancers du rein sont sporadiques. Dans certaines populations, le risque de survenue de cancer rénal est augmenté à cause de prédispositions génétiques, telles que la maladie de Von Hippel-Lindau (VHL), les carcinomes héréditaires tubulo-papillaires ou la sclérose tubéreuse de Bourneville¹. Le développement de cancers chez les transplantés a été étudié dans de nombreuses études épidémiologiques. L'incidence des cancers sur les reins natifs est estimée entre 10 à 100 fois supérieure chez les transplantés par rapport à la population générale^{2,3}.

La polykystose rénale acquise, qui est fréquemment associée à l'insuffisance rénale terminale, a été rapportée comme un facteur prédisposant au risque de cancer rénal⁴. Cependant les données de la littérature sont limitées à des petites séries de patients, non comparatives chez les patients dialysés et transplantés rénaux^{5,6}. De la même façon, le temps passé en hémodialyse avant la transplantation est un facteur de risque reconnu de survenue de cancer sur les reins natifs mais reste débattu en ce qui concerne les tumeurs sur le greffon^{7,8}. Stewart a ainsi montré un risque multiplié par 3,6 chez les dialysés comparativement à la population générale⁹.

La nécessité d'une immunosuppression au long cours chez les transplantés provoque un certain nombre d'effets indésirables comme des maladies cardio-vasculaires, des infections opportunistes et des cancers solides ou hématologiques. Cependant il a été observé que tous les immunosuppresseurs n'avaient pas la même action sur le développement des tumeurs. Certains ont un effet délétère alors que d'autres auraient un effet protecteur. Hojo et al.¹⁰ ont montré une tendance à l'augmentation de tumeurs chez les patients recevant un traitement d'induction par gobuline anti-thymocytaire (ATG) par rapport aux autres. La cyclosporine a été associée à un risque de progression du cancer dans des études *in vitro*¹¹. De la même façon, une incidence plus importante des cancers après transplantation a été observée chez des patients recevant une posologie standard de cyclosporine, comparé à ceux traités par un dosage moins important¹². A l'opposé, les inhibiteurs de mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibent la croissance tumorale avec un risque réduit significatif du développement de cancers après transplantation^{13,14}. Très récemment, Euvrard a montré que le sirolimus avait un effet anti-tumoral sur le développement secondaire de tumeurs cutanées chez les transplantés rénaux¹⁵.

c. Le VEGF : un facteur d'angiogenèse

Le Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) a été identifié en 1989 comme étant le facteur angiogénique majeur et spécifique des cellules endothéliales (Figure 1). La famille des VEGF comprend six membres, que sont le VEGF-A, le PlGF, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D et le VEGF-F. Ce sont des glycoprotéines homodimériques qui jouent un rôle critique dans la vasculogenèse, la lymphangiogenèse et l'angiogenèse au cours du développement embryonnaire¹⁶.

Les membres de cette famille se retrouvent autour d'une structure commune, caractérisée par huit résidus cystéines espacés par un domaine VEGF homologue. Ils se distinguent par leurs propriétés biologiques et physiologiques, ainsi que leurs affinités aux récepteurs VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3. Le VEGF-A (VEGF) est un facteur de croissance majeur intervenant dans les processus de la vasculogenèse et de l'angiogenèse. Chez l'homme, le gène VEGF-A est localisé sur le chromosome 6 (6p21.3) et il est constitué de 8 exons. L'expression de ce gène conduit à la synthèse de neuf isoformes dont la taille varie entre 121 et 206 acides aminés (AA). Cependant, la plupart des cellules expriment préférentiellement les isoformes de 121, 165 et 189 AA ; le VEGF-165 en est l'isoforme majoritaire. Le VEGF-B joue un rôle dans la vascularisation de la musculature striée et dans le développement de la moelle cependant il ne semble pas indispensable à l'angiogenèse chez l'adulte¹⁷. Le VEGF-C intervient essentiellement dans la lymphangiogenèse¹⁸. Le VEGF-D, le VEGF-E et le PlGF ont été découverts plus récemment et sont moins connus.

Les récepteurs au VEGF ont initialement été découverts à la surface des cellules endothéliales vasculaires. Le VEGF se lie à deux récepteurs tyrosine kinase, VEGFR1 et VEGFR2.

Ces récepteurs possèdent sept domaines immunoglobulines like extracellulaires, une région transmembranaire et une séquence tyrosine kinase¹⁶.

Le VEGFR3 est un membre de la famille de ces récepteurs, il ne lie pas le VEGF, mais fixe le VEGF-C et D. À côté de ces récepteurs, le VEGF interagit avec une autre famille de récepteurs, les neuropilines. Le VEGFR1 est exprimé à la surface des cellules endothéliales et son expression est activée au cours de l'angiogenèse, ainsi qu'en réponse à l'hypoxie sous le contrôle du facteur de transcription HIF-1¹⁹.

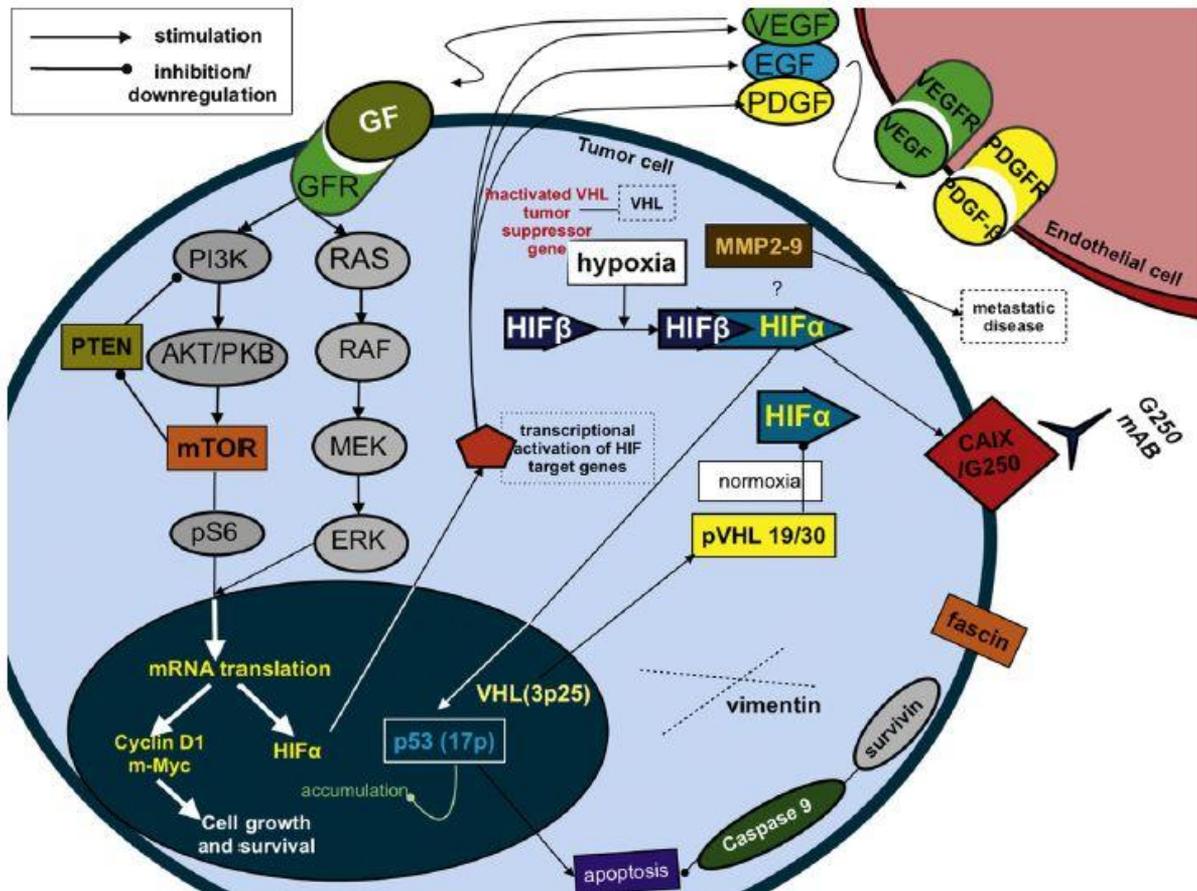
Le VEGFR2 est considéré comme le médiateur principal des effets mitogènes et angiogéniques du VEGF. Son importance est illustrée par le Knock-out (KO) de son gène chez la souris, qui conduit à une létalité embryonnaire précoce, associée à un défaut de vasculogenèse, et une incapacité tant à développer des îlots sanguins qu'à organiser un réseau vasculaire²⁰.

