



HAL
open science

Mise au point d'un protocole d'évaluation de l'expression de VEGFR-2 dans les carcinomes nasaux félines par immunohistochimie

Florian Guéganou

► **To cite this version:**

Florian Guéganou. Mise au point d'un protocole d'évaluation de l'expression de VEGFR-2 dans les carcinomes nasaux félines par immunohistochimie. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04171329

HAL Id: dumas-04171329

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04171329>

Submitted on 26 Jul 2023

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

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

Copyright

Année 2023

**MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE D'ÉVALUATION DE
L'EXPRESSION DE VEGFR-2 DANS LES CARCINOMES
NASAUX FÉLINS PAR IMMUNOHISTOCHIMIE**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 13 juin 2023

par

Florian, Antoine, Nicolas GUÉGANOU

sous la direction de

Morgane CANONNE-GUIBERT

JURY

Présidente du jury :	Mme Fanny PILOT-STORCK	Professeure à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Morgane CANONNE-GUIBERT	Maîtresse de Conférences à l'EnvA
Examineur :	M. Grégory JOUVION	Professeur à l'EnvA
Membre invité :	M. Jérémy BÉGUIN	Chargé d'enseignement contractuel à l'EnvA

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



version janvier 2023

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédictte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Mathias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneç	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Amé	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Benckekroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Leïa	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Aline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guélin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Maignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Mauffré	Vincent	Maître de conférences	DPASP
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quére	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC

Remerciements

Au Président du Jury de cette thèse, Mme Fanny Storck, Professeure à l'EnvA,

Merci d'avoir accepté de faire partie de ce projet en présidant ce jury de thèse. Merci surtout d'avoir nourri nos esprits d'étudiants pendant nos trois premières années d'école avec autant de passion, de patience et d'inventivité.

À Mme Morgane Canonne-Guibert, Maîtresse de conférences à l'EnvA,

Merci pour ton implication dans ce projet depuis le jour où je suis venu te voir en recherche d'un sujet de thèse jusqu'à ce jour de soutenance qui marque la fin d'un beau projet. Tu as toujours montré un réel intérêt à suivre cette thèse et à participer à son bon déroulement et la bonne humeur a été le maître mot de nos échanges.

À Mr Grégory Jouvion, Professeur à l'EnvA,

Merci pour ton aide dans la partie d'immunohistochimie de cette thèse et en particulier dans les recherches de mise au point du protocole ; merci également d'avoir trouvé le temps de m'expliquer la lecture des lames.

À Mr Jérémy Béguin, Chargé d'enseignement contractuel à l'EnvA,

Merci d'avoir réussi à me soutenir et me suivre dans ce projet, malgré une fin de résidence à l'étranger prenante et la préparation de l'examen de l'ECVIM. Ton aide a été particulièrement précieuse pour finaliser ce projet.

À Mme Hélène Huet, Ingénieure d'études au Biopôle de l'EnvA,

Pour ta patience, ton dévouement et ta gentillesse dans la réalisation des manipulations d'immunohistochimie. J'ai adoré passer ces après-midis à découvrir ton univers et le fonctionnement du laboratoire d'anatomopathologie.

À ma famille,

Pour votre soutien permanent, sur mes projets les plus rationnels comme les plus fous. Pour un amour qui s'exprime à chaque geste, chaque attention que vous me portez.

À mes amis,

Qui m'ont permis de m'éclorre d'année en année, en grandissant et m'enrichissant à leurs côtés, un grand merci.

Table des matières

Liste des figures.....	9
Liste des tableaux	11
Liste des annexes	13
Liste des abréviations	15
Introduction	17
Première partie : VEGFR, un récepteur à activité tyrosine kinase	19
1. Présentation générale des récepteurs à activité tyrosine kinase.....	19
A. <i>Structure du récepteur</i>	19
B. <i>Fonctionnement physiologique des récepteurs à activité tyrosine kinase</i>	20
a. Dimérisation du récepteur	20
b. Activation du domaine à activité tyrosine kinase	21
c. Transduction intra-cellulaire du message	21
C. <i>Modification du fonctionnement du récepteur dans le cadre d'un processus tumoral</i>	21
a. Activation par gain de fonction	22
b. Amplification génomique	22
c. Remaniement chromosomique.....	23
d. Boucles d'activation autocrine/paracrine	23
D. <i>Perspectives thérapeutiques des inhibiteurs à tyrosines kinases</i>	23
2. Vascular endothelial growth factor (VEGF) et son récepteur.....	25
A. <i>Biochimie de VEGF et de son récepteur</i>	25
B. <i>Rôle physiologique de VEGF</i>	26
a. Rôle au sein du muscle	28
b. Rôle au sein du rein.....	28
c. Rôle au sein du poumon.....	28
d. Rôle au sein du système nerveux	28
e. Régulation de VEGF	28
C. <i>Relations structurelles et fonctionnelles de PDGF et VEGF</i>	29
D. <i>Implication de VEGF dans les processus pathologiques</i>	30
3. Importance thérapeutique des inhibiteurs de VEGFR	32
A. <i>En médecine humaine</i>	32
B. <i>En pratique vétérinaire</i>	33
a. Mastocytomes.....	33
b. Autres utilisations chez le chien	34
c. Utilisations chez le chat	37
d. Utilisation dans les carcinomes nasaux chez le chien.....	38
C. <i>Résistances aux ITK</i>	39
Deuxième partie : Carcinomes nasaux : état des connaissances chez le chat	41
1. Épidémiologie	41
2. Signes cliniques	41
3. Démarche diagnostique	41
A. <i>Cytologie à l'aiguille fine des nœuds lymphatiques régionaux</i>	42
B. <i>Imagerie</i>	42
C. <i>Biopsies nasales</i>	44
4. Prise en charge thérapeutique.....	44
A. <i>Thérapies actuelles</i>	44
B. <i>Perspectives thérapeutiques</i>	47

Troisième partie – Étude expérimentale : expression de VEGFR-2 dans les carcinomes nasaux chez le chat	49
1. Introduction et objectifs	49
2. Matériels et méthodes	49
A. <i>Caractéristiques de l'échantillon</i>	49
B. <i>Évaluation immunohistochimique de l'expression de VEGFR-2</i>	50
a. Réactifs d'immunohistochimie	50
b. Technique d'immunohistochimie	50
c. Témoins positifs	51
d. Méthode d'évaluation qualitative et semi-quantitative de l'expression de VEGFR-2	51
3. Résultats	52
A. <i>Caractéristiques de l'échantillon</i>	52
B. <i>Évaluation immunohistochimique de l'expression de VEGFR-2</i>	54
a. Mise au point du protocole d'immunohistochimie	54
b. Hypothèses	54
c. Deuxième mise au point du protocole d'immunohistochimie	55
d. Évaluation de tissus comme témoin positif	56
4. Discussion : limites et perspectives	57
Conclusion	61
Liste des références bibliographiques	63
Annexes	71

Liste des figures

Figure 1 - Structure moléculaire du récepteur à activité tyrosine kinase de l'insuline (d'après McDonald et al., 1995).....	19
Figure 2 - Classification structurale des récepteurs à activité tyrosine kinase basée sur celle proposée par Ullrich et Schlessinger (1990) (d'après Fantl et al., 1993).....	20
Figure 3 - Mécanismes d'activations physiologiques et pathologiques des récepteurs à activité tyrosine kinase (d'après Du et Lovly, 2018).....	22
Figure 4 - Voies d'activation du récepteur au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR) (d'après Olsson et al., 2006).....	25
Figure 5 - Voies de signalisation du récepteur au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR) et activités biologiques associées (d'après Olsson et al., 2006).....	27
Figure 6 - Illustration schématique de l'importance de platelet derived growth factor (PDGF-B) au cours de l'angiogenèse (Betsholtz, 2004).....	30
Figure 7 - Évolution de l'organisation vasculaire sous l'influence du récepteur au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR) (Jain, 2001).....	31
Figure 8 - Cascade de signalisation de différents récepteurs à activité tyrosine kinase (d'après Esteban-Villarrubia et al., 2020).....	32
Figure 9 - Courbes de Kaplan-Meier de durée des premiers signes de progression tumorale suite à la première prise de l'ITK entre les chiens recevant du masitinib comme première ligne thérapeutique et les chiens recevant un placebo (d'après Hahn et al., 2008).....	33
Figure 10 - Images tomodensitométriques des cavités nasales d'un chat atteint de lymphome nasal (Tromblee et al., 2006).....	42
Figure 11 - Images tomodensitométriques d'adénocarcinomes nasaux chez des chats (Bouyssou et al., 2021).....	43
Figure 12 - Modification des paramètres sanguins parmi les chats ayant eu des analyses sanguines (source : Biopôle de l'EnvA).....	52
Figure 13 - Répartition des types de tumeurs des chats inclus dans l'étude selon les résultats de l'examen histologique (source : Biopôle de l'EnvA).....	53
Figure 14 - Coupes immunohistochimiques au microscope (grossissement x 200) de tissus de granulation de chat (à gauche) et de chien (à droite) selon le protocole initialement établi.....	54
Figure 15 - Angles de discussion pour expliquer l'absence de marquage des témoins positifs.....	55
Figure 16 - Coupes immunohistochimiques au microscope (grossissement x 200) de tissus de granulation de chat (à gauche) et de chien (à droite) après modification du protocole d'immunohistochimie.....	56

Figure 17 - Coupes immunohistochimiques au microscope (grossissement x 200) de carcinomes urothéliaux de chat (à gauche) et de chien (à droite)..... 57

Liste des tableaux

Tableau 1 – Synthèse bibliographique de l'utilisation du tocéranib comme traitement anti-cancéreux chez le chien (d'après Frezoulis et Harper, 2022)	37
Tableau 2 - Synthèse des études publiées sur l'efficacité de la radiothérapie externe dans la gestion des tumeurs nasales chez le chat.....	46

Liste des annexes

Annexe 1 - Signalement des chats inclus dans l'étude.....	71
Annexe 2 - Caractéristiques épidémiologiques des chats inclus dans l'étude.....	71
Annexe 3 - Analyses sanguines des chats inclus dans l'étude.....	73
Annexe 4 - Résultats de l'examen tomodensitométrique des chats inclus dans l'étude.....	74
Annexe 5 - Résultats d'endoscopie des chats inclus dans l'étude.....	75
Annexe 6 - Bilan d'extension des chats inclus dans l'étude.....	76

Liste des abréviations

ASAC : *anal sac adenocarcinoma*

ATP : adénosine triphosphate

ChuvA : centre hospitalier universitaire vétérinaire d'Alfort

COX : cyclooxygénase

DTK : domaine à activité tyrosine kinase

ECVIM : *european college of veterinary internal medicine*

EnvA : école nationale vétérinaire d'Alfort

Flt-1 : *Fms-like tyrosine kinase*

GIST : *gastrointestinal stromal tumor*

IC : intervalle de confiance

IRM : imagerie par résonance magnétique

IRS : *immunoreactivity score*

ITK : inhibiteur de tyrosine kinases

KDR : *kinase insert domain-containing receptor*

PDGF : *platelet derived growth factor*

PDGFR : récepteur de PDGF

RTK : récepteur à activité tyrosine kinase

TK : tyrosine kinase

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

VEGFR : récepteur de VEGF

Introduction

Parmi les traitements anti-cancéreux actuellement en développement en médecine humaine, les thérapies ciblées constituent une véritable avancée dans la prise en charge des patients atteints de tumeurs (Dervis et Klahn, 2016). L'immunothérapie et les inhibiteurs des tyrosine kinases, dont deux spécialités vétérinaires comme le mésylate de masitinib (Masivet ND) et le phosphate de tocéranib (Palladia ND) sont déjà commercialisées, constituent des exemples de traitements d'avenir (Qin *et al.*, 2019). La thérapie ciblée a vocation à agir plus spécifiquement sur les cellules tumorales en diminuant les effets secondaires des traitements actuellement utilisés comme la chimiothérapie ou la radiothérapie, que ce soit d'un point de vue des effets secondaires, des lourdeurs financière et réglementaire inhérentes aux procédures ou des risques environnementaux et biologiques associés.

Les tumeurs nasales sont des tumeurs rares chez le chat mais dont environ 90% revêtent un caractère malin (Cox *et al.*, 1991) (Mukaratirwa *et al.*, 2001). Les carcinomes et les lymphomes nasaux sont les deux tumeurs des cavités nasales les plus prévalentes chez le chat, avec des répartitions respectives variables selon les études (Nagata *et al.*, 2014). Alors que la chimiothérapie peut être une solution envisagée lors de lymphome nasal, les carcinomes nasaux félines n'y répondent que peu et seule la radiothérapie externe est actuellement la solution la plus efficace pour lutter contre la progression tumorale (Malinowski, 2006). Or la radiothérapie externe est actuellement en médecine vétérinaire peu disponible sur le territoire français, avec des coûts importants liés notamment au prix du matériel utilisé et nécessite à chaque séance une anesthésie générale. La prise en charge des carcinomes nasaux félines constitue ainsi un défi thérapeutique majeur pour un grand nombre de propriétaires, amenant la nécessité d'explorer de nouvelles options thérapeutiques.

En 2021, Nicolas Diop a présenté une thèse vétérinaire sur l'évaluation immunohistochimique de l'expression de COX-2 dans les carcinomes nasaux de chat (DIOP N., 2021). L'objectif de cette thèse est plus largement de répondre à la problématique : quelles solutions thérapeutiques alternatives sont efficaces dans la prise en charge des carcinomes nasaux félines ? L'idée de prescrire des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme traitement des carcinomes nasaux chez le chat émerge de publications vétérinaires montrant, chez le chien, une surexpression des cyclooxygénases (COX) dans les carcinomes nasaux canins et justifiant ainsi l'utilisation des AINS dans la prise en charge de ces derniers (Belshaw *et al.*, 2011) (Impellizeri et Esplin, 2008) (Kleiter *et al.*, 2004) (KUCA T., 2013). L'étude rétrospective de N. Diop montre une absence de marquage immunohistochimique à COX-2 sur les biopsies nasales des dix-huit chats inclus. Ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse d'une inefficacité des AINS dans le traitement des carcinomes nasaux chez le chat.

Dans la continuité de cette thèse, de nouvelles alternatives thérapeutiques peuvent être étudiées. Des spécialités vétérinaires d'inhibiteurs des tyrosine kinases (ITK) sont depuis plus d'une dizaine d'année commercialisées sous les noms de Palladia ND (principe actif : tocéranib) et Masivet ND (principe actif : masitinib). Parmi les récepteurs à activité tyrosine kinase ciblés par ces spécialités, le choix s'est porté sur l'étude du récepteur au facteur *vascular endothelial growth factor* (VEGF) impliqué principalement dans les phénomènes d'angiogenèse et de néovascularisation nécessaires notamment au développement tumoral. Son expression a été mise en évidence par

immunohistochimie dans de nombreux types de cancers en particulier chez le chien (Kimura *et al.*, 2022).

Les carcinomes nasaux félines sont des entités rares et dont l'exploration est limitée par l'adhésion des propriétaires à réaliser des examens tomodensitométrique, rhinoscopique, histologique et immunohistochimique nécessaires au diagnostic de certitude. Cela complique grandement l'étude de cette maladie à la fois vis-à-vis du nombre de sujets inclus et de la possibilité de réaliser des études prospectives. La thèse qui suit s'inscrit donc dans une volonté d'initier les recherches sur des traitements alternatifs dans la prise en charge des carcinomes nasaux félines et non comme réponse complète à la problématique : quelles solutions thérapeutiques alternatives sont efficaces dans la prise en charge des carcinomes nasaux félines ? L'étude porte plus précisément sur l'évaluation de l'expression du récepteur VEGFR-2 sur des biopsies de carcinomes nasaux de chat, dans une volonté de mieux rationaliser l'utilisation des ITK ciblant ce récepteur dans la prise en charge des carcinomes nasaux félines.

Première partie : VEGFR, un récepteur à activité tyrosine kinase

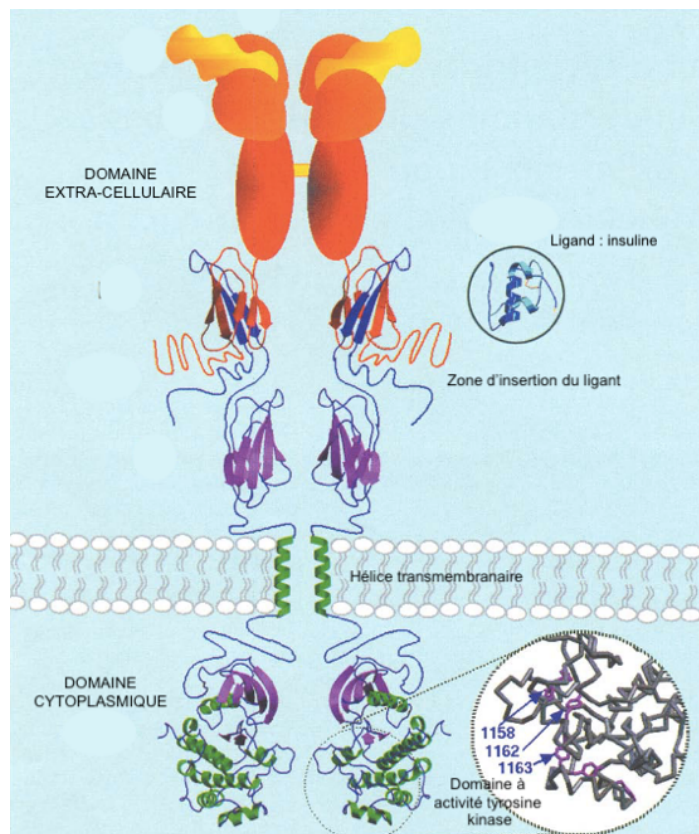
1. Présentation générale des récepteurs à activité tyrosine kinase

A. Structure du récepteur

La famille des tyrosine kinases (TK) est une famille large comprenant à la fois des TK sous forme de récepteur, que l'on nommera par la suite récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), permettant la transduction intra-cellulaire d'un signal extérieur à la cellule et les TK non-récepteur permettant davantage une communication intra-cellulaire et que nous n'aborderons pas ici (Qin *et al.*, 2019).

La morphologie des RTK est relativement similaire d'un récepteur à l'autre, comme décrite dans la Figure 1 : un domaine extra-cellulaire, une hélice trans-membranaire simple et un domaine cytoplasmique – contenant une région juxta-membranaire régulatrice de son activité, un domaine à activité tyrosine kinase (DTK) et une extrémité C-terminale (Du et Lovly, 2018). Le domaine extra-cellulaire a vocation à la liaison du ligand ; ce domaine est souvent glycosylé. Le domaine cytoplasmique, quant à lui, est le lieu d'autophosphorylation du récepteur, régulé par des séquences présentes dans ce même domaine qui inhibent la dimérisation spontanée du récepteur (Schlessinger, 2000).

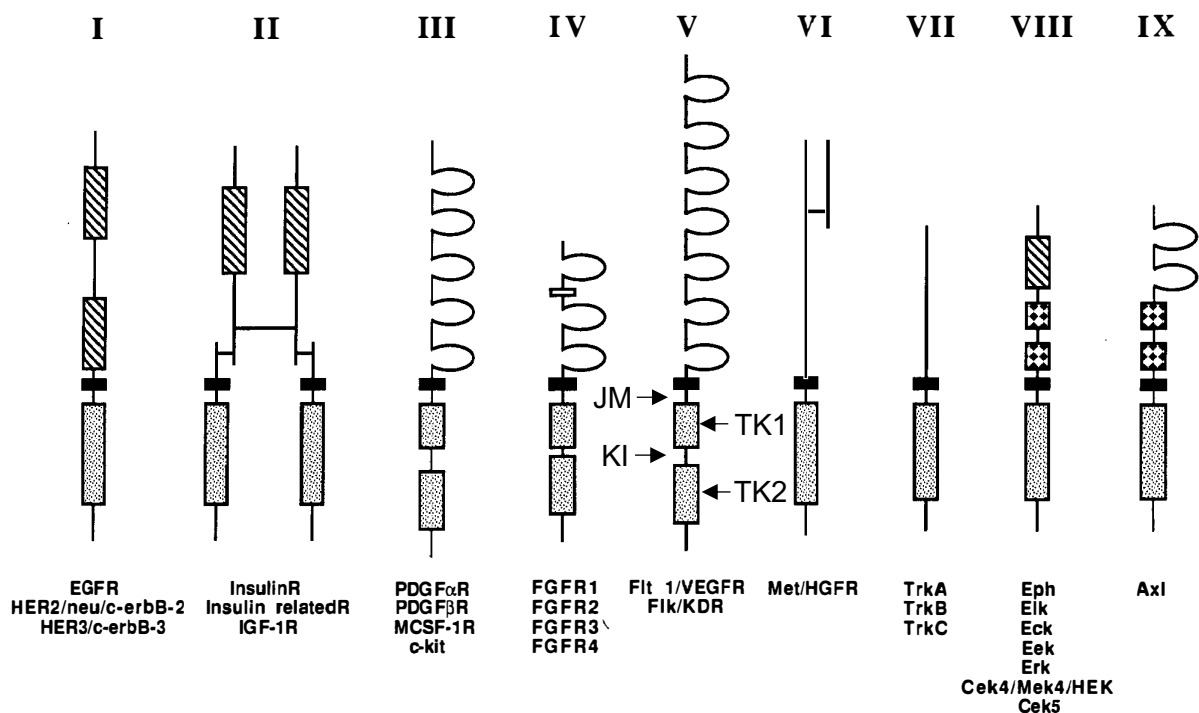
Figure 1 - Structure moléculaire du récepteur à activité tyrosine kinase de l'insuline (d'après McDonald *et al.*, 1995).



Une classification des RTK a initialement été proposée par Ullrich et Schlessinger (1990) – basée sur des différences structurelles entre récepteurs – et a évolué avec la découverte de nouveaux récepteurs, comme présenté sur la Figure 2. La classe V comprend VEGFR et est caractérisée par sept domaines à immunoglobulines sur le domaine extra-cellulaire du récepteur (Fantl *et al.*, 1993).

Figure 2 - Classification structurelle des récepteurs à activité tyrosine kinase basée sur celle proposée par Ullrich et Schlessinger (1990) (d'après Fantl *et al.*, 1993).

Domaine à activité tyrosine kinase (boîte en pointillés), domaine trans-membranaire (boîte remplie noire), domaine riche en cystéines (boîte rayée), domaine immunoglobuline (boucle), domaine acide (boîte vide) et domaine fibronectine de type III (boîte à carreaux) (Fantl *et al.*, 1993). JM : domaine juxta-membranaire, KI : insertion de la protéine kinase, TK1 : domaine à activité tyrosine kinase de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP), TK2 : domaine à activité tyrosine kinase à activité phosphotransférase (Lasota et Miettinen, 2006).



B. Fonctionnement physiologique des récepteurs à activité tyrosine kinase

a. Dimérisation du récepteur

L'activation du récepteur commence par la dimérisation de son domaine extra-cellulaire selon quatre modalités différentes.

La dimérisation de ce domaine peut être médiée uniquement par la liaison du ligand à deux récepteurs, sans contact direct entre les domaines extra-cellulaires des deux récepteurs, comme pour le récepteur au NGF (*nerve growth factor*) et au TrkA (*tropomyosin receptor kinase A*).

La dimérisation peut au contraire être uniquement médiée par les récepteurs, sans interaction entre les deux ligands activateurs, comme c'est le cas pour la famille des ErbB.

La dimérisation peut être également le résultat de la liaison de ligands homodimères aux domaines extra-cellulaires de deux récepteurs différents qui interagissent ensemble, comme c'est le cas pour le récepteur KIT.

Enfin, il peut s'ajouter à la liaison entre ligands et au contact entre récepteurs des molécules accessoires qui stabilisent le complexe formé, telles que l'héparine et l'héparane sulfate, comme pour le récepteur FGFR (*fibroblast growth factor receptor*) (Du et Lovly, 2018) (Paul et Mukhopadhyay, 2004).

b. Activation du domaine à activité tyrosine kinase

L'activation du DTK est permise par des interactions moléculaires propres à chaque récepteur. Le DTK inactif est sous forme cis-autoinhibitrice. La stabilisation de la conformation inactive peut se faire via la boucle d'activation – comme pour le récepteur FGFR ou pour le récepteur à l'insuline –, via le domaine juxta-membranaire auto-inhibiteur – pour le récepteur KIT – ou encore via l'extrémité C-terminale – pour le récepteur MET. L'activation du DTK par relargage de la forme cis-autoinhibitrice entraîne une trans-phosphorylation du résidu tyrosine, permettant d'acquérir sa conformation active (Du et Lovly, 2018).