Chez l'individu adulte, le VEGF est impliqué dans de nombreux processus tels que la cicatrisation, la grossesse, la croissance squelettique et dans l'angiogenèse ovarienne. L'angiogenèse est impliquée dans la croissance folliculaire et le développement du corps jaune sous le contrôle de facteurs hormonaux.

Dans les tumeurs rénales à cellules claires, l'augmentation du VEGF est expliquée par la dysrégulation de l'Hypoxia-Induced Factor-1 α (HIF-1 α) suite à la perte de la protéine Von Hippel-Lindau (VHL) dans un contexte d'environnement hypoxique (Figure 1). Les grosses tumeurs ont une suppléance sanguine inadéquate et exacerbent l'hypoxie provoquant l'augmentation de l'expression du VEGF. Des concentrations élevées de VEGF sont corrélées avec une inactivation du gène VHL²¹. Une augmentation de la production de VEGF a été observée chez des patients porteurs de tumeurs rénales avec des altérations du gène VHL et pour des grades tumoraux avancés²². La liaison du VEGF sur son récepteur provoque l'activation de multiples voies en aval et au final résulte en la survie des cellules endothéliales, la mitogenèse, la migration, la différenciation, la perméabilité vasculaire et la mobilisation des progéniteurs endothéliaux dans la moelle osseuse²³.

Figure 1. Marqueurs et voies de signalisation dans le cancer rénal d'après Sun M ²⁴

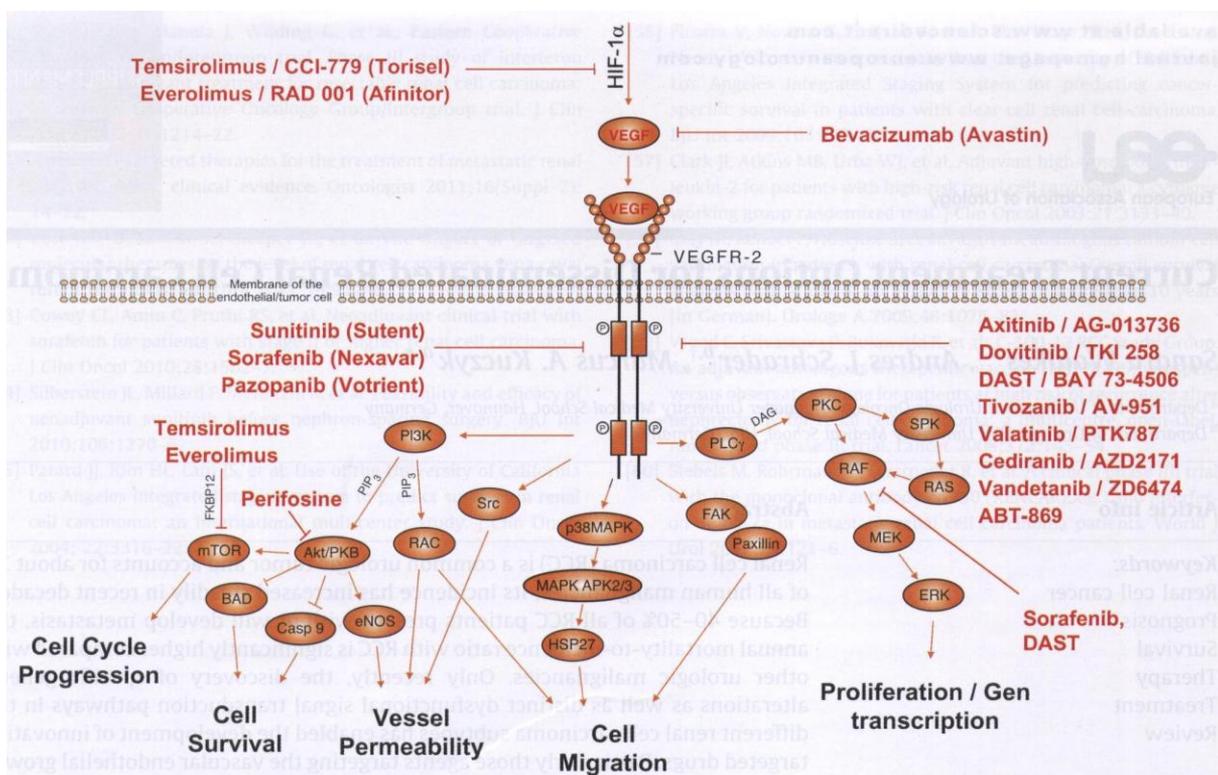
AKT/PKB = akt/protein kinase B (gene); CAIX = carbonic anhydrase IX; EGF = endothelial growth factor; ERK = extracellular signal-regulated kinase; GF = growth factor; GFR = growth factor receptor; HIF = hypoxia-induced factor; MEK = methyl ethyl ketone; MMP =matrix metalloproteinase; mTOR =mammalian target of rapamycin; PDGF = platelet-derived growth factor; PDGFR = platelet-derived growth factor receptor; PTEN = phosphatase and tensin homolog; VEGF = vascular endothelial growth factor; VEGFR = vascular endothelial growth factor receptor; VHL = Von Hippel-Lindau.



L'angiogenèse nécessite un équilibre rigoureux entre signaux pro- et anti-angiogéniques. Une dérégulation de cette balance peut entraîner un excès ou, au contraire, un défaut de vascularisation et ainsi favoriser le développement de nombreuses pathologies. Dans les cas d'excès d'angiogenèse, le VEGF est impliqué dans de nombreuses maladies inflammatoires, dans les rétinopathies, et dans le cancer du fait de sa capacité à stimuler la néovascularisation des tumeurs. Comme le VEGF-A cible spécifiquement les cellules endothéliales, l'inhibition de ce facteur constitue un traitement anticancéreux en pleine expansion. Plusieurs stratégies

anti-angiogéniques ont été développées parmi lesquelles, l'utilisation d'anticorps dirigés contre le VEGF. Le bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé et recombinant qui cible spécifiquement le VEGF. Il se lie avec une haute affinité à toutes les isoformes du VEGF et neutralise l'action de celui-ci en bloquant de façon stérique sa liaison à ses récepteurs FLT1 (VEGFR1) et KDR (VEGFR2)²⁵. De nombreuses autres molécules ont été développées et ciblent soit en amont des facteurs tels que HIF-1 α (temsirolimus, everolimus), soit en aval les récepteurs du VEGF (sunitinib, sorafenib, pazopanib) (Figure 2).

Figure 2. Le chemin de transduction du signal du VEGF et ses inhibiteurs d'après Waalkes S.²⁶



d. Les polymorphismes du VEGF

Une mutation correspond à une modification soudaine et transmissible de la séquence d'ADN. Par exemple, le changement d'une base par une autre ou encore l'ajout ou la suppression d'une base. Des mutations seraient responsables de l'apparition de certaines maladies. En génétique, on étudie des marqueurs qui sont des polymorphismes dont la fonction n'est pas nécessairement connue, mais dont on connaît la position exacte sur le génome. Un type de marqueurs couramment utilisé est le polymorphisme de nucléotide simple (SNP) qui résulte de la modification d'un seul nucléotide.

Le gène du VEGF est situé sur le chromosome 6p21.3 et contient 8 exons, séparés par 7 introns. Une trentaine de SNP ont été décrits pour ce gène ; plusieurs d'entre eux peuvent affecter l'expression de celui-ci. Parmi ces SNP, il y a 5 SNP (-2549 I/D, -1154 G/A, -460 T/C dans la région promotrice du VEGF, +405 G/C dans la région non transcrite 5' et +936 C/T dans la région non transcrite 3') qui sont liés à la synthèse de la protéine du VEGF²⁷⁻³⁰ et qui sont particulièrement impliqués dans l'angiogenèse tumorale. En outre, ces SNP ont été décrits comme des facteurs de risque ou des facteurs pronostiques de plusieurs types de cancers, incluant le cancer du sein, du poumon, de la prostate, de l'œsophage, du mélanome, ainsi que d'autres pathologies, sur une base présumée d'angiogenèse³¹⁻³⁴.

Ainsi en 2010 Bruyère et al.³⁵ ont comparé 51 patients porteurs d'une tumeur rénale à 202 patients témoins et a montré que ces polymorphismes du VEGF constituaient un facteur de risque de cancer du rein.

L'équilibre de Hardy–Weinberg est un principe fondamental en génétique des populations qui soutient que les fréquences génotypiques à un locus donné demeurent constantes de génération en génération si les cinq conditions suivantes sont respectées :

- la population est de grande taille
- il n'y a pas de sélection naturelle
- il n'y a pas de mutation
- il n'y a pas de migration, c'est-à-dire qu'aucune copie allélique n'est apportée de l'extérieur
- les unions sont aléatoires, le choix d'un partenaire ne dépend pas de son génotype.