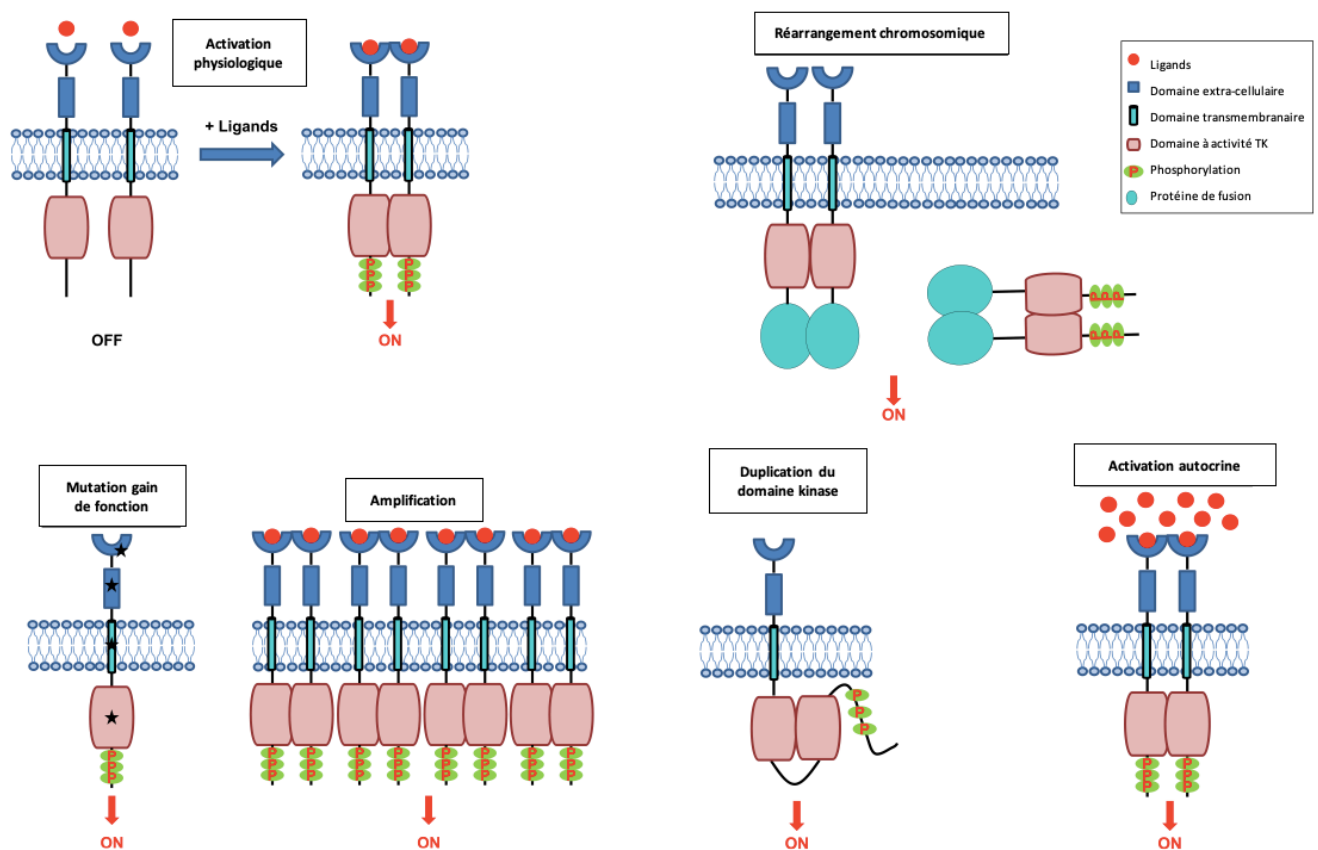
c. Transduction intra-cellulaire du message

L'activation du DTK entraîne un recrutement de protéines de signalisation en aval, majoritairement à domaine SH2 (*Src homology-2*) et PTB (*phosphotyrosine-binding*). Ce recrutement peut se faire directement par le récepteur ou indirectement via des protéines-ponts (*docking proteins*) qui fonctionnent comme des plateformes d'assemblage de différentes protéines. La diversité des résidus phosphotyrosines et des protéines-ponts permet l'activation en cascade d'une grande variété de voies de signalisation en aval (Du et Lovly, 2018).

C. Modification du fonctionnement du récepteur dans le cadre d'un processus tumoral

Une régulation fine des RTK permet de maintenir un équilibre entre prolifération et mort cellulaires. Lors de processus tumoral, l'activation spontanée du récepteur engendre une perte de cet équilibre, participant au développement tumoral. Quatre mécanismes différents sont à l'origine de cette activation aberrante, comme décrits dans la Figure 3 : une activation par gain de fonction, une amplification génomique, un réarrangement chromosomique et une activation autocrine/paracrine (Paul et Mukhopadhyay, 2004) (Demoulin et Essaghir, 2014).

Figure 3 - Mécanismes d'activations physiologiques et pathologiques des récepteurs à activité tyrosine kinase (d'après Du et Lovly, 2018).



a. Activation par gain de fonction

Une mutation gain de fonction dans une séquence génomique codant pour le récepteur peut être à l'origine d'une activation aberrante du récepteur. Les mutations somatiques particulièrement intéressantes à identifier sont les mutations pilotes (*driver mutations*) qui offrent un avantage sélectif dans la croissance cellulaire. Cela a notamment été mis en évidence sur des résidus génétiquement conservés dans le temps comme les résidus D, F et G de la boucle d'activation du récepteur, impliqués dans la liaison de l'ATP avec le site à activité catalytique du RTK, ou au niveau du site de liaison à l'ATP. Des mutations des domaines extra-cellulaire, transmembranaire ou juxta-membranaire ont également été rapportées (Du et Lovly, 2018) (Paul et Mukhopadhyay, 2004).

b. Amplification génomique

L'amplification génomique correspond à une augmentation du nombre de copies d'une région génomique donnée. Différents mécanismes génétiques d'amplification du génome ont été identifiés dans les processus tumoraux : via la présence de petits fragments d'ADN extra-chromosomiques (*double minute chromosomes*) ou par répétition d'unités soit dans un même locus, soit dispersées dans le génome. Le niveau d'amplification est différent selon le mécanisme, avec plus de 25 copies pour les chromosomes minuscules doubles et entre 5 et 25 copies pour les fragments dispersés dans le génome. Cette amplification génomique conduit à une sur-expression de RTK à l'origine d'une concentration locale accrue du récepteur. La signalisation intra-cellulaire est alors augmentée et la régulation antagoniste submergée.

Des mécanismes épigénétiques peuvent également entraîner une sur-expression du récepteur : une augmentation de la transcription du gène codant le récepteur, une altération des systèmes de régulation du récepteur ou encore via l'action de virus oncogènes (Du et Lovly, 2018).

c. Remaniement chromosomique

Un remaniement chromosomique est le résultat de la fusion de deux segments chromosomiques qui ne sont normalement pas rattachés ensemble (Herrera et Garcia-Bertrand, 2018). De nombreux réarrangements chromosomiques sont à l'origine de protéines de fusion incluant des tyrosine kinases ; les mécanismes de fusion sont très divers mais les structures résultantes revêtent de nombreuses similarités. Ces remaniements peuvent ainsi permettre une activation constitutive des tyrosine kinases et contourner ainsi les mécanismes inhibiteurs normalement présents.

La duplication partielle du DTK est un exemple de remaniement chromosomique permettant la formation de nouvelles isoformes et étant à l'origine, dans le cadre du processus tumoral, de nouveaux moyens d'activation constitutive du récepteur (Du et Lovly, 2018). C'est le cas en particulier du récepteur KIT dans les mastocytomes canins, par duplication de son domaine juxta-membranaire ; cette région permettant physiologiquement une auto-régulation négative du récepteur, la duplication résultante déstabilise la structure du domaine et favorise indirectement l'activation constitutive du récepteur et donc la voie de signalisation associée (London, 2009).

d. Boucles d'activation autocrine/paracrine

La communication inter-cellulaire est permise par des messagers, comme des facteurs de croissance ou des cytokines. Une activation autocrine des RTK par ces messagers est décrite, résultant en une production conjointe et excessive du RTK et de son ligand par la même cellule tumorale et favorisant ainsi sa propre prolifération cellulaire (Du et Lovly, 2018) (Paul et Mukhopadhyay, 2004). TGF- β et son récepteur EGFR dans les glioblastomes et les carcinomes épidermoïdes ou VEGF et VEGFR dans les mélanomes et glioblastomes humains en sont ainsi des exemples (Ekstrand *et al.*, 1991) (Graeven *et al.*, 1999).

D. Perspectives thérapeutiques des inhibiteurs de tyrosine kinases

Les inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK) sont une famille de molécules dont l'usage est quasi-exclusivement anti-cancéreux, bien qu'une utilisation dans d'autres domaines – traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique chez l'homme par exemple – soit décrite (Grimminger *et al.*, 2015). L'importance du rôle des RTK dans la genèse et la croissance tumorale en font une thérapie ciblée privilégiée en oncologie.

La leucémie myéloïde chronique humaine est caractérisée dans 90% des cas par une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 (Chromosome de Philadelphie). Elle conduit à la formation de la protéine de fusion BCR-ABL entre la séquence *break point cluster region* (BCR) et la séquence de la tyrosine kinase c-ABL (Paul et Mukhopadhyay, 2004). Le premier ITK découvert en médecine humaine a été le mésylate d'imatinib, de nom déposé Gleevec[®], entrant en compétition avec le site de liaison de l'ATP de la protéine de fusion BCR-ABL mais également des tyrosine kinases KIT et PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*) ; ce fut un traitement utilisé dans la leucémie myéloïde chronique de par sa facilité d'administration – voie orale – et son action ciblée contre les cellules tumorales (Paul et Mukhopadhyay, 2004) (London, 2013).

L'utilisation des ITK s'est par la suite élargie à de nombreux cancers en médecine humaine ; à titre d'exemples, le sorafenib a montré une efficacité dans le traitement des carcinomes rénaux de stade avancé, le sunitinib dans les *gastrointestinal stromal tumor* (GIST) résistants à l'imatinib ou encore le regorafenib dans les cancers colorectaux métastasés (Qin *et al.*, 2019). Leur recherche est toujours d'actualité en médecine humaine et en pleine voie de développement en médecine vétérinaire.

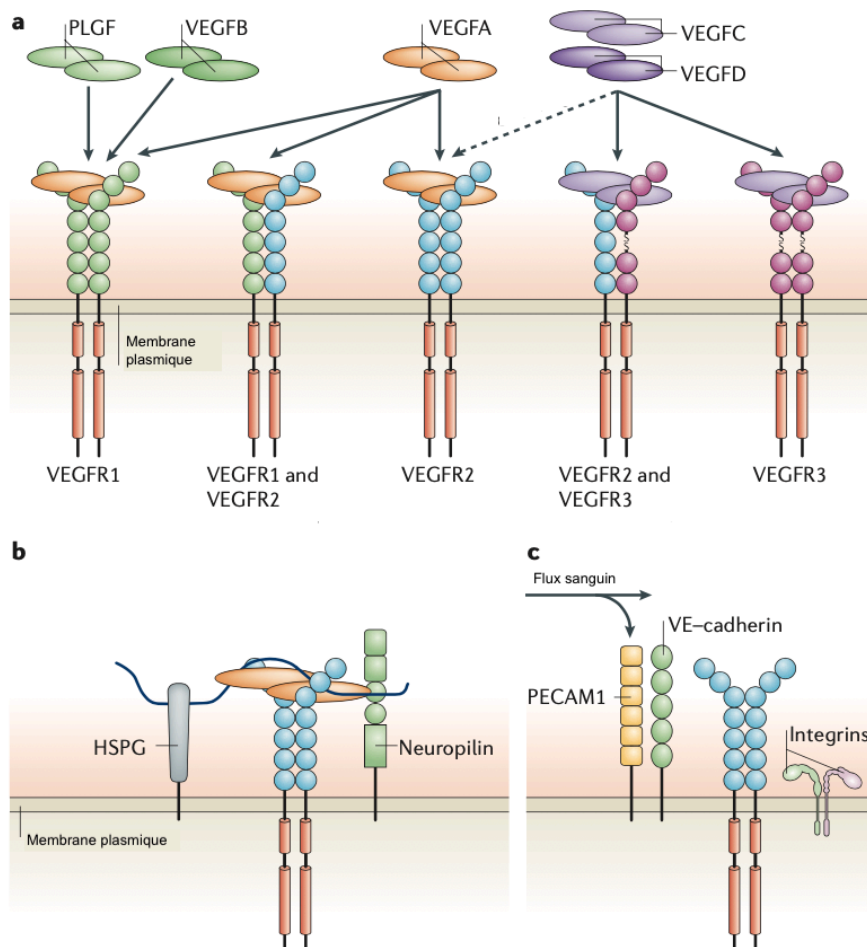
2. Vascular endothelial growth factor (VEGF) et son récepteur

A. Biochimie de VEGF et de son récepteur

Il existe trois récepteurs à la protéine *vascular endothelial growth factor* (VEGF) : VEGFR-1 (issu du gène Flt-1) et VEGFR-2 (issu du gène KDR), tous deux localisés préférentiellement au niveau des vaisseaux sanguins et VEGFR-3 (issu du gène Flt-4) au niveau des vaisseaux lymphatiques (Figure 4) (Ivy *et al.*, 2009).

Figure 4 - Voies d'activation du récepteur au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR) (d'après Olsson *et al.*, 2006).

(a) la fixation de ligands comme VEGF ou PlGF est la principale voie d'activation du récepteur VEGFR, avec des affinités différentes selon les ligands et leurs isoformes. Voies d'activation alternatives de VEGFR : (b) régulation par des co-récepteurs comme les protéoglycanes à héparine sulfate et les neuropilines ; (c) activation par un flux sanguin ou un stress important, faisant intervenir le complexe VEGFR, PECAM-1 et VE-cadherine.



Les cellules endothéliales sont les principales productrices de VEGFR mais l'expression du récepteur par des cellules non-endothéliales est également décrite dans la littérature, notamment par des monocytes, des macrophages, des cellules souches hématopoïétiques, des cellules épithéliales, des fibroblastes, des cellules musculaires lisses et des cellules précurseurs myogéniques (Olsson *et al.*, 2006).

Le récepteur VEGFR admet de nombreux ligands dont les membres de la famille du VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C et VEGF-D), le *placental growth factor* (PLGF), le VEGF-E issu d'un

parapoxvirus et le VEGF-F issu de venin de serpent. Le facteur VEGF-A se lie à VEGFR-1 et VEGFR-2 ; le substrat VEGF-B et PLGF acceptent comme unique récepteur VEGFR-1 ; les VEGF-C et VEGF-D se lient à VEGFR-3. Le VEGF-F se lie quant à lui à VEGFR-1 et VEGFR-2 et le VEGF-E à VEGFR-2 (Esteban-Villarrubia *et al.*, 2020).

Le récepteur VEGFR-2 est considéré parmi les trois récepteurs comme le médiateur principal des effets mitotique, angiogénique et perméabilisant de VEGFR.

Le récepteur VEGFR-1, quant à lui, a une action régulatrice : régulation positive de la migration des monocytes et macrophages et régulation négative de VEGFR-2 en conditions physiologiques – expliquée par la plus grande affinité de VEGF-A pour les formes transmembranaires et solubles de VEGFR-1. Il agit également comme régulateur positif de VEGFR-2 dans certaines conditions pathologiques : la production de PLGF (*Placental Growth Factor*) et sa liaison à VEGFR-1 permet la libération de VEGF-A ; le facteur VEGF-A est à son tour activateur de VEGFR-2. Une inhibition directe par VEGFR-1 des voies intracellulaires régulatrices de VEGFR-2 est également décrite (Olsson *et al.*, 2006) (Breen, 2007) (Natoli *et al.*, 2010).

Physiologiquement, le facteur VEGF est stocké dans les plaquettes et relargué lors de l'activation de ces dernières au sein du clou plaquettaire (Wergin et Kaser-Hotz, 2004) (Natoli *et al.*, 2010). L'activation du récepteur VEGFR passe également par la formation de complexes, associée au flux sanguin ou à un stress important et incluant VEGFR-2, PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) et la VE-cadherine (*vascular endothelial-cadherin*) (Olsson *et al.*, 2006).

Un épissage alternatif des différents membres de la famille de VEGF est à l'origine d'isoformes ayant des activités biologiques différentes et notamment VEGF-165b, une isoforme de VEGF-A, qui semble, à l'inverse des autres facteurs, inhiber l'activité de VEGFR (Olsson *et al.*, 2006).

Certaines isoformes possèdent un domaine de liaison avec les co-récepteurs à VEGFR que sont la neuropiline-1 et les protéoglycanes à héparane sulfate. Ces co-récepteurs participent au maintien du facteur VEGF dans un environnement proche de la cellule productrice ; ils régulent également la qualité de la réponse VEGFR notamment en jouant sur la demi-vie du complexe formé.

La neuropiline-1 est impliquée dans la stabilisation du complexe VEGF/VEGFR et joue ainsi un rôle dans le développement tumoral en favorisant les mécanismes d'angiogenèse.

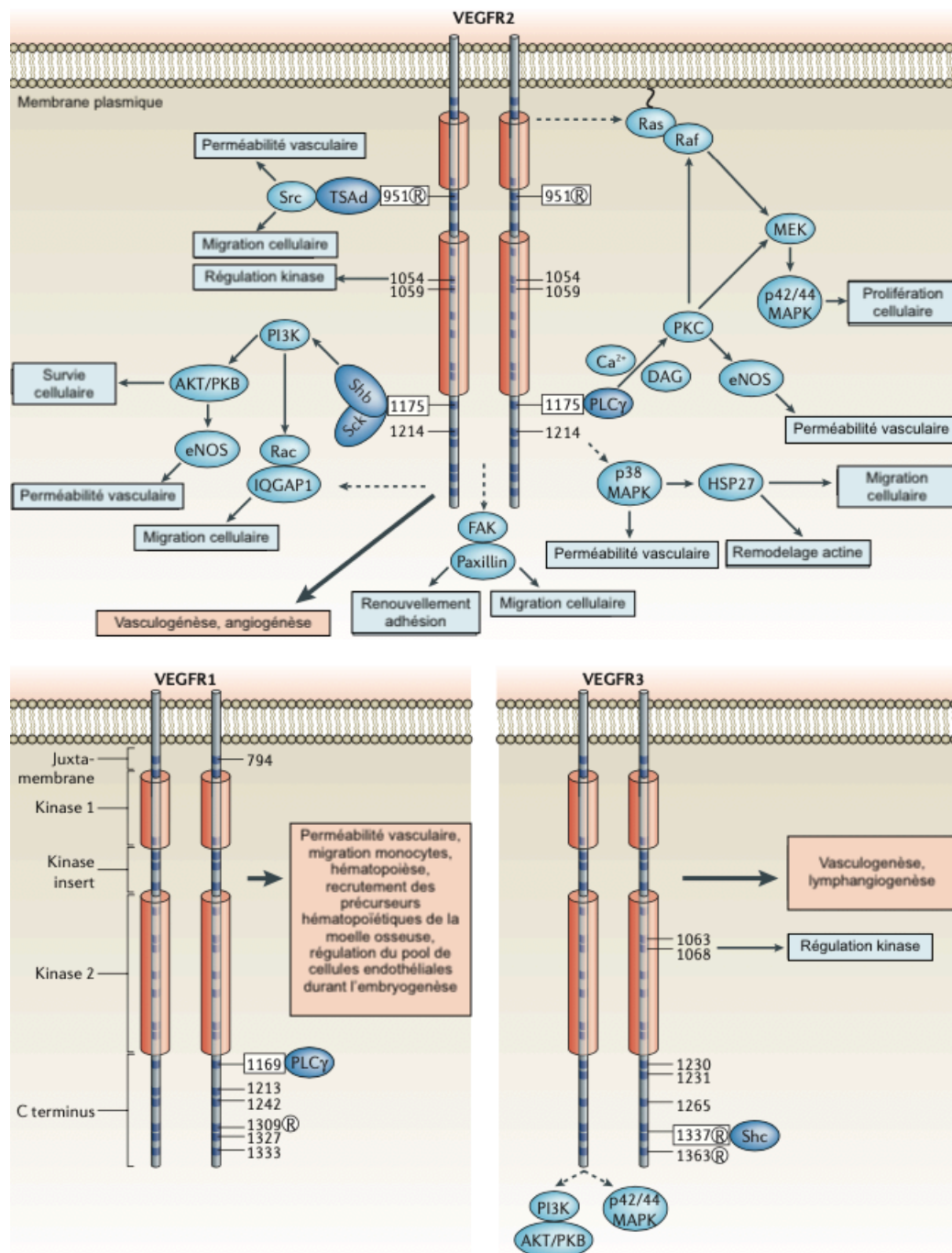
Les protéoglycanes à héparine sulfate sont notamment produits par les péricytes et participent à la mise en place d'un gradient de VEGFR-A-164 permettant d'orienter spatialement la croissance vasculaire lors des processus d'angiogenèse (Olsson *et al.*, 2006).

B. Rôle physiologique de VEGF

Un acteur clé de la régulation de la vasculogenèse dans les stades précoces du développement embryonnaire est le ligand VEGF qui favorise la différenciation et l'organisation en un plexus capillaire primaire – sanguin et lymphatique – à partir de progéniteurs des cellules endothéliales ; son importance est moindre une fois qu'un système vasculaire stable s'est mis en place (Breen, 2007).

Chez l'adulte, le rôle physiologique de VEGF se rapporte aux mécanismes d'angiogenèse (Figure 5) liés au cycle sexuel féminin, à la formation placentaire et à la réparation tissulaire (Carmeliet, 2005) (Kajdaniuk *et al.*, 2011).

Figure 5 - Voies de signalisation du récepteur au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR) et activités biologiques associées (d'après Olsson *et al.*, 2006).



Une étude de Kamba *et al.* (2006) sur modèle murin a montré chez l'adulte la dépendance de certains vaisseaux à VEGF – notamment dans la thyroïde, les îlots pancréatiques ou la corticosurrénale – dont l'endothélium est caractérisé par de nombreuses fenestrations et est le lieu d'une expression abondante en VEGFR-2 et VEGFR-3 (Kamba *et al.*, 2006). Néanmoins ces critères ne sont pas des prérequis à une dépendance vasculaire à VEGF. Certains organes, comme le rein, présentent ainsi une expression abondante de VEGFR sans qu'une régression des capillaires ne soit observée suite au blocage de VEGFR ; cela montre qu'une expression de VEGFR dans un tissu n'est pas forcément corrélée à une dépendance vasculaire de ce tissu à VEGF.

Il semble en effet que la régulation de la survie d'une micro-vascularisation VEGF-dépendante soit soumise à des interactions complexes entre facteurs pro- et anti-angiogéniques et dont des variations subtiles temporellement et spatialement modifient la spécialisation endothéliale. Cette dépendance illustre l'existence d'une plasticité de la micro-vascularisation mature, régulée par de nombreux facteurs.

a. Rôle au sein du muscle

Le ligand VEGF participe à réguler l'angiogenèse associée à un exercice physique ou au métabolisme ; l'augmentation du flux sanguin ou la vasodilatation chronique au sein du muscle, l'étirement des fibres musculaires et l'entraînement musculaire sont les trois mécanismes amenant à un changement du nombre de capillaires au sein du muscle (Breen, 2007).

b. Rôle au sein du rein

Le ligand VEGF est également impliqué dans la protection des barrières spécialisées du rein. Exprimé par les podocytes, cellules épithéliales spécialisées du rein qui régulent les échanges d'eau et de macromolécules du filtre glomérulaire, le facteur VEGF permet la survie de ces cellules via une interaction autocrine entre VEGFR-1 et la neuropiline 1 qui maintient une concentration calcique adéquate au sein du cytosol des podocytes. Des études sur modèles murins mutés et sur les effets indésirables des thérapies anti-VEGF suggèrent l'importance de VEGF dans le fonctionnement rénal (Breen, 2007).

c. Rôle au sein du poumon

Au sein du parenchyme pulmonaire, le facteur VEGF a un rôle différent selon le type cellulaire exprimant ce facteur de croissance et le lieu de production au sein du poumon. Il est produit à forte intensité par deux types de cellules spécialisées du parenchyme pulmonaire et des voies respiratoires de petit calibre : les pneumocytes de type II et les cellules épithéliales bronchiques. Une sur-expression de VEGF dans les voies supérieures, induite par un phénomène inflammatoire, entraîne une augmentation de la perméabilité endothéliale et favorise la sensibilisation antigénique et la voie d'inflammation TH2. Au contraire, une diminution de l'expression de VEGF dans le parenchyme alvéolaire entraîne une apoptose des cellules épithéliales et endothéliales des septa alvéolaires, à l'origine d'une destruction des parois alvéolaires (Breen, 2007).

d. Rôle au sein du système nerveux

Par ailleurs, le facteur VEGF est exprimé par les neurones et les astrocytes de la moelle épinière et cible VEGFR-2 et la neuropiline-1 au niveau des neurones moteurs et des axones des nerfs périphériques. Deux études *in vitro* ont montré un rôle direct du facteur VEGF sur les neurones moteurs par une protection contre la toxicité provoquée par l'hypoxie ou des agents oxydants et par un rôle trophique pour les cellules souches neuronales. Les études *in vivo* menées depuis celles-ci tendent à montrer l'importance de VEGF dans la survie des cellules neuronales et le recrutement de leurs progéniteurs (Breen, 2007).

e. Régulation de VEGF

La régulation en amont de l'expression génétique de VEGF passe par de nombreux facteurs de croissance comme le *platelet-derived growth factor* (PDGF), le *fibroblast growth factor* (FGF), l'*epidermal growth factor* (EGF) ou des cytokines comme les *tumor necrosis factors* (TNF) et

l'interleukine-1 (IL-1). Par ailleurs, une hypoxie ou une acidose locale médient l'expression de l'*hypoxia inducible factor 1* (HIF-1) favorisant la production de VEGF-A et VEGFR-1, dans une logique de mauvaise perfusion tissulaire (Carmeliet, 2005) (Natoli *et al.*, 2010).

En aval de l'expression génique, l'activation du facteur VEGF passe par des transformations post-transcriptionnelles incluant des métalloprotéases de la matrice extracellulaire ou par des facteurs extra-cellulaires comme la plasmine ou les lactates (Breen, 2007) (Kumar *et al.*, 2007). Comme mentionné précédemment, le VEGF admet des co-récepteurs comme des protéoglycanes à héparine sulfate ou des neuropilines, qui peuvent modifier la liaison de VEGFR avec son ligand ou qui se lient directement à VEGF pour produire une réponse cellulaire (Breen, 2007).

L'activité du récepteur VEGFR est quant à elle limitée dans le temps via différents mécanismes : une déphosphorylation rapide par des phosphatases spécifiques aux résidus tyrosines ; une inhibition directe du récepteur VEGFR-2 par les phosphatases à phosphotyrosine SHP1 et SHP2 ; une dégradation via la voie du protéasome ou une internalisation avec dégradation par les lysosomes via la phosphorylation par la protéine kinase C de l'extrémité C-terminale de VEGFR-2 (Olsson *et al.*, 2006).