Avant toute chose, il est nécessaire de vérifier du postulat d'équilibre de Hardy-Weinberg lors d'une étude de polymorphisme.

Le déséquilibre de liaison (DL) réfère à l'association non aléatoire entre les allèles de deux ou plusieurs loci. Plus deux loci sont situés proches l'un de l'autre, moins leurs allèles ont de chances d'être transmis de façon indépendante. On dit alors qu'ils sont en DL. Des loci très près l'un de l'autre seront en plus fort DL que des loci plus éloignés. Ce concept est très utile pour la recherche en génétique. En effet, une association entre un marqueur et une maladie suggère la présence d'un DL entre les deux. On présume alors que le marqueur est à proximité du locus de la maladie, ce qui peut faciliter l'identification du gène. Par conséquent, en plus de l'analyse des allèles et des génotypes, il est particulièrement intéressant d'étudier les haplotypes dans ce genre d'étude des polymorphismes.

e. Objectif de l'étude

Notre travail a consisté à déterminer si le polymorphisme du VEGF pouvait être un facteur pronostique de survenue de cancer des reins natifs dans la population des transplantés rénaux.

II. PATIENTS ET METHODE

a. Population et appariement

Entre 1985 et 2011, 1619 transplantations rénales ont été effectuées au CHU de Tours. Nous avons recensé grâce aux données du dossier médical informatisé les cas de tumeurs rénales sur reins natifs en recoupant les mots-clés « porteur d'un greffon rénal » et « tumeur rénale », en excluant les tumeurs du greffon. Chaque cas a été apparié à 4 témoins afin d'obtenir la meilleure légitimité pour les résultats statistiques, sur les critères suivants :

- Sexe
- Age +/- 5ans
- Année de transplantation +/- 3 ans
- Traitement immunosuppresseur
- Durée de suivi : identique ou supérieure pour les témoins

Les témoins étaient exclus en cas d'antécédents de tumeurs solides ou d'hémopathies malignes.

Tous les patients ont donné leur consentement par écrit pour une étude génétique sur sérum après une information spécifique. Après consultation du Comité de Protection des Personnes (CPP) se prêtant à la recherche clinique, il s'est avéré que cette étude ne nécessitait pas leur autorisation. Les informations recueillies ont été anonymisées.

b. Transplantation rénale et suivi

La technique chirurgicale de transplantation rénale est bien standardisée. Il s'agit d'une transplantation en fosse iliaque (préférentiellement à droite, mais parfois à gauche en cas de

seconde transplantation ou de pathologie des vaisseaux iliaques) avec des anastomoses artérielles et veineuses termino-latérales sur les vaisseaux iliaques externes. L'anastomose urinaire est faite selon la technique de Lich-Gregoir³⁶, protégée par une sonde double J. Un drainage externe au contact des anastomoses vasculaires et urinaires est assuré par 2 drains de Redons. Ceux-ci sont retirés lorsqu'ils ne sont plus productifs. Une sonde vésicale est laissée en place pendant 5 jours. Une consultation post-opératoire de contrôle est effectuée à J21, au cours de laquelle la sonde double J est retirée.

c. Classification des tumeurs

Le stade tumoral a été déterminé selon la classification Tumor Node Metastasis (TNM) de 2009³⁷. Les sous-types histologiques ont été déterminés selon la classification de 2004 de la World Health Organisation (WHO)³⁸. Enfin les tumeurs ont été gradées selon le grade de Fuhrman, par les anatomopathologistes de notre centre, permettant de classer la tumeur en 4 grades, ayant des valeurs pronostiques différentes³⁹.

d. Evaluation du terrain

La décision thérapeutique en cancérologie repose sur une évaluation rigoureuse du patient et de ses différentes comorbidités. Plusieurs scores ont été décrits à cet effet. Nous avons utilisé pour ce travail le score publié par l'Eastern Cooperative Oncology Group en 1982⁴⁰. Il est encore également appelé *performance status OMS* et décrit la restriction des activités physiques du patient, pouvant conduire à son alitement.

e. Biologie moléculaire

1. Extraction ADN

Cette première partie s'est effectuée au sein du laboratoire de recherche EA 4245 « Cellules dendritiques, immunomodulation et greffes » du Pr Lebranchu, dans lequel les échantillons sont conservés, avec l'aide d'une doctorante, Catherine Forconi. Tous les patients transplantés ont été prélevés après leur consentement écrit, avant la transplantation et les tubes de sérum ont été conservés au congélateur à -20°C. L'extraction d'ADN a été effectuée et les échantillons ont tous été étalonnés à 20 ng/μL grâce au calcul de la concentration et de la pureté de chaque échantillon au Nanodrop (Nanodrop 2000c, ThermoScientific).

2. Principes et présentation

La méthode de détermination du polymorphisme -2549 était une PCR suivie directement d'une électrophorèse permettant de définir la présence ou l'absence de l'insertion. L'amplicon était constitué de 230 (allèle I) ou 212 (allèle D) paires de bases (pb).

Concernant le polymorphisme +936, les amorces publiées préalablement ²⁷ ont été réduites. Une PCR a ensuite été effectuée, suivie d'une digestion enzymatique et d'une électrophorèse permettant en présence de témoins, de définir la présence ou l'absence du site de restriction, affecté par la substitution nucléotidique.

Le polymorphisme -1154 a été testé en utilisant dans une PCR en duplex les amorces allèle spécifique publiées ⁴¹ à l'exception d'une qui a été artificiellement rallongée. L'amplicon était ainsi constitué de 130pb pour l'allèle A et de 152pb pour l'allèle G.

Pour les polymorphismes -460 et +405, une PCR a été faite, suivie d'une digestion enzymatique et d'une électrophorèse permettant en présence de témoins, de définir la présence ou l'absence du site de restriction affecté par la substitution nucléotidique.

L'ensemble des données concernant la séquence du polymorphisme, la fréquence des allèles, les amorces utilisées, la température d'hybridation, les enzymes de restriction utilisées et la taille des fragments d'ADN est résumée dans le tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques des paires d'amorces, des conditions de réaction utilisées pour la technique de RFLP ainsi que les fréquences alléliques pour chacun des 5 polymorphismes

Position	Séq poly	Fréq allèle dans la populat°		Amorces	Taille amplicon (pb)	T°C hybridat°	Enzyme de restrict°	Allèles	Taille fragments ADN (pb)
-2549 rs35569394	D→I	0,55	0,45	S5'-GCTGAGAGTGGGGCT GACTAGGTA-3'	212/ 230	65°C	/	D	212
				AS5'-GTTTCTGACCTGGCT ATTTCCAGG-3'				I	230
-1154 rs1570360	G→A	0,67	0,37	S5' <u>ACTGAGCGTCCGCAGAGCTCGTGCCCG</u>	152/ 130	64°C	/	G	152
				<u>AGCCGCGTATGGTG</u> -3'				A	130
				AS5'-CCCCGCTACCAGCCGACCT-3'					
-460 rs833061	C→T	0,53	0,47	S5'-TGTGCGTGTGGGGTTGAGCG-3'	175	64°C	BstUI	C	153
				AS5'-TACGTGCGGACAGGGCCTGA-3'				T	21
+405 rs2010963	G→C	0,71	0,29	S5'-ATTTATTTTGTCTTGCCATT-3'	304	58°C	BsmFI	G	204
				AS5'-GTCTGTCTGTCTGTCCTCA-3'				C	98
+936 rs3025039	C→T	0,84	0,16	S5'-GAGGAGACTCTGCGCAGAGC-3'	192	62°C	NlaIII	C	192
				AS5'-TATGTGGGTGGGTGTGTCTACAGG-3'				T	112 ; 76

3. Etape de Polymerase Chain Reaction (PCR)

Cette deuxième étape a été effectuée au sein du laboratoire d'immunologie clinique du Pr Hervé Watier du CHU de Tours, avec l'aide de Marie-Noëlle Marson et Marc Ohresser, qui ont validé cette technique en 2006.

Nous avons préparé dans un microtube de 0,5mL, maintenu dans la glace, la quantité suffisante de mélange réactionnel pour n échantillons à analyser ainsi que le contrôle négatif, sur le mode suivant (Tableau 2). Nous avons rajouté 1 µL d'ADN pour chaque échantillon. Les tubes ont ensuite été placés dans le thermocycleur « Mycycler » BIO-RAD, selon une procédure de démarrage à chaud. Le démarrage à chaud évite une hybridation précoce et spécifique susceptible de générer un bruit de fond au signal spécifique d'amplification.