C. Relations structurelles et fonctionnelles de PDGF et VEGF

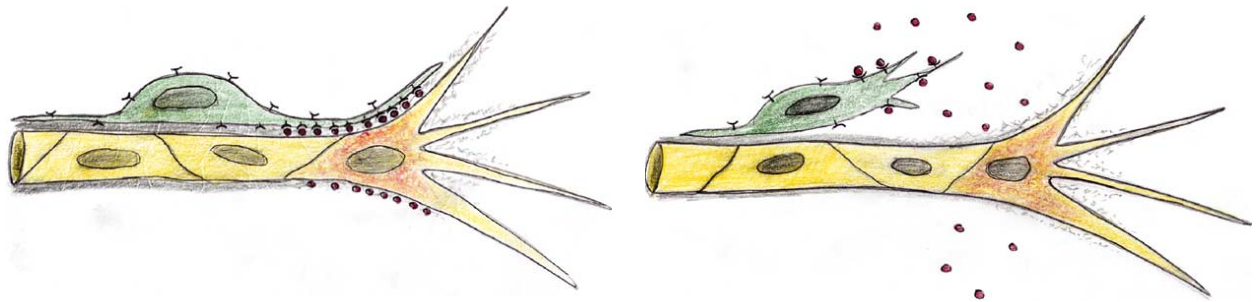
Il existe un domaine homologue entre le facteur de prolifération cellulaire PDGF et le facteur VEGF d'environ cent acides aminés et incluant notamment un motif nœud de cystéine (*cysteine knot motif*) constitué de huit résidus cystéines à ponts disulfures intra- et inter-chaînes ; ce domaine est particulièrement conservé au cours du temps et présent dans de nombreuses espèces, de la *Drosophile* à différentes espèces de serpents (Fredriksson *et al.*, 2004) (Olsson *et al.*, 2006).

Ball *et al.* (2007) a montré, dans une étude sur des lignées de cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse humaine, que VEGF-A, dont le récepteur n'est pas produit au sein de la moelle osseuse, était capable d'induire la phosphorylation de PDGFR- α et PDGFR- β , favorisant la migration et la prolifération des cellules, sans que l'interaction entre le facteur VEGF et le récepteur PDGFR n'ait pour le moment été caractérisée. Par ailleurs, cette étude a montré que VEGF-A, à faible concentration, inhibe l'effet de PDGF-A et PDGF-B par compétition avec leur récepteur PDGFR (Ball *et al.*, 2007).

De plus, l'action du facteur PDGF-B sur les cellules de la paroi vasculaire a été décrite, notamment au cours des phénomènes d'angiogenèse. PDGF-B est sécrété par l'endothélium de manière localisée et présente un motif de maintien (*retention motif*) sur son extrémité C-terminale qui permet une liaison à des protéoglycanes à héparane sulfate et ainsi une attache à la cellule productrice et à la matrice extracellulaire environnante (Figure 6) ; cela garantit son maintien dans l'environnement proche de son lieu de production (Abramsson *et al.*, 2007), ce qui lui permet d'agir comme facteur paracrine à courte distance. Son récepteur PDGFR- β est exprimé par les péricytes, cellules murales des capillaires sanguins. Ces particularités permettent aux péricytes de maintenir une attache sur les vaisseaux en croissance (Betsholtz, 2004). Une action synergique de PDGF et VEGF dans les phénomènes d'angiogenèse est ainsi mise en évidence.

Figure 6 – Illustration schématique de l'importance du platelet derived growth factor B (PDGF-B) au cours de l'angiogenèse (Betsholtz, 2004)

Au cours de l'angiogenèse, le PDGF-B (points rouges) permet le maintien des péricytes (cellule verte) aux cellules endothéliales (cellules jaunes) des vaisseaux sanguins. Ce maintien est permis par un motif de maintien (retention motif) de PDGF-B ; le schéma ci-dessous montre le détachement des péricytes (à droite) dans le cas de protéines PDGF-B à motif de maintien muté, en comparaison à la situation physiologique de PDGF-B sauvage (à gauche).



D. Implication de VEGF dans les processus pathologiques

Le rôle de VEGF dans des processus pathologiques inclut non seulement les processus tumoraux mais également les phénomènes d'ischémie et d'inflammation comme dans les maladies cardiaques ischémiques ou les infarctus myocardiques, dans les atteintes pulmonaires, dans les accidents vasculaires cérébraux ou encore dans les arthropathies (Kajdaniuk *et al.*, 2011).

Le rôle de VEGF n'est pas limité à l'angiogenèse : il participe à la survie cellulaire via l'induction de facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-2 et la survivine. Le facteur VEGF est également impliqué dans la migration cellulaire en médiant la sécrétion et l'activation d'enzymes de dégradation de la matrice extra-cellulaire comme l'activateur de plasminogène ou des métalloprotéinases du collagène interstitiel (Ivy *et al.*, 2009) (Carmeliet, 2005).

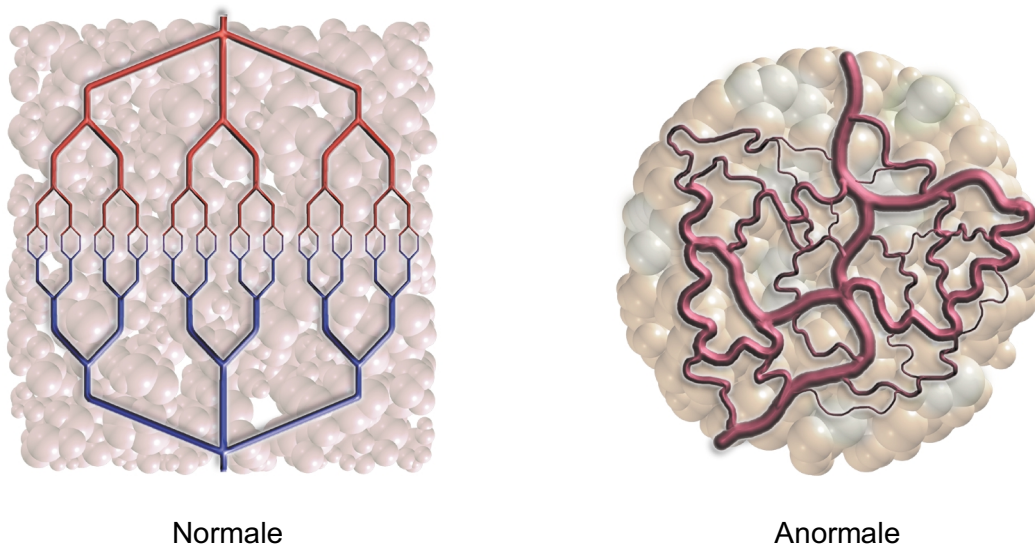
Le facteur VEGF augmente également la perméabilité vasculaire, favorisant ainsi la migration extra-vasculaire de protéines plasmatiques et le développement d'une matrice extracellulaire, tout en faisant varier la pression hydrostatique interstitielle : ce phénomène est favorable dans un contexte de réparation tissulaire où une sortie rapide de macrophages et neutrophiles permet une protection efficace à court terme par une réponse immune innée. Un mauvais équilibre entre VEGF, PlGF, VEGFR-1 et VEGFR-2 est à l'origine d'une angiogenèse inflammatoire incontrôlée qui est retrouvée dans le psoriasis, les arthrites rhumatoïdes, l'athérosclérose, les rétinopathies secondaires à un diabète, les dégénérescences musculaires liées à l'âge et les processus tumoraux (Breen, 2007).

Au cours de son développement, la tumeur passe initialement par un stade de dormance au sein d'une phase avasculaire, où un équilibre entre prolifération cellulaire et apoptose est maintenu. Un switch angiogénique, dû à une altération de l'équilibre entre facteurs inhibiteurs et stimulateurs de la croissance, permet d'initier l'angiogenèse ; le VEGF est le médiateur central de l'angiogenèse tumorale, en permettant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de capillaires déjà existants et en favorisant ainsi l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules tumorales. L'intensité d'expression de VEGF à l'échelle régionale dépend ainsi du degré de nécrose et de densité vasculaire initiale. L'expression de VEGF est ainsi maximale dans les régions présentant une nécrose et une absence de vascularisation, soit dans des régions hypoxiques (Carmeliet, 2005).

Au sein de la tumeur, l'architecture des vaisseaux sanguins néoformés est altérée (Figure 7, (Jain, 2001)) : la vascularisation présente une forme irrégulière, tortueuse et dilatée, avec de nombreux cul-de-sac, une absence d'organisation générale et une perméabilité augmentée. Ceci ne permet pas un apport sanguin homogène entre cellules tumorales, favorisant l'hypoxie cellulaire dans certaines régions et entretenant ainsi les phénomènes locaux d'angiogenèse (Carmeliet, 2005).

Figure 7 - Évolution de l'organisation vasculaire sous l'influence du récepteur au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR) (Jain, 2001).

A gauche, schéma d'un réseau vasculaire correctement formé. A droite, schéma d'un réseau vasculaire dont l'architecture est altérée, comme au sein des tumeurs.

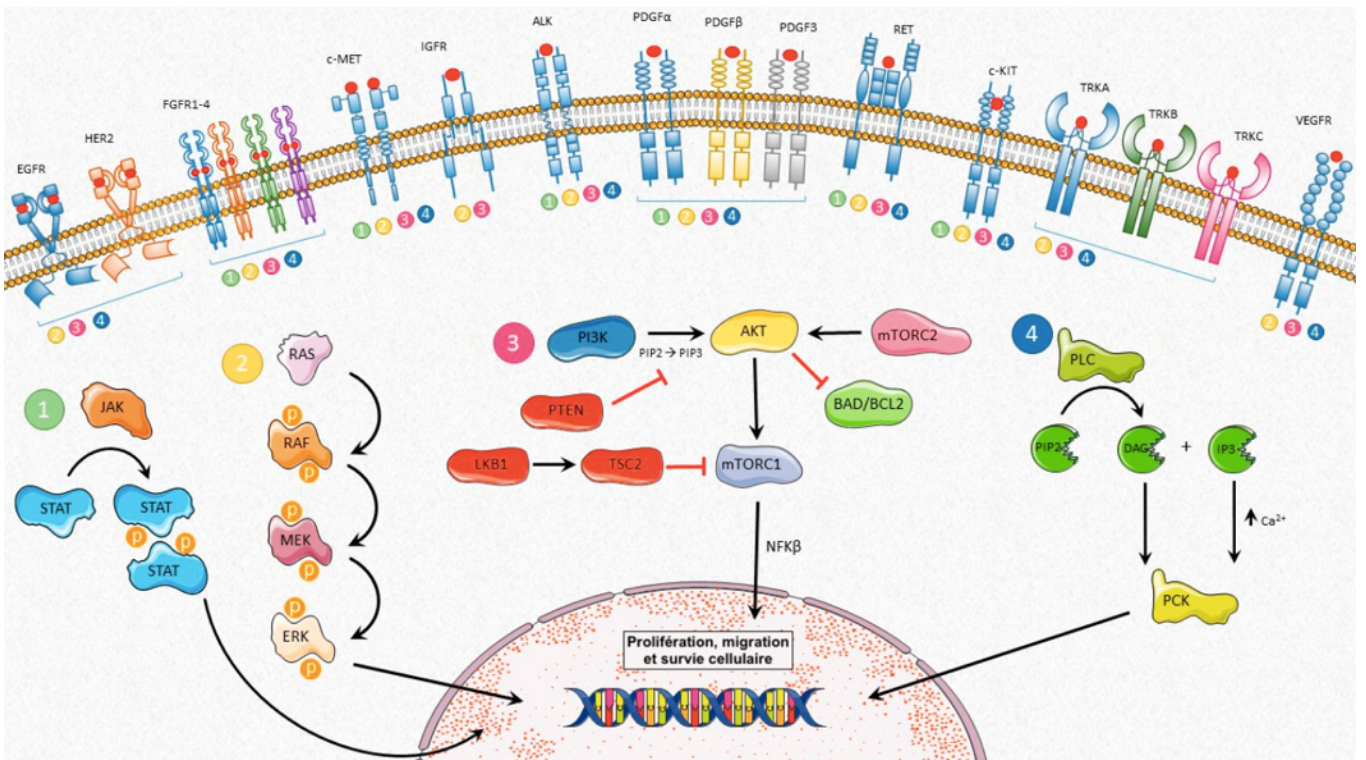


3. Importance thérapeutique des inhibiteurs de VEGFR

A. En médecine humaine

La majorité des ITK agissent par liaison compétitive – réversible ou non – au site de liaison de l'ATP, présent dans le domaine kinase du récepteur. C'est l'étude approfondie de ce site de liaison à l'ATP qui a permis le développement d'inhibiteurs ayant une action restreinte à certaines kinases (Bogoyevitch *et al.*, 2005). Néanmoins, les ITK existant sur le marché n'ont pas une spécificité parfaite et les cascades de signalisation peuvent être communes entre différents récepteurs comme le montre la Figure 8 (Esteban-Villarrubia *et al.*, 2020).