Tableau 2. Caractéristiques du mélange réactionnel de PCR

REACTIFS <i>INVITROGEN</i>	Concentrations ou quantités finales	Volume (µL) par échantillon
H ₂ O ultra pure		12,04
Tampon (10X)	1X	2
MgCl ₂ (50mM)	2mM	0,8
dNTP (5mM chaque)	0,25mM	1
Amorce VEGF-S (5µM)	0,5µM	2
Amorce VEGF-AS (5µM)	0,5µM	2
Taq polymérase (5U/µL)	0,5U	0,16
VOLUME TOTAL (µL)		20

La réaction d'amplification comporte le schéma suivant qui est pré-enregistré dans le thermocycleur (Tableau 3).

Tableau 3. Températures de PCR

Temps	5 min	1 min	1 min	20 sec	5 min	∞
T°C	94°C	94°C	T°C hybridation	72°C	72°C	4°C
		× 35 CYCLES				

4. Digestion enzymatique des produits amplifiés

L'ADN amplifié a été ensuite ajouté à de l'eau ultrapure, du NE Buffer 4 10X, du BSA 10X et à l'enzyme de restriction, différente selon le polymorphisme. Le témoin a été ajouté au même mélange sauf l'enzyme de restriction. L'ensemble a été mis à incuber à l'étuve (Jouan) à 37°C pendant 12 heures.

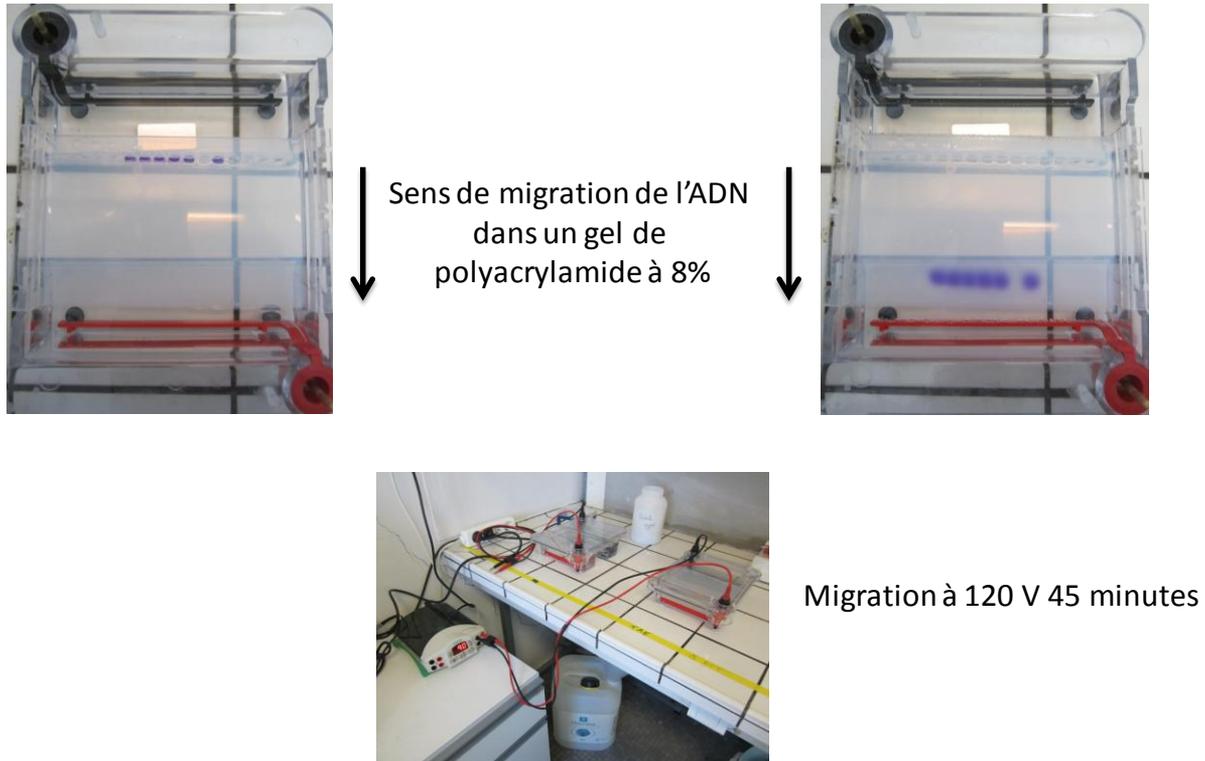
5. Migration électrophorétique

Celle-ci a commencé par la fabrication d'un gel de polyacrylamide à 8%.

Le dépôt du mélange de 10 μ L d'échantillons + 3 μ L de Bleu de Bromophénol 6X et le dépôt d'un marqueur de taille (0,5 μ L de pBR322/HaeIII à 250 μ g/mL + de l'eau pour qu'au moins la moitié du volume maximum du puits soit atteint) ont été effectués dans les puits du gel.

La cuve a été branchée sur le générateur et programmée pour que la migration dure 45 min à 120V (Figure 3).

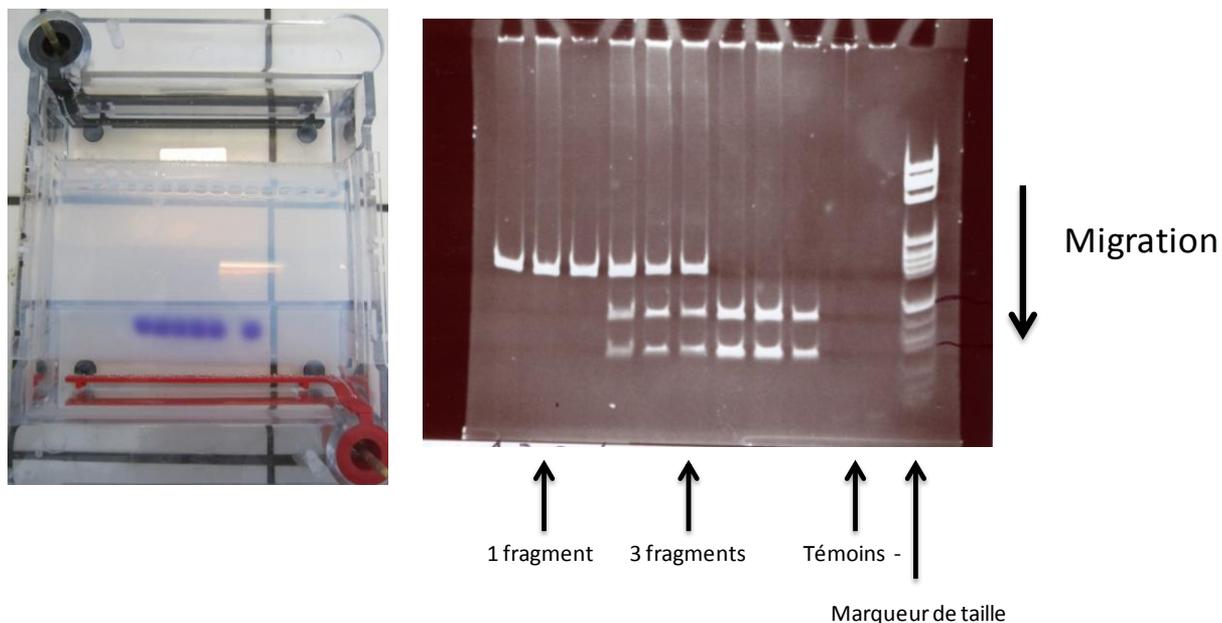
Figure 3. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)



Le gel a été ensuite placé sur un plateau de coloration, recouvert d'environ 100 ml de solution de bromure d'éthidium ($1\mu\text{g}/\text{mL}$) et agité sur l'agitateur à plateau pendant 10 min environ.

L'ADN du gel a été visualisé sur une plaque à UV et des photos ont été prises pour l'analyse (Figure 4).

Figure 4. Comparaison entre la cuve d'électrophorèse après migration et la révélation photographique sous UV



f. Statistiques

Les caractéristiques de chaque groupe ont été comparées grâce aux tests du Chi 2 ou de Student, et le test exact de Fisher et de Wilcoxon pour les données non paramétriques.

Les fréquences attendues des génotypes selon l'équilibre de Hardy-Weinberg ont été établies grâce au logiciel GENEPOP (Genepop 4.1.3)⁴². L'estimation des haplotypes a été effectuée grâce au logiciel PHASE (version 2.1)²⁸.

Pour comparer la distribution des polymorphismes du VEGF dans les groupes cancer et témoin, nous avons estimé les paramètres d'un modèle de régression logistique conditionnelle avec comme variable à expliquer le cancer, comme variable explicative le génotype du VEGF et comme strate le cluster (appariement des témoins à chaque cas). Le logiciel RStudio 0.95.265 a été utilisé (logiciel libre distribué selon les termes de la licence GNU GPL).