Figure 8 - Cascade de signalisation de différents récepteurs à activité tyrosine kinase (d'après Esteban-Villarrubia *et al.*, 2020)



Au regard des mécanismes d'action connus de VEGF, il a été supposé dans un premier temps que les ITK présentaient une action cytotatique plutôt que cytotoxique, par inhibition de l'angiogenèse locale empêchant l'apport en oxygène et nutriments aux cellules. Cette hypothèse a récemment été remise en cause par des études pré-cliniques et cliniques montrant qu'un blocage de VEGF ou VEGFR-2 était également à l'origine d'effets cytotoxiques sur les vaisseaux sanguins et particulièrement les vaisseaux immatures présentant une absence de cellules de soutien de type péricytes et donc une dépendance accrue à VEGF (Cardones et Banez, 2006).

Trois modalités d'inhibition de VEGF sont actuellement en recherche : les anticorps monoclonaux contre VEGF, des petites molécules inhibitrices de VEGF et des récepteurs solubles de VEGFR (Cardones et Banez, 2006).

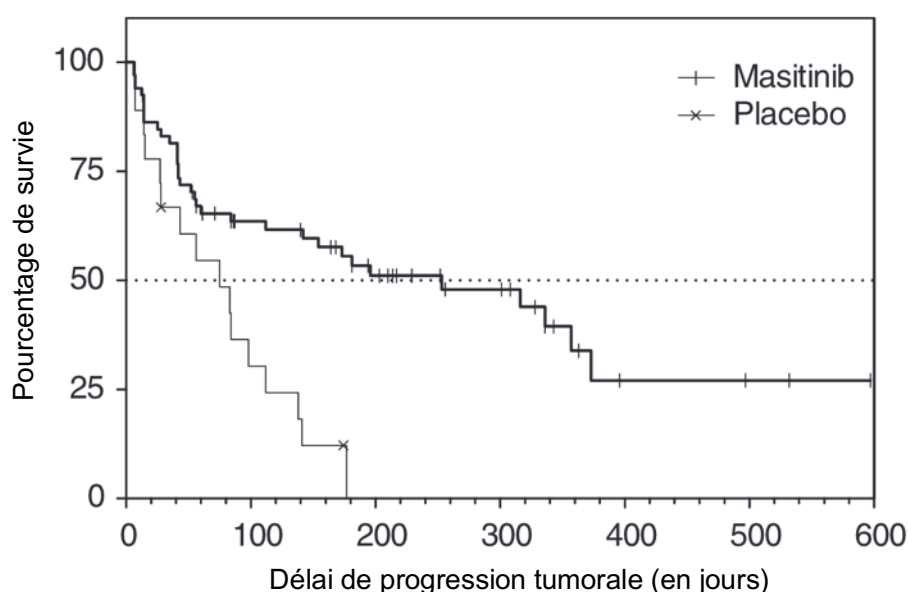
B. En pratique vétérinaire

a. Mastocytomes

Dans l'espèce canine, l'utilisation d'ITK est courante, en particulier dans le traitement des mastocytomes cutanés.

Le masitinib est un inhibiteur de tyrosine kinase sélectif des phénylaminothiazole et ciblant principalement KIT, PDGFR- α/β , *Fibroblast growth factor receptor-3* (FGFR-3), *Lymphocyte-specific kinase* (Lck), *Focal adhesion kinase* (FAK) et *Lck/Yes-related protein* (LYn) (Marech *et al.*, 2014). Arrivé sur le marché en 2008, il est le premier ITK commercialisé dans le traitement des mastocytomes cutanés canins en médecine vétérinaire (European Medicines Agency, 2009a). Il est reconnu par la *European Medicines Agency* (EMA) comme le traitement des mastocytomes cutanés non résécables de grade 2 ou 3 selon l'échelle de Patnaik avec confirmation de la mutation du récepteur tyrosine kinase KIT, à la dose de 12,5 mg/kg par jour par voie orale (Marech *et al.*, 2014). L'efficacité du masitinib a été montrée dans une étude randomisée en double-aveugle avec groupe placebo incluant 202 chiens atteints de mastocytomes cutanés (Figure 9), par une augmentation significative de la durée entre la première prise de l'ITK et les premiers signes de progression tumorale (Hahn *et al.*, 2008).

Figure 9 - Courbes de Kaplan-Meier de délai des premiers signes de progression tumorale suite à la première prise de l'inhibiteur de tyrosine kinases entre les chiens recevant du masitinib comme première ligne thérapeutique et les chiens recevant un placebo (d'après Hahn *et al.*, 2008)



Le tocéranib est un inhibiteur de tyrosine kinase à rôle antitumoral et anti-angiogénique en ciblant principalement KIT, VEGFR et PDGFR (European Medicines Agency, 2009b). Obtenant une autorisation de mise sur le marché en 2009, il est reconnu également par la *European Medicines Agency* (EMA) comme le traitement des mastocytomes cutanés récurrents, non résécables, de grade 2 ou 3 selon Patnaik chez le chien à la dose de 3,25 mg/kg un jour sur deux par voie orale. Néanmoins la dose préférentiellement utilisée en clinique vétérinaire est de 2,7 mg/kg trois fois par jour par voie orale. L'efficacité du tocéranib a été mise en évidence dans une étude randomisée en

double-aveugle avec groupe placebo incluant 153 chiens atteints de mastocytomes cutanés, par une réponse complète ou partielle au traitement et significative par rapport au placebo (London *et al.*, 2009).

b. Autres utilisations chez le chien

L'intérêt de l'utilisation du tocéranib a été discutée chez le chien dans une étude rétrospective sur 85 chiens atteints de divers types de tumeur solide et dans l'objectif de donner une première approche de l'utilisation du tocéranib en oncologie canine. Le tocéranib semble prometteur dans la prise en charge des adénocarcinomes des glandes apocrines des sacs anaux, des ostéosarcomes métastasés, des carcinomes thyroïdiens, des carcinomes épidermoïdes, des adénocarcinomes des glandes cérumineuses et des carcinomes nasaux (London *et al.*, 2012).

Une publication plus récente fait la synthèse de 28 études (18 études rétrospectives, 1 étude prospective et 9 rapports ou séries de cas) ayant utilisé le tocéranib comme agent thérapeutique principal chez des chiens atteints de tumeurs autres qu'un mastocytome (Frezoulis et Harper, 2022). L'état des preuves est limité par le caractère rétrospectif et non randomisé des études publiées sur le sujet et par le nombre souvent limité d'études, dans lesquelles plusieurs types tumoraux sont souvent étudiés.

L'ensemble des informations mentionnées dans les sous-parties suivantes est résumé dans le Tableau 1.

- ***GIST***

En médecine humaine, la chirurgie peut être couplée à un ITK (imatinib ou sunitinib) chez les patients à haut risque métastatique.

Une étude rétrospective sur 3 chiens traités au tocéranib lors de récurrence de tumeur ou lors de métastases met en évidence qu'un seul des trois chiens a présenté une réponse complète (Berger *et al.*, 2018).

Un rapport de cas sur un chien atteint de GIST caecal, métastasé aux nœuds lymphatiques, foie, mésentères et poumons a montré une réponse clinique complète après 9 mois de traitement (Elliott *et al.*, 2017).

- ***Adénocarcinome des sacs anaux (ASAC)***

Deux études rétrospectives incluant au total 61 chiens atteints de ASAC ont montré une réponse partielle chez 20-25% des chiens et une stabilisation de la maladie chez 48-62% des chiens (London *et al.*, 2012) (Heaton *et al.*, 2020).

Une étude rétrospective incluant 15 chiens atteints de ASAC de stade IV a montré que 13 chiens ont présenté une amélioration des signes cliniques mais que chez aucun n'a été observé de réponse complète ou partielle au traitement (Yamazaki *et al.*, 2020).

Une étude incluant au total 15 chiens traités au tocéranib après excision chirurgicale de la tumeur en comparaison à un groupe témoin n'ayant pas reçu de traitement adjuvant à l'excision chirurgicale a montré qu'il n'y avait aucune différence significative de durée de survie sans progression tumorale entre les deux groupes (Elliott, 2019).

Un rapport de cas sur un chien présentant une hypercalcémie secondaire à un ASAC métastasé et traité par du tocéranib et par du clodronate a montré une réponse partielle aux nœuds lymphatiques métastasés suite à la mise en place du traitement, suivie d'une progression tumorale deux mois après le début du traitement (Giuliano *et al.*, 2015).

- **Ostéosarcome métastasé**

L'étude de London *et al.* mentionnée précédemment avait mis en évidence une évolution stable chez 10 des 23 chiens atteints d'ostéosarcomes métastasés traités au tocéranib, soit dans 43% des cas (London *et al.*, 2012).

Trois études plus récentes (une étude prospective et deux études rétrospectives) ont inclus un total de 45 chiens atteints d'ostéosarcomes métastasés et traités au tocéranib. Une stabilisation de la maladie a été observée dans maximum 17,6% des cas (Kim *et al.*, 2017) (Laver *et al.*, 2018) (Parachini-Winter *et al.*, 2019).

- **Tumeurs neuro-endocrines**

Deux études rétrospectives se sont intéressées à l'utilisation du tocéranib comme traitement des chémodectomes, incluant au total 54 chiens atteints.

La première étude incluant 27 chiens a montré une amélioration des signes cliniques dans 90% des cas, avec comme biais l'administration de pré-traitements précédemment au tocéranib chez certains chiens. Le bénéfice clinique (réponse complète, partielle ou maladie stable) était faible avec seulement 10% de réponse partielle (Lew *et al.*, 2019).

La deuxième étude incluant 27 chiens a montré quant à elle un bénéfice clinique de 89% avec une médiane de survie de 478 jours, non significativement différente entre les chiens traités au tocéranib seul et ceux ayant reçu des traitements adjuvants au tocéranib (Coto *et al.*, 2021).

Une étude rétrospective sur 12 chiens atteints d'insulinomes métastasés ou récurrents a été menée avec 7 chiens traités uniquement par soins palliatifs (groupe témoin) et 5 chiens traités par soins palliatifs et l'administration de tocéranib (groupe traité). Cette étude a montré une médiane de survie significativement supérieure dans le groupe traité par rapport au groupe témoin, de respectivement 399 et 67 jours. Des biais de sélection et un manque d'information sur le suivi des animaux étaient néanmoins présents (Alonso-Miguel *et al.*, 2021).

Une série de cas sur 5 chiens atteints de phéochromocytomes inopérables, métastasés et/ou récurrents et traités au tocéranib, a montré un bénéfice clinique chez l'ensemble des chiens, dont 4 présentant une stabilisation de la progression tumorale et 1 chien présentant une réponse partielle (Musser *et al.*, 2018).

Deux études se sont intéressées à l'efficacité du tocéranib comme traitement des carcinomes thyroïdiens.

L'étude de London et al. précédemment mentionnée incluant 15 chiens traités au tocéranib a montré un bénéfice clinique dans 80% des cas, dont 26,7% de réponse partielle et 53,3% de stabilisation de la maladie (London *et al.*, 2012).

Une deuxième étude a inclus 42 chiens, dont 26 traités uniquement au tocéranib (groupe naïf) et 16 chiens ayant reçu des traitements antérieurement à l'administration de tocéranib (groupe pré-traité). Cette étude a montré que 90% des chiens du groupe naïf ont présenté un bénéfice clinique du traitement à base de tocéranib, contre 75% dans le groupe pré-traité (Sheppard-Olivares *et al.*, 2020).

- **Lymphome**

Une étude prospective incluant 5 chiens atteints de lymphomes de haut grade, résistants à la chimiothérapie précédemment réalisée et traités au tocéranib, a montré une réponse clinique chez 3 chiens : réponse partielle chez 2 chiens et maladie stable chez 1 chien. Le faible nombre de chiens inclus et la diversité des types de lymphomes ne permet néanmoins pas de justifier l'utilisation du tocéranib comme traitement des lymphomes résistants à la chimiothérapie (Yamazaki *et al.*, 2017).

- **Carcinomes rénaux**

Une étude rétrospective a été réalisée sur 10 chiens atteints de carcinomes rénaux pris en charge chirurgicalement (groupe témoin) et 8 chiens atteints de carcinomes rénaux dont la chirurgie était couplée à un traitement adjuvant à base de tocéranib (groupe traité). Cette étude a montré une différence significative de la médiane de durée avant progression tumorale, de respectivement 182 jours et 256 jours. Cette étude justifie l'utilisation du tocéranib comme traitement adjuvant pour ce type de tumeur (Yamazaki *et al.*, 2020).

- **Adénocarcinomes**

Une étude rétrospective a étudié l'efficacité du tocéranib dans des adénocarcinomes canins à différentes localisations. Un bénéfice significatif du tocéranib comme traitement adjuvant à la chirurgie comparé à une prise en charge chirurgicale seule, vis-à-vis de la médiane de durée avant progression tumorale a été établi dans les adénocarcinomes pulmonaires et de l'intestin grêle (Yamazaki *et al.*, 2020).