III. RESULTATS

a. Groupes étudiés

1619 transplantations rénales ont été effectuées au CHU de Tours entre 1985 et 2011. Nous avons recensé dans cette population 16 cas de tumeur rénale sur les reins natifs (groupe cancer). Ces patients ont été appariés à 2 à 4 témoins en fonction des possibilités d'appariement (groupe témoin). En effet, le faible nombre de transplantations effectuées à la fin des années 80 ne nous a pas permis d'apparier chaque cas avec 4 témoins.

Les caractéristiques de chaque groupe sont données dans le tableau 4.

Tableau 4. Caractéristiques des patients

	Groupe cancer N = 16	Groupe témoin N = 55	p
Hommes/femmes (%)	87,5/12,5	87,3/12,7	0,98
Age moyen à la greffe (année ± Déviation standard (DS))	50,3 ± 14	48,3 ± 12,6	0,58
Durée moy dialyse avant transplantation (mois ± DS)	21,9 ± 18,2	25,5 ± 28,7	0,63
Age moyen donneur (année ± DS)	51,5 ± 12,6	47,7 ± 12,6	0,29
Durée moy de suivi depuis transplantation (année ± DS)	15,35 ± 5,8	15,5 ± 5,5	0,92
Traitement par immunosuppresseurs (Nombre/%)			
- Ciclosporine	10 (62,5)	47 (85,4)	0,004
- Sérum Anti-Lymphocytaire	11 (68,7)	44 (80)	0,34
- Inhibiteurs mTOR	1 (6,2)	2 (3,6)	0,64
Maladie initiale (Nombre/%)			
- Néphropathie sauf polykystose	9 (56,3)	10 (18,2)	0,002
- Uropathie (reflux vésico-urétéral, valves urètre postérieur...)	0 (0)	8 (14,5)	0,105
- Polykystose rénale	5 (31,2)	17 (30,9)	0,979
- Autres (diabète, vascularite...)	2 (12,5)	20 (36,4)	0,069

La majorité des transplantations a été effectuée à partir de donneurs en état de mort encéphalique (98,6%) tandis qu'un seul patient a été transplanté à partir d'un donneur vivant apparenté.

Le traitement immunosuppresseur d'entretien comprenait un corticoïde associé à de la ciclosporine et de l'azathioprine. Vers 1995-1996, l'azathioprine a été remplacée par du mycophénolate mofétil.

Concernant le reprise de la fonction rénale, 14 patients (19,7%) ont nécessité une dialyse avant le 7^{ème} jour après la transplantation (DGF : delayed graft function) et le SGF ((slow graft function (créatininémie > 250 µmol/L à J7)) était de 39,4%.

La durée moyenne entre la transplantation et le diagnostic de cancer était de 10,3 ans ± 4,8 ans. Les caractéristiques des tumeurs sont exposées dans le tableau 5.

Tableau 5. Caractéristiques des tumeurs du groupe cancer

Taille tumeur en cm (± DS)	4,13 ± 3,35
Stade tumoral (%)	
T1	13 (81,25)
T2	2 (12,5)
T3	1 (6,25)
Grade de Fürhrman	
1	0
2	5
3	3
Type histologique	
Carcinome à cellules claires	7 (43,75)
Tubulo-papillaire	9 (56,25)
Nombre de patients avec des métastases initiales	1 (6,25)
ECOG-PS	
0	14 (87,5)
≥ 1	2 (12,5)

Tous les patients ont été opérés hormis le patient métastatique d'emblé, qui présentait une maladie très avancée et qui est décédé 3 mois après le diagnostic. La survie sans récidence était de 5,2 ans en moyenne ± 2,9.

b. Données de biologie moléculaire

Le tableau 6 expose pour chaque échantillon la concentration et la pureté de l'acide nucléique, ainsi que les génotypes concernant les 5 polymorphismes.

Tableau 6. Résultats des PCR et RFLP

Identifiant échantillon	Acide nucléique Conc.(ng/μl)	Pureté ADN 260/280	VEGF+405	VEGF-460	VEGF+936	VEGF-1154	VEGF-2549
86001	78,6	1,81	C/G	T/C	C/C	A/G	I/D
87002	38,1	1,94	C/G	T/C	T/C	A/G	I/D
87014	184,5	1,41	C/G	T/C	C/C	A/G	I/D
87028	373	1,85	C/C	T/T	C/C	G/G	D/D
87030	108,4	1,86	G/G	C/C	T/C	A/G	I/I
88003	72,6	1,9	C/C	T/T	C/C	G/G	D/D
88006	31,1	1,93	G/G	T/C	C/C	A/G	I/D
88014	58	1,87	C/G	T/C	T/C	A/G	I/D
88018	76,5	1,9	G/G	T/C	C/C	G/G	I/D
88025	62,8	1,9	C/G	T/C	C/C	A/G	I/D
89001	35,9	1,89	C/C	T/T	C/C	G/G	D/D
89003	39,6	1,93	G/G	C/C	T/C	A/G	I/I
89007	86,7	1,93	G/G	T/C	C/C	A/G	I/D
89009	97,2	1,87	G/G	C/C	C/C	G/G	I/D
89018	61	1,89	C/G	T/C	C/C	A/G	I/D
89035	41,2	1,94	G/G	C/C	T/C	A/G	I/I
90002	68,5	1,9	G/G	C/C	T/C	A/A	I/I
90025	81,2	1,86	G/G	T/T	C/C	G/G	D/D
90038	62,4	1,89	G/G	T/C	C/C	A/G	I/D
91008	63,5	1,89	G/G	C/C	T/C	G/G	I/I
91016	18,3	1,75	C/C	T/T	C/C	G/G	D/D
91017	73,6	1,9	G/G	C/C	C/C	A/G	I/D
91023	63,1	1,89	C/G	T/T	C/C	G/G	D/D
91030	37,3	1,93	C/G	T/C	C/C	G/G	I/D
92015	195,2	1,86	G/G	T/C	C/C	A/G	I/D
92025	21,6	1,85	C/G	T/C	C/C	G/G	I/D
92029	59,5	1,87	G/G	C/C	C/C	A/G	I/I
93007	61,5	1,87	C/C	T/T	T/C	G/G	D/D
93008	57,3	1,91	C/G	T/C	T/C	G/G	I/D
93014	37,3	1,87	C/G	T/C	C/C	A/G	I/D
93015	83,2	1,91	C/G	T/C	C/C	A/G	I/D
93022	46,8	1,91	G/G	C/C	C/C	A/G	I/I

93031	86,1	1,87	C/G	T/C	T/C	G/G	I/D
93037	49,9	1,93	G/G	C/C	C/C	A/A	I/I
94007	58,9	1,92	C/G	T/C	T/C	A/G	I/D
94014	88,8	1,91	G/G	C/C	C/C	A/A	I/I
94022	58,2	1,89	C/G	T/C	C/C	A/G	I/D
94031	378,6	1,85	C/G	T/C	C/C	G/G	I/D
94035	487,1	1,84	G/G	T/C	C/C	A/G	I/D
95001	156,9	1,87	C/G	T/T	T/C	G/G	D/D
95007	129,9	1,85	G/G	C/C	C/C	A/G	I/I
95024	160,4	1,86	G/G	T/T	C/C	G/G	D/D
95033	5,2	1,77	C/G	T/C	T/T	A/G	I/D
95034	377,7	1,85	C/G	T/C	C/C	A/G	I/D
96044	121,3	1,89	C/G	T/C	C/C	A/G	I/D
97009	45,2	1,83	C/G	T/C	T/C	A/G	I/D
97014	118	1,86	G/G	T/T	C/C	G/G	D/D
97015	23,8	1,76	C/G	T/T	T/C	G/G	D/D
97020	22,5	1,97	G/G	T/T	C/C	G/G	D/D
97021	26,9	1,93	C/G	T/T	C/C	G/G	D/D
97034	44	1,91	G/G	T/C	C/C	A/G	I/D
98004	70,7	1,91	C/G	T/C	C/C	A/G	I/D
99003	52,5	1,82	G/G	C/C	C/C	A/G	I/I
35	129,3	1,88	C/G	T/T	C/C	G/G	D/D
1004	44	1,94	G/G	C/C	C/C	A/A	I/I
1049	64,4	1,97	G/G	T/C	C/C	A/G	I/D
1054	59,8	1,95	C/G	T/C	C/C	A/G	I/D
2008	55,5	1,96	C/G	T/C	C/C	G/G	D/D
2029	321	1,83	C/C	T/T	C/C	G/G	D/D
2050	494,3	1,83	G/G	T/C	C/C	G/G	I/D
3007	610,4	1,79	G/G	T/C	C/C	G/G	I/D
3014	303,6	1,86	G/G	T/C	C/C	A/G	I/D
4001	74,3	1,87	G/G	C/C	C/C	A/G	I/I
4046	500,5	1,84	C/G	T/C	T/C	G/G	I/D
4051	417,6	1,85	C/G	T/C	C/C	A/G	I/D
5034	247,7	1,85	G/G	C/C	C/C	A/G	I/I
5059	195,6	1,85	C/G	T/C	C/C	A/G	I/D
5081	83,5	1,91	C/G	T/C	T/C	G/G	I/D
6075	92	1,92	C/G	T/C	C/C	A/G	I/D
6078	82,2	1,92	C/G	T/T	T/C	G/G	D/D
11086	48	1,7	G/G	T/C	C/C	A/G	I/D

c. Génotypes

Le tableau 7 montre pour chaque polymorphisme la comparaison des génotypes entre le groupe cancer et le groupe témoin. On ne retrouve aucune différence significative entre les deux groupes.

Tableau 7. Comparaison des génotypes par un modèle de régression logistique conditionnelle

	Cas (n=16) N (%)	Témoins (n=55) N (%)	OR (IC 95%)	p^a	p^b
VEGF+405					0,597
CG	6 (37,5)	27 (49,1)	1		
CC	1 (6,25)	5 (9,1)	1,07 [0,1 – 12,05]	0,96	
GG	9 (56,25)	23 (41,8)	1,8 [0,57 – 5,7]	0,32	
VEGF-460					1
CT	9 (56,25)	30 (54,5)	1		
CC	4 (25)	12 (21,8)	1,01 [0,27 – 4,45]	0,9	
TT	3 (18,75)	13 (23,6)	0,85 [0,19 – 3,88]	0,84	
VEGF+936					0,19
CC	10 (62,5)	43 (78,2)	1		
TC+TT	6 (37,5)	12 (21,8)	2,27 [0,67 – 7,69]	0,19	
VEGF-1154					0,52
GG	8 (50)	21 (38,2)	1		
AG+AA	8 (50)	34 (61,8)	0,7 [0,23 – 2,08]	0,52	
VEGF-2549					0,92
ID	10 (62,5)	30 (54,5)	1		
DD	3 (18,8)	14 (25,5)	0,73 [0,13 – 3,27]	0,68	
II	3 (18,8)	11 (20)	0,89 [0,18 – 4,49]	0,89	

OR [IC 95%] : Odds Ratio avec Intervalle de Confiance à 95% ; ^a : degré de signification associé au test de Wald; ^b : degré de signification associé au test du rapport des vraisemblances maximales ; **Remarques** : pour le VEGF+936, l'effectif étant de 0 pour le polymorphisme TT dans le groupe Cancer, nous avons dû regrouper les effectifs des polymorphismes TT et TC ; pour le VEGF-1154, l'effectif étant de 0 pour le polymorphisme AA dans le groupe Cancer, nous avons dû regrouper les effectifs des polymorphismes AA et AG.

d. Haplotypes

Les polymorphismes du VEGF étaient génétiquement liés, c'est pourquoi une analyse des haplotypes était nécessaire. Les divergences entre les fréquences des haplotypes ont été déduites et ont été représentées lorsqu'elles étaient supérieures à 1%. Aucune différence significative n'a été observée.

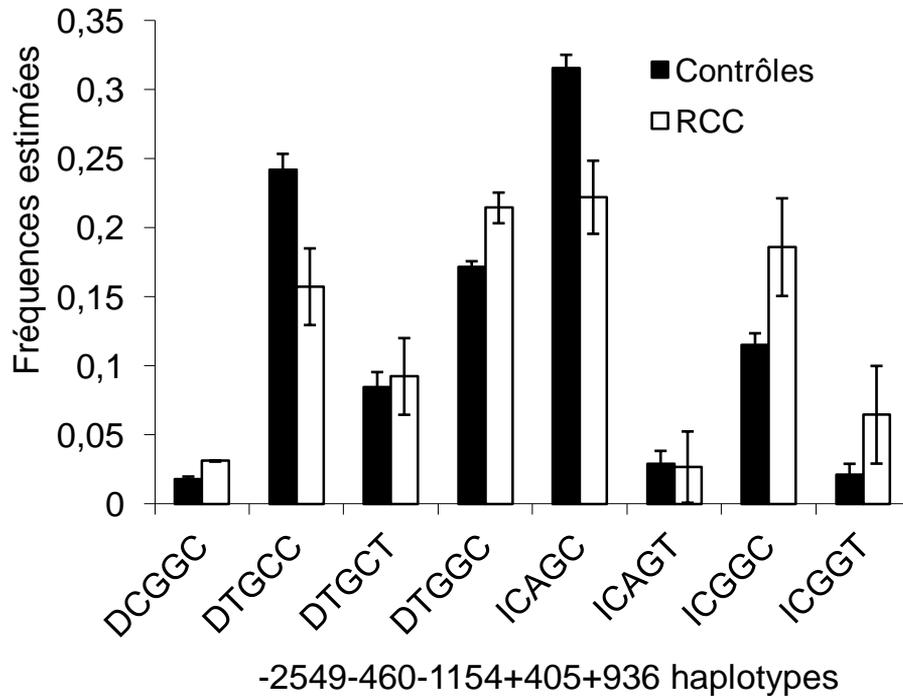


Figure 5. Fréquences estimées des haplotypes des 5 polymorphismes du VEGF étudiés. Les lettres sur l'axe des abscisses désignent les différentes combinaisons des -2549, -460, -1154, +405, +936 haplotypes.

IV. DISCUSSION

Notre étude a cherché à montrer le polymorphisme du VEGF comme un facteur de risque de développer une tumeur du rein natif dans la population des transplantés rénaux, en comparant un groupe de patients ayant développé un cancer du rein après la transplantation et un groupe témoin. Le polymorphisme du VEGF ne semble pas être un facteur de risque de cancer sur le rein natif des malades greffés.

a. Forces de notre travail

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la population des transplantés rénaux est une population intéressante car particulièrement à risque de développer des tumeurs. Il s'agit donc d'une population sensible à la cancérogenèse, pour laquelle des mécanismes physiopathologiques restent à explorer.

Une grande force de ce travail est la méthodologie utilisant une comparaison cas-témoin appariée. Nous avons utilisé jusqu'à 4 témoins par cas afin d'obtenir la plus grande validité statistique. Les critères d'appariement sont particulièrement stricts et nombreux et reposent sur les facteurs de biais et de confusion, susceptibles d'intervenir dans le développement de tumeurs : âge, sexe, traitement immunosuppresseur, durée de suivi. Tous les cas n'ont pas pu être appariés à 4 témoins, car au début de la période de transplantation à la fin des années 80, le nombre de transplantés était réduit. De la même façon, nous n'avons pas pu utiliser comme critère d'appariement la durée de dialyse et la polykystose rénale, ce qui aurait exclu trop de patients. Malgré cela, les deux groupes sont comparables pour ces deux critères.

La méthodologie de la RFLP est bien connue, reproductible et valide. Celle-ci s'est effectuée au sein d'un laboratoire de recherche clinique, et elle est utilisée en pratique courante et est peu coûteuse. D'autres méthodes existent pour l'étude des génotypes des polymorphismes, telles que le séquençage. Cela nécessite d'avoir accès à un séquenceur, ce qui est loin d'être le cas de tous les laboratoires d'immunologie. Une autre technique a été développée par Iannone en 2000 et est basée sur la ligation avec des sondes pièges et rapportrices et la cytométrie en flux⁴³. L'avantage de cette technique est de pouvoir tester plusieurs polymorphismes en même temps mais elle coûte plus cher et est moins sensible que la RFLP. Un certain nombre d'études sur les polymorphismes génétiques étudient uniquement les génotypes. Comme nous l'avons vu précédemment, l'étude de plusieurs polymorphismes

assez proche sur le même gène créent de forts déséquilibres de liaison. C'est pourquoi nous avons également procédé à l'étude des haplotypes estimés entre les deux groupes.

b. Faiblesses de notre étude

Le projet initial de notre travail était d'en faire une étude multicentrique, afin d'éliminer le biais du centre unique et afin de recruter un nombre plus important de cas. La lourdeur des démarches administratives, la difficulté d'appariement des témoins nécessitant une base de donnée régulièrement implémentée, la nécessité d'avoir du sérum avec le consentement des patients, ne nous a pas permis de mener ce projet jusqu'au bout. C'est pourquoi, nous avons dû nous contenter d'une étude unicentrique avec un nombre de cas restreint.