L'utilisation du tocéranib comme traitement anti-cancéreux chez le chien semble prometteuse et en particulier dans les tumeurs ne répondant pas à la chimiothérapie, comme les carcinomes thyroïdiens, les phéochromocytomes ou les ASAC, ou comme traitement adjuvant à la prise en charge chirurgicale recommandée dans certaines tumeurs.

Tableau 1 – Synthèse bibliographique de l'utilisation du tocéranib comme traitement anti-cancéreux chez le chien (d'après Frezoulis et Harper, 2022)

GIST : gastrointestinal stromal tumor ; ASAC : adénocarcinomes des glandes apocrines des sacs anaux ; ITK : inhibiteur de tyrosine kinase.

TYPE DE TUMEUR	ETAT DES PREUVES
GIST	Peu d'évidence sur l'efficacité du tocéranib comme traitement principal des GIST. Néanmoins, compte tenu de l'utilisation d'ITK dans les GIST présentant une mutation de KIT en médecine humaine et de l'identification de mutations de KIT chez le chien, l'utilisation du tocéranib reste une solution d'avenir à explorer dans ce type tumoral.
ASAC	L'efficacité du tocéranib semble limitée à un traitement adjuvant (notamment à l'excision chirurgicale).
Ostéosarcome métastaté	Le tocéranib ne semble pas être un traitement à recommander en cas d'ostéosarcome métastaté.
Tumeurs neuro-endocrines	<ul style="list-style-type: none"> • Le tocéranib peut être un traitement de choix des chémodectomes en absence d'autre option thérapeutique. • L'efficacité du tocéranib dans le traitement des insulinomes métastatés ou récurrents est encore à explorer. • Le tocéranib pourrait être considéré comme une option intéressante dans les phaeochromocytomes. • Les études publiées semblent prometteuses quant à l'efficacité du tocéranib comme traitement des carcinomes thyroïdiens.
Lymphome	Les preuves manquent quant à l'efficacité du tocéranib comme traitement des lymphomes, et en particulier ceux résistants à la chimiothérapie.
Carcinomes rénaux	L'efficacité du tocéranib comme traitement adjuvant à la prise en charge chirurgicale a été démontrée dans une unique étude.
Adénocarcinomes	L'utilisation du tocéranib comme traitement adjuvant à la prise en charge chirurgicale semble prometteuse dans les adénocarcinomes, avec une efficacité démontrée dans les adénocarcinomes pulmonaires et de l'intestin grêle.

c. Utilisations chez le chat

Chez le chat, une étude *in vitro* sur des cellules primaires et de métastases pulmonaires de fibrosarcomes sur des sites d'injection a montré l'efficacité du masitinib sur l'inhibition de la prolifération cellulaire et de l'autophosphorylation de PDGFR suite à la liaison de son ligand (Lawrence *et al.*, 2012). Une autre étude *in vitro* sur lignées cellulaires de fibrosarcomes sur des sites d'injection félins et *in vivo* sur souris nude ayant subi une inoculation de cellules tumorales de fibrosarcome post-injection a montré l'efficacité de l'imatinib à deux échelles : l'imatinib empêche les effets stimulateurs de la prolifération cellulaire par PDGF, en inhibant l'auto-phosphorylation de PDGFR suite à la liaison de son ligand ; l'étude montre également que l'imatinib agit en synergie

avec une chimiothérapie à base de doxorubicine et carboplatine, en supprimant l'effet protecteur de PDGFR sur les cellules tumorales vis-à-vis de ces molécules cytotoxiques (Katayama *et al.*, 2004).

Une étude *in vivo* sur dix-huit chats atteints de fibrosarcomes sur des sites d'injection non résécables ne parvient pourtant pas à montrer une réponse clinique lors de l'utilisation du tocéranib. Aucune autre étude *in vivo* sur une population de chat atteints de fibrosarcome sur site d'injection n'a montré à l'heure actuelle une efficacité thérapeutique d'un ITK (Holtermann *et al.*, 2017).

A ce jour, aucune étude *in vivo* sur le chat n'a évalué l'effet de la monothérapie à base d'ITK sur toute tumeur confondue. L'expression de VEGF a été démontrée dans une étude rétrospective sur 72 chats atteints de carcinomes mammaires : 77,8% des chats inclus ont présenté un immunomarquage positif à VEGF (Chen *et al.*, 2020). Néanmoins, des études sur l'expression de VEGF ou VEGFR dans du tissu tumoral chez le chat manquent actuellement.

Deux études *in vivo* ont montré chez le chat un lien entre la concentration sérique de VEGF et VEGFR solubles et la présence de carcinomes mammaires ou de péritonite infectieuse féline. La première étude prospective sur cinquante chats atteints de carcinomes mammaires montre une corrélation positive entre la concentration sérique de VEGF-A, VEGFR-1 et VEGFR-2 avec la présence d'une forme agressive de carcinome mammaire félin. L'étude démontre ainsi l'intérêt du dosage de ces trois paramètres dans un diagnostic non invasif de carcinome mammaire félin (Nascimento *et al.*, 2021). La deuxième étude montre, chez les chats atteints de la péritonite infectieuse féline, une augmentation plasmatique du facteur VEGF produit par des macrophages et monocytes infectés par le coronavirus, à l'origine d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et favorisant l'apparition d'épanchement (Takano *et al.*, 2011).

d. Utilisation dans les carcinomes nasaux chez le chien

Une étude rétrospective sur 187 chiens atteints de carcinomes nasaux malins cherche à raisonner l'utilisation des inhibiteurs de tyrosine kinase dans la prise en charge de cette tumeur. Cette étude évalue l'expression de VEGFR et PDGFR par immunohistochimie au sein de biopsies nasales de chiens atteints de carcinomes nasaux (majoritairement carcinomes transitionnels, carcinomes épidermoïdes et carcinomes peu différenciés) et montre une expression de VEGFR chez 84% des chiens de l'échantillon, de PDGFR- α dans 71% et de PDGFR- β dans 39% des cas (Gramer *et al.*, 2017).

Une étude rétrospective sur 24 chiens atteints de tumeur épithéliale nasale maligne (11 adénocarcinomes pancréatiques, 6 carcinomes nasaux, 3 carcinomes épidermoïdes et 4 carcinomes transitionnels) montre une expression de VEGF par immunohistochimie dans 91,7% des cas (Shiomitsu *et al.*, 2009).

Ces deux études amènent à justifier l'utilisation d'ITK ciblant VEGF/VEGFR dans la prise en charge des carcinomes nasaux chez le chien.

Deux études plus récentes ont exploré l'efficacité du tocéranib comme traitement des carcinomes nasaux chez le chien.

La première est une étude rétrospective sur 23 chiens atteints de carcinomes nasaux de stade tomodensitométrique III et IV selon le système modifié de Adams et traités au tocéranib. L'absence de groupe témoin dans cette étude ne permet pas de conclure quant à l'efficacité du traitement mais suggère une amélioration clinique subjective transitoire chez la majorité des chiens de l'étude, suivie d'une progression de la maladie. La médiane de survie était de 139 jours. Cette étude préliminaire

se présente comme une première approche de l'utilisation du tocéranib comme traitement des carcinomes nasaux chez le chien (Merino-Gutierrez *et al.*, 2021).

La deuxième est une étude rétrospective sur 63 chiens atteints de carcinomes nasaux par diagnostic histologique et traités soit par radiothérapie externe seule à raison 10 séances de 4,2 Gy, soit par radiothérapie externe et tocéranib, soit par tocéranib seul. L'étude montre un bénéfice clinique significatif de l'association radiothérapie externe et tocéranib par rapport à la radiothérapie externe seule ou par rapport au tocéranib seul. Les médianes de survie ne sont néanmoins pas significativement différentes entre les trois groupes (Ehling *et al.*, 2022).

Ces deux études ne donnent qu'un aperçu de l'intérêt du tocéranib dans le traitement des carcinomes nasaux chez le chien et aucune étude n'a encore permis d'en démontrer l'efficacité.

C. Résistances aux inhibiteurs de tyrosine kinases

Plusieurs études s'intéressant aux GIST humains montrent la présence de mutations principalement gain de fonction de PDGFR α dans environ 30% des GIST sans mutation de KIT, particulièrement dans les formes épithélioïdes ; ces mutations sont localisées dans les domaines régulateurs (extra-cellulaire et juxta-membranaire) et enzymatiques (à activité tyrosine kinase) (Corless *et al.*, 2005) (Heinrich *et al.*, 2003) (Lasota et Miettinen, 2006) (Morini *et al.*, 2022).

Certaines mutations sont à l'origine d'une sensibilité variable à l'imatinib, traitement utilisé sur les GIST cliniquement avancés, non résécables et métastasés ; la substitution D842V située dans la boucle d'activation du domaine extra-cellulaire, est la mutation de PDGFR-A la plus fréquente dans les GIST humains et est associée à une résistance significative à l'imatinib (Corless *et al.*, 2005). Des mutations secondaires à l'initiation d'un traitement à base d'imatinib et principalement de type non-sens, sont associées à une résistance de la tumeur au médicament (Heinrich *et al.*, 2003) (Lasota et Miettinen, 2006).

Des résistances par mutation des cellules tumorales n'ont pas encore été décrites pour VEGFR mais il est néanmoins à considérer l'importance que celles-ci peuvent potentiellement avoir en thérapie ciblée.

En humaine, les études pré-cliniques sur modèle murin ont montré une efficacité satisfaisante des anti-VEGFR comme traitement anti-cancéreux. Les résultats sur l'homme ont été beaucoup plus décevants que ce qui était espéré : le bevacizumab par exemple, un anticorps anti-VEGF-A humanisé, permettrait une augmentation significative de l'espérance de vie de 4 à 5 mois en moyenne chez les patients atteints de cancer du côlon, mais seulement en combinaison avec une triple chimiothérapie (Hurwitz *et al.*, 2004). Des recherches sur la présence de résistances au traitement anti-VEGFR en médecine humaine s'intéressent à la compensation de l'inhibition de VEGF par d'autres facteurs de croissance et cytokines favorisant la croissance vasculaire ou le recrutement de progéniteurs vasculaires et de myélocytes pro-angiogéniques agissant comme facteurs de croissance (Sitohy *et al.*, 2012).

Deuxième partie : Carcinomes nasaux : état des connaissances chez le chat

1. Épidémiologie

Les carcinomes *sensu largo* constituent la deuxième tumeur nasale du chat après les lymphomes. En termes de proportions, les adénocarcinomes sont par ailleurs majoritaires par rapport aux autres types de carcinomes. Selon une étude rétrospective de Henderson *et al.* (2004) sur 77 cas d'affections nasales chez le chat dont 30 cas de tumeurs, les carcinomes touchent des animaux âgés, entre 4 et 19 ans, avec une moyenne entre 10 et 11 ans (Mukaratirwa *et al.*, 2001) (Henderson *et al.*, 2004). Une prédisposition des mâles est discutée dans deux études mais un manque d'analyse statistique empêche l'inférence (Mukaratirwa *et al.*, 2001) (Henderson *et al.*, 2004).

2. Signes cliniques

Les principaux signes cliniques associés à la présence d'une tumeur nasale chez le chat sont des étternuements, un stertor et des signes d'obstruction nasale à l'inspiration, du jetage plus ou moins associé à de l'épistaxis, une dyspnée inspiratoire, une déformation faciale, une enophtalmie ou à l'inverse une exophtalmie et de l'épiphora chronique, chaque signe étant observé dans des proportions variables selon les études. Des crises épileptiformes sont exceptionnellement rapportées lorsque la tumeur s'étend au travers de la lame criblée, associées à des signes moins spécifiques d'anorexie, amaigrissement, léthargie et déshydratation. Même si peu spécifique, il semble qu'une épistaxis soit davantage associée aux tumeurs épithéliales (Mukaratirwa *et al.*, 2001) et il a été montré que les sécrétions nasales unilatérales et hémorragiques sont significativement plus associées à une tumeur nasale par rapport à une rhinite chronique (Henderson *et al.*, 2004). Alors que cela n'avait pas été décrit dans l'étude précédente, l'étude de Tromblee de 2006 montre la spécificité de l'épiphora unilatéral aux tumeurs nasales par rapport aux rhinites chroniques (Tromblee *et al.*, 2006).

D'après l'étude de Henderson *et al.* (2004), les signes cliniques associés à une tumeur apparaissent entre 28 et 540 jours avant présentation en consultation, avec une moyenne de 60 jours.

3. Démarche diagnostique

Les signes cliniques étant relativement similaires, il est souvent difficile de différencier les tumeurs nasales des rhinites chroniques sans la réalisation d'examen complémentaires qui permettront de préciser l'approche thérapeutique et le pronostic.

Les analyses sanguines apportent peu d'intérêt dans le diagnostic des carcinomes nasaux.