Notre étude s'est portée sur l'étude de patients européens d'origine caucasienne. Les polymorphismes génétiques sont différents selon les origines ethniques des patients. Il est donc possible que certaines différences observées dans les populations asiatiques ne le soient pas pour les populations caucasiennes^{44,45}.

c. Comparaison par rapport à la littérature

Le VEGF a été étudié dans de nombreuses pathologies, comme le cancer du poumon, de l'ovaire, de la prostate ou le diabète, où certains polymorphismes étaient augmentés chez les malades par rapport aux témoins. En 2010, Bruyère a montré que le polymorphisme – 460C/T du VEGF était un facteur de risque de cancer du rein après avoir comparé 51 patients atteints de cancers du rein à 202 témoins. Il faut noter que l'ensemble des cas était des carcinomes à

cellules claires³⁵. En 2007, Kawai a retrouvé que le polymorphisme – 1154G/A était associé à des tumeurs plus petites et à un stade moins important³⁵. Bruyère n'a retrouvé aucune différence concernant ce polymorphisme. En 2011, Donas dans *The Lancet Oncology* a cherché à identifier des marqueurs génétiques prédisant l'efficacité et la toxicité du sunitinib chez des patients, présentant des cancers du rein avancés⁴⁶. L'étude des polymorphismes – 1154 et + 405 du VEGF n'a pas été probante, contrairement à certains polymorphismes du récepteur 3 du VEGF, qui retrouvait une réduction de la survie sans progression. Enfin en 2011, Mittal a montré que certains variants alléliques concernant le polymorphisme – 1154 du VEGF étaient différents entre un groupe de 200 patients transplantés rénaux et 200 patients sains⁴⁴. Par ailleurs, le génotype hétérozygote - 1154A/G était moins fréquent chez les patients ayant fait plusieurs rejets aigus par rapport aux patients n'ayant pas fait de rejets.

L'ensemble de ces données nous montre l'importance du rôle du VEGF dans la pathologie tumorale. Malgré cela les données de la littérature ne sont pas toujours concordantes et il est difficile d'identifier avec certitude des polymorphismes précis, comme facteur de risque ou facteur pronostique de cancer du rein.

La population des transplantés rénaux a tendance à avoir des tumeurs du rein de type papillaire contrairement à la population générale, qui présente plutôt des carcinomes à cellules claires⁴⁷. Dans notre étude, il y a 44% de carcinomes à cellules claires et 56% de tumeurs papillaires. Les mécanismes d'action des tumeurs à cellules claires passent notamment par la dysrégulation de l'Hypoxia-Induced Factor-1 α (HIF-1 α) suite à la perte de la protéine Von Hippel-Lindau (VHL) dans un contexte d'environnement hypoxique. Puis la liaison du VEGF sur son récepteur provoque l'activation de multiples voies en aval et au final résulte en la survie des cellules endothéliales, la mitogenèse, la migration, la différenciation, la perméabilité vasculaire et la mobilisation des progéniteurs endothéliaux dans la moelle osseuse²³.

Les carcinomes papillaires de type 1 utilisent quant à eux la voie des MAP kinases, conduisant à la prolifération et à la progression du cycle cellulaire. A l'inverse, les carcinomes papillaires de type 2 se rapprochent de la voie des carcinomes à cellules claires en provoquant l'inactivation de la fumarate hydratase (FH) à l'origine de l'inhibition de l'HIF prolylhydroxylase (HPH), qui est un régulateur enzymatique des niveaux intra-cellulaire d'HIF, à travers une inhibition compétitive. L'inactivation de HPH interfère avec l'hydroxylation de HIF, provoquant son accumulation, à l'origine de la surexpression de facteurs proangiogéniques, tel que le VEGF⁴⁸.

C'est ainsi qu'a été montré une élévation de l'expression du VEGF chez 29% de patients ayant un carcinome à cellules claires et chez 67% de patients ayant un carcinome papillaire (p = 0,02) ⁴⁹. Dans notre population de patients présentant des carcinomes de type tubulo-papillaires, nous n'avons pas pu identifier les types 1 des types 2.

d. Perspectives

Notre étude n'a pas montré de lien entre le polymorphisme du VEGF et l'incidence du cancer sur les reins natifs : est-ce dû au fait que l'étude manque de puissance par un nombre insuffisant de cas ou est-ce dû au fait qu'il n'existe réellement aucune différence. Le meilleur moyen de répondre à cette question serait de poursuivre ce travail en multicentrique afin d'obtenir davantage de patients.

Les perspectives d'un tel travail sont particulièrement importantes car elles permettraient à l'avenir de dépister les futurs transplantés rénaux et de leur proposer une binéphrectomie prophylactique ou une surveillance radiologique accrue en fonction de leurs polymorphismes du VEGF. D'autres populations à risque, comme les patients atteints de la maladie de Von-

Hippel Lindau ou les patients porteurs de kystes suspects du rein, pourraient aussi en bénéficier.

Par ailleurs étant donné le risque accru de cancers solides et d'hémopathies chez les transplantés, la modulation du traitement immunosuppresseur est une question que nous devons nous poser. En effet, depuis la publication de plusieurs études sur l'impact d'immunosuppresseurs plutôt pro-cancérogènes et d'autres plutôt protecteurs vis-à-vis du cancer, il serait intéressant d'une part de switcher certains immunosuppresseurs vers la classe des inhibiteurs de mTor, d'autres part de bien veiller à diminuer rapidement la posologie des immunosuppresseurs pro-cancérogènes¹⁰⁻¹⁴. Là encore l'identification de polymorphismes du VEGF pourrait nous orienter sur la prescription de certains immunosuppresseurs.

V. CONCLUSION

L'étude de 5 polymorphismes du VEGF chez des transplantés rénaux entre un groupe de patients ayant développé une tumeur du rein natif après la transplantation et un groupe apparié de témoins indemnes de tumeur n'a pas montré de différence entre les deux groupes. Le faible nombre de cas de notre étude peut être une explication à ce résultat malgré une étude cas-témoins appareillés rigoureuse. Une poursuite de ce travail nous permettra peut-être d'infirmer notre hypothèse et ainsi de pouvoir proposer aux patients transplantés un certain nombre de mesures de prévention.

REFERENCES

1. Valeri A and Cussenot O: [Hereditary forms of kidney cancer and genetic screening]. *Prog Urol.* 13: 1201-4, 2003.
2. Webster AC, Craig JC, Simpson JM, Jones MP and Chapman JR: Identifying high risk groups and quantifying absolute risk of cancer after kidney transplantation: a cohort study of 15,183 recipients. *Am J Transplant.* 7: 2140-51, 2007.
3. Ljungberg B HD, Kuczyk MA and members of European Association of Urology Guidelines Office: Guidelines on Renal Cell Carcinoma. *European Association of Urology Guidelines:* 17-21, 2009.
4. Ishikawa I, Saito Y, Asaka M, Tomosugi N, Yuri T, Watanabe M and Honda R: Twenty-year follow-up of acquired renal cystic disease. *Clin Nephrol.* 59: 153-9, 2003.
5. Denton MD, Magee CC, Ovuworie C, Mauiyyedi S, Pascual M, Colvin RB, Cosimi AB and Tolckoff-Rubin N: Prevalence of renal cell carcinoma in patients with ESRD pre-transplantation: a pathologic analysis. *Kidney Int.* 61: 2201-9, 2002.
6. Schwarz A, Vatandaslar S, Merkel S and Haller H: Renal cell carcinoma in transplant recipients with acquired cystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2: 750-6, 2007.
7. Penn I: Primary kidney tumors before and after renal transplantation. *Transplantation.* 59: 480-5, 1995.
8. Mandayam S and Shahinian VB: Are chronic dialysis patients at increased risk for cancer? *J Nephrol.* 21: 166-74, 2008.
9. Stewart JH, Bucciati G, Agodoa L, Gellert R, McCredie MR, Lowenfels AB, Disney AP, Wolfe RA, Boyle P and Maisonneuve P: Cancers of the kidney and urinary tract in patients on dialysis for end-stage renal disease: analysis of data from the United States, Europe, and Australia and New Zealand. *J Am Soc Nephrol.* 14: 197-207, 2003.
10. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T and Suthanthiran M: Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature.* 397: 530-4, 1999.
11. Bustami RT, Ojo AO, Wolfe RA, Merion RM, Bennett WM, McDiarmid SV, Leichtman AB, Held PJ and Port FK: Immunosuppression and the risk of post-transplant malignancy among cadaveric first kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 4: 87-93, 2004.
12. Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, Giral M, Blanche G, Dreno B and Souillou JP: Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet.* 351: 623-8, 1998.
13. Kauffman HM, Cherikh WS, Cheng Y, Hanto DW and Kahan BD: Maintenance immunosuppression with target-of-rapamycin inhibitors is associated with a reduced incidence of de novo malignancies. *Transplantation.* 80: 883-9, 2005.
14. Koehl GE, Andrassy J, Guba M, Richter S, Kroemer A, Scherer MN, Steinbauer M, Graeb C, Schlitt HJ, Jauch KW *et al.*: Rapamycin protects allografts from rejection while simultaneously attacking tumors in immunosuppressed mice. *Transplantation.* 77: 1319-26, 2004.
15. Euvrard S, Morelon E, Rostaing L, Goffin E, Brocard A, Tromme I, Broeders N, Del Marmol V, Chatelet V, Dompormartin A *et al.*: Sirolimus and Secondary Skin-Cancer Prevention in Kidney Transplantation. *N Engl J Med.* 367: 329-339, 2012.
16. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM and Cross MJ: Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal.* 19: 2003-12, 2007.
17. Aase K, Lymboussaki A, Kaipainen A, Olofsson B, Alitalo K and Eriksson U: Localization of VEGF-B in the mouse embryo suggests a paracrine role of the growth factor in the developing vasculature. *Dev Dyn.* 215: 12-25, 1999.
18. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H *et al.*: Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol.* 5: 74-80, 2004.
19. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J and Claesson-Welsh L: VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 359-71, 2006.
20. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML and Schuh AC: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 376: 62-6, 1995.
21. Siemeister G, Weindel K, Mohrs K, Barleon B, Martiny-Baron G and Marme D: Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res.* 56: 2299-301, 1996.
22. Na X, Wu G, Ryan CK, Schoen SR, di'Santagnese PA and Messing EM: Overproduction of vascular endothelial growth factor related to von Hippel-Lindau tumor suppressor gene mutations and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in renal cell carcinomas. *J Urol.* 170: 588-92, 2003.

23. Hicklin DJ and Ellis LM: Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 23: 1011-27, 2005.
24. Sun M, Shariat SF, Cheng C, Ficarra V, Murai M, Oudard S, Pantuck AJ, Zigeuner R and Karakiewicz PI: Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review. *Eur Urol.* 60: 644-61, 2011.
25. Escudier B, Bellmunt J, Negrier S, Bajetta E, Melichar B, Bracarda S, Ravaud A, Golding S, Jethwa S and Sneller V: Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. *J Clin Oncol.* 28: 2144-50, 2010.
26. Waalkes S SAJ, Kuczyk M.A.: Current treatment options for disseminated renal cell carcinoma. *European Urology supplements.* 11: 73-78, 2012.
27. Morohashi K, Takada T, Omori K, Suzuki E and Gejyo F: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in Japanese patients with sarcoidosis. *Chest.* 123: 1520-6, 2003.
28. Stephens M, Smith NJ and Donnelly P: A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 68: 978-89, 2001.
29. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ and Brenchley PE: Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine.* 12: 1232-5, 2000.
30. Yang B, Cross DF, Ollerenshaw M, Millward BA and Demaine AG: Polymorphisms of the vascular endothelial growth factor and susceptibility to diabetic microvascular complications in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications.* 17: 1-6, 2003.
31. Awata T, Kurihara S, Takata N, Neda T, Iizuka H, Ohkubo T, Osaki M, Watanabe M, Nakashima Y, Inukai K *et al.*: Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 333: 679-85, 2005.
32. Jin Q, Hemminki K, Enquist K, Lenner P, Grzybowska E, Klaes R, Henriksson R, Chen B, Pamula J, Pekala W *et al.*: Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis. *Clin Cancer Res.* 11: 3647-53, 2005.
33. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E and Sivridis E: VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 46: 293-8, 2004.
34. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, Southgate C, Easton DF, Eeles RA and Howell WM: Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res.* 62: 3369-72, 2002.
35. Bruyere F, Hovens CM, Marson MN, d'Arcier BF, Costello AJ, Watier H, Linassier C and Ohresser M: VEGF polymorphisms are associated with an increasing risk of developing renal cell carcinoma. *J Urol.* 184: 1273-8, 2010.
36. Gregoir W: [Surgical management of congenital reflux and primary megaureter]. *Urol Int.* 24: 502-26, 1969.
37. Sobin LH GM, Wittekind C (eds): TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 7th edn. Wiley-Blackwell: pp. 255-257, 2009.
38. Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R and Kirkali Z: 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *Eur Urol.* 49: 798-805, 2006.
39. Fuhrman SA, Lasky LC and Limas C: Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 6: 655-63, 1982.
40. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET and Carbone PP: Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 5: 649-55, 1982.
41. Howell WM, Bateman AC, Turner SJ, Collins A and Theaker JM: Influence of vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms on tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun.* 3: 229-32, 2002.
42. Rousset RMA: GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity.* 86: 248, 1995.
43. Iannone MA, Taylor JD, Chen J, Li MS, Rivers P, Slentz-Kesler KA and Weiner MP: Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry.* 39: 131-40, 2000.
44. Mittal RD, Srivastava P, Singh V, Jaiswal P and Kapoor R: Association of common variants of vascular endothelial growth factor and interleukin-18 genes with allograft survival in renal transplant recipients of North India. *DNA Cell Biol.* 30: 309-15, 2011.
45. Yang S, Cao S, Li J and Chang J: Association between vascular endothelial growth factor + 936 genotype and acute respiratory distress syndrome in a Chinese population. *Genet Test Mol Biomarkers.* 15: 737-40, 2011.

46. Garcia-Donas J, Esteban E, Leandro-Garcia LJ, Castellano DE, del Alba AG, Climent MA, Arranz JA, Gallardo E, Puente J, Bellmunt J *et al.*: Single nucleotide polymorphism associations with response and toxic effects in patients with advanced renal-cell carcinoma treated with first-line sunitinib: a multicentre, observational, prospective study. *Lancet Oncol.* 12: 1143-50, 2011.
47. Neuzillet Y, Tillou X, Mathieu R, Long JA, Gigante M, Paparel P, Poissonnier L, Baumert H, Escudier B, Lang H *et al.*: Renal cell carcinoma (RCC) in patients with end-stage renal disease exhibits many favourable clinical, pathologic, and outcome features compared with RCC in the general population. *Eur Urol.* 60: 366-73, 2011.
48. Singer EA, Bratslavsky G, Linehan WM and Srinivasan R: Targeted therapies for non-clear renal cell carcinoma. *Target Oncol.* 5: 119-29, 2010.
49. Paradis V, Lagha NB, Zeimoura L, Blanchet P, Eschwege P, Ba N, Benoit G, Jardin A and Bedossa P: Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch.* 436: 351-6, 2000.

Vu, le Directeur de Thèse

**Vu, le Doyen
de la Faculté de médecine de TOURS**

Académie d'Orléans – Tours

Université François-Rabelais

Faculté de Médecine de TOURS

BRICHART Nicolas

Thèse n°

46 pages – 7 tableaux – 5 figures

Résumé :

INTRODUCTION : La population des greffés rénaux présente un risque accru de tumeurs solides et notamment de tumeurs sur leurs reins propres par rapport à la population générale. Le VEGF est un facteur connu intervenant dans l'angiogenèse tumorale. L'objectif de l'étude était d'étudier le polymorphisme du VEGF comme un facteur pronostic de survenue d'un cancer du rein après transplantation rénale.

MATERIEL ET METHODES : Entre 1985 et 2011, 1619 transplantations rénales ont été effectuées dans notre centre. Parmi ces patients, 16 cas de tumeurs rénales sur reins propres ont été diagnostiqués. Ils ont été appariés à 55 témoins sur l'âge, le sexe, l'année de transplantation, le traitement immunosuppresseur et la durée de suivi. Le polymorphisme du VEGF a été déterminé par une technique validée de biologie moléculaire sur du sérum pour 5 polymorphismes du gène codant le VEGF : - 2549, - 1154, - 460, + 405 et + 936 et a été comparé entre les deux groupes.

RESULTATS : Les deux groupes étaient comparables en ce qui concerne la durée de dialyse ou la présence d'une polykystose rénale. Le groupe cancer était constitué de 44% de carcinomes à cellules claires et 56% de tubulo-papillaires. L'analyse d'association allélique et génotypique n'a pas retrouvé de différence significative. De même, un modèle de régression logistique conditionnelle sur les génotypes n'a pas retrouvé de différence significative entre un certain polymorphisme et le risque de survenue de cancer du rein. Une estimation des haplotypes a été faite et il n'y avait pas de différences entre les cas et les témoins.

CONCLUSION : Dans cette étude, le polymorphisme du VEGF n'est pas associé à la survenue d'un cancer du rein après transplantation rénale. Une étude sur un échantillon plus important et de manière multicentrique est nécessaire afin de confirmer cette hypothèse.

Mots clés :

- cancer rénal
- polymorphisme du VEGF
- transplantation rénale

Jury :

Président : Monsieur le Professeur Olivier HAILLOT
Membres : Monsieur le Professeur Franck BRUYERE
Monsieur le Professeur Christophe BARON
Monsieur le Docteur Benjamin FAIVRE D'ARCIER

Date de la soutenance : 28 septembre 2012