A. Cytologie à l'aiguille fine des nœuds lymphatiques régionaux

Associée à la palpation des nœuds lymphatiques régionaux et en particulier des nœuds lymphatiques mandibulaires, la réalisation d'un examen cytologique à la recherche de métastases doit être systématisée, même si une adénopathie n'est pas observée. Une étude de Mukaratirwa de 2001 sur 123 chats présentant une tumeur nasale ou des sinus paranasaux montre que 17% des chats présentent une adénopathie régionale et aucun ne présente de métastase associée (Mukaratirwa *et al.*, 2001) : cela est en faveur d'une adénopathie réactionnelle et non de métastases aux nœuds lymphatiques régionaux.

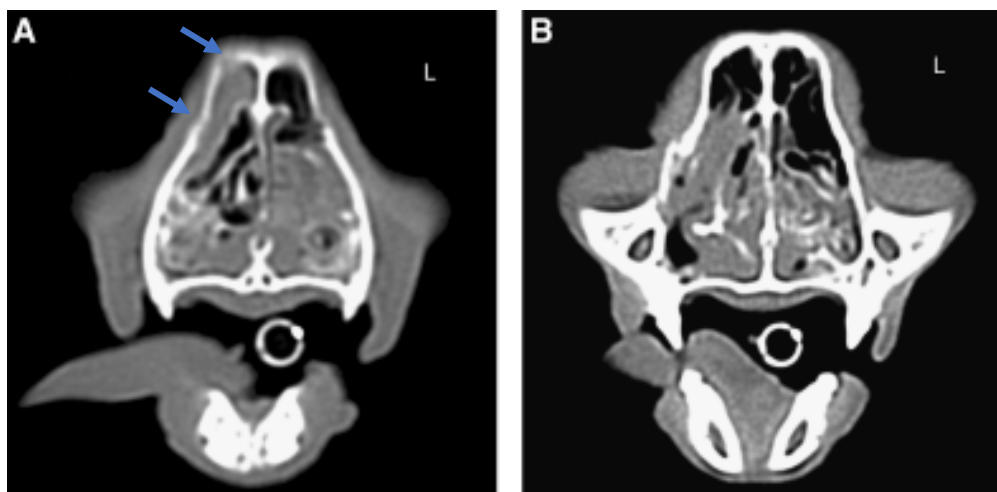
B. Imagerie

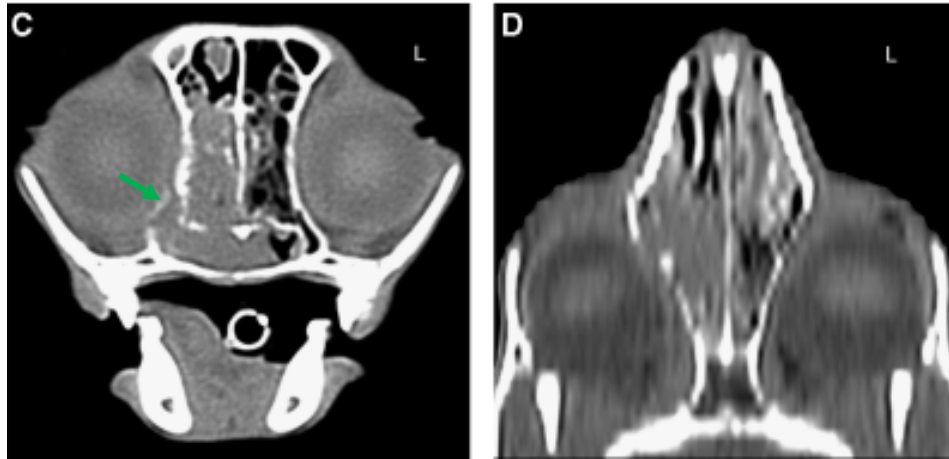
La réalisation de clichés radiographiques des cavités nasales permet d'avoir une première approche des lésions mais du fait de la superposition des structures avec cet examen, la radiographie est aujourd'hui abandonnée au profit d'un examen tomodensitométrique afin de gagner en sensibilité et de délimiter précisément les lésions. Les anomalies radiographiques significativement plus observées dans les cas de tumeurs nasales par rapport aux cas de rhinite chronique sont la destruction des cornets nasaux, des anomalies du septum nasal ainsi que des anomalies des tissus mous, notamment la visualisation de masses (Henderson *et al.*, 2004) (Malinowski, 2006).

À l'examen tomodensitométrique (Figure 10), la présence d'une lyse osseuse paranasale – et plus spécifiquement de l'os maxillaire ventral ou des os maxillaires dorsal et latéral de manière unilatérale –, d'une lyse des cornets de l'ethmoïde ainsi que la présence anormale de tissus mous dans l'espace rétrobulbaire a été rapportée comme associée préférentiellement à un processus tumoral dans plusieurs études (Schoenborn *et al.*, 2003) (Tromblee *et al.*, 2006). Une lyse de l'os vomer ou de la lame orbitaire et une opacification unilatérale des sinus frontaux et sphénoïdes sont également décrites comme significativement en faveur d'un processus tumoral dans l'étude de Tromblee *et al.* (2006).

Figure 10 - Images tomodensitométriques des cavités nasales d'un chat atteint de lymphome nasal (Tromblee et al., 2006).

(A) Accumulation bilatérale et en patch de tissu mou/fluide dans la partie rostrale des cavités nasales avec discrets amincissements dorsal et latéral de l'os maxillaire droite (flèches bleues). (B,C) Accumulation bilatérale de tissu mou/fluide dans la partie ventrale des cavités nasales avec discrète destruction unilatérale des cornets maxillaires et discontinuité de la lamina orbitaire du côté droit (flèche verte). (D) Présence bilatérale de tissu mou/fluide dans les cavités nasales avec destruction des cornets maxillaires.

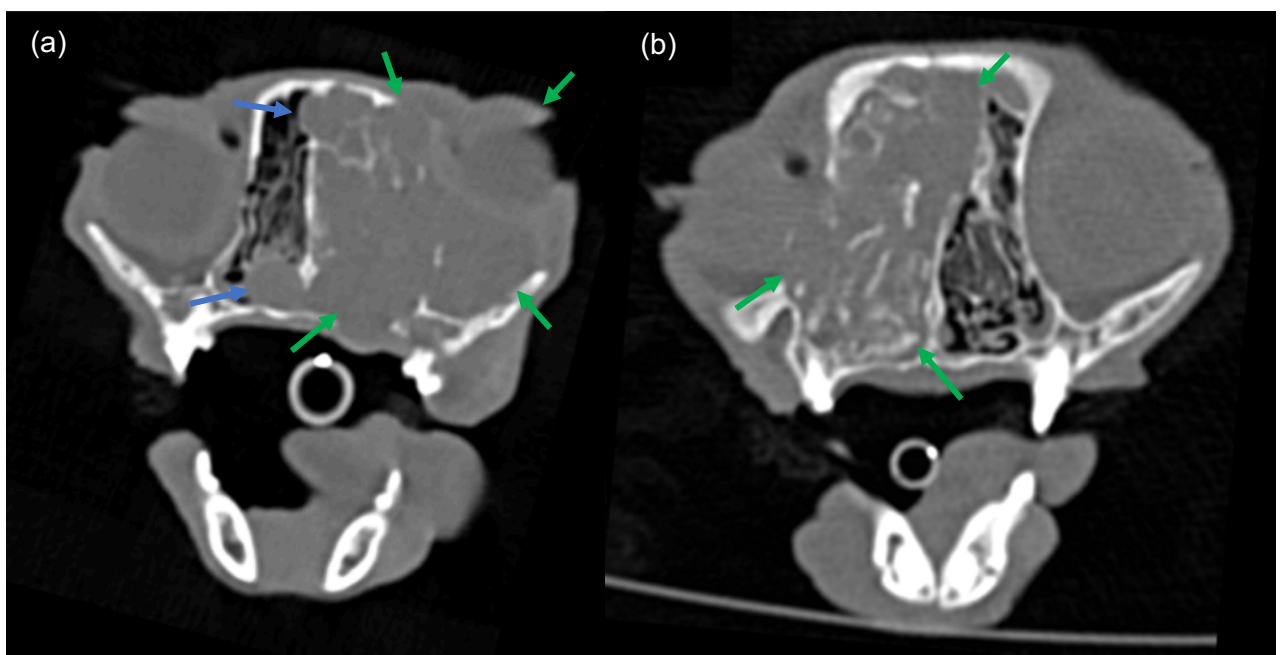




Une étude rétrospective de Bouyssou *et al.* de 2021 sur 35 chats s'est intéressée aux différences à l'examen tomodensitométrique entre lymphome, tumeur nasale non lymphoïde et masse inflammatoire (Bouyssou *et al.*, 2021). Le lymphome était plus favorablement associé à une prolifération extensive et mixte (perméable, extensive et/ou destructive) et une adénopathie régionale. Les tumeurs non lymphoïdes (Figure 11) étaient plus favorablement associées à des altérations unilatérales avec des aires de calcification au sein de la lésion et une extension de la masse dans le sinus frontal. Les processus inflammatoires quant à eux étaient significativement associés à une absence d'atteinte osseuse des cavités nasales.

Figure 11 - Images tomodensitométriques d'adénocarcinomes nasaux chez des chats (Bouyssou *et al.*, 2021)

(a) Images tomodensitométriques en coupe transversale à hauteur de la deuxième prémolaire maxillaire montrant une prolifération destructive : la masse (flèches vertes) induit une destruction quasi-complète des os maxillaire gauche et lacrymal et s'étend à l'orbite gauche. Une extension dorsale et ventrale de la masse au sein de la cavité nasale droite est permise par la destruction de deux septaux nasaux (flèches bleues) (b) Images tomodensitométriques en coupe transversale à hauteur de la deuxième prémolaire maxillaire montrant une masse (flèches vertes) dans la cavité nasale droite, s'étendant modérément dans la région de l'orbite droite et envahissant discrètement la portion dorsale de la cavité nasale gauche.



C. Biopsies nasales

Le diagnostic de confirmation passe par la réalisation de biopsies nasales pour analyse histologique. Malgré la possibilité de réaliser des biopsies via le canal opérateur d'un endoscope dont la pince à endoscopie limite les prélèvements aux couches superficielles de la muqueuse nasale, il est préféré de réaliser des biopsies « à l'aveugle » via notamment une pince à biopsie rigide et plus large afin de gagner en sensibilité. La pince est alors guidée d'après les images tomodensitométriques (Malinowski, 2006). Une étude rétrospective sur 117 chiens présentant une tumeur nasale a néanmoins montré qu'un diagnostic de tumeur sur biopsies (toute technique confondue) n'a été obtenu que dans 56% des cas. La technique de prélèvement n'avait pas d'impact sur les proportions de biopsie diagnostique (Harris *et al.*, 2014). Cette étude donne un aperçu des limites de sensibilité que la biopsie nasale peut présenter.

Une étude de 2007 est réalisée sur 30 chats présentant une masse nasopharyngée à l'endoscopie ; cette étude cherche à montrer l'intérêt d'un examen cytologique sur calque de biopsie en comparaison avec un examen histologique afin de différencier un processus inflammatoire d'une tumeur (distinguant lymphome, carcinome et sarcome) (De Lorenzi *et al.*, 2008). Une corrélation positive entre les examens cytologiques et histologiques est décrite dans 90% des cas, avec une sensibilité de 94%, une spécificité de 81%, une valeur prédictive positive de 90% et une valeur prédictive négative de 90%. L'examen cytologique sur calque de biopsie peut donc apporter une réponse fiable, plus précoce aux biopsies réalisées, même si l'examen histologique reste l'examen de choix dans le diagnostic d'une masse nasale.

L'immunohistochimie sur biopsies nasales a montré son intérêt, notamment pour spécifier le type tumoral. Une étude rétrospective sur 114 biopsies nasales de chat sur lesquelles est réalisé un examen immunohistochimique de marqueurs épithéliaux et lymphoïdes a été réalisée. Le taux d'erreur total était de 8,6%. Sur les 15 cas suscitant un doute de diagnostic entre deux anatomopathologistes, cette étude a montré que le diagnostic histologique initial était incorrect (soit modifié par les deux anatomopathologistes) dans 67% des cas et correct (validé par les deux anatomopathologistes) dans 20% des cas. Cette étude met ainsi en exergue la plus-value du diagnostic immunohistochimique en comparaison à un diagnostic histologique, en particulier lorsque ce dernier est douteux (Nagata *et al.*, 2014).

4. Prise en charge thérapeutique

A. Thérapies actuelles

Peu d'études explorent l'efficacité comparée de la rhinotomie, la chimiothérapie et de l'immunothérapie, seules ou en association ; sur les quelques études publiées, le faible nombre de cas inclus ne permet pas l'inférence. La radiothérapie externe est néanmoins le traitement actuellement recommandé par les ouvrages de référence, dans la gestion des carcinomes nasaux chez le chat.

Trois études publiées entre 1994 et 2014 ont évalué l'efficacité de la radiothérapie externe comme traitement de tumeurs nasales *sensu largo* ou de tumeurs nasales non-lymphoprolifératives, comme décrites dans le Tableau 2 (Théon *et al.*, 1994) (Mellanby *et al.*, 2002) (Fujiwara-Igarashi *et al.*, 2014). La médiane de survie observée est d'environ un an. Les médianes de survie à 1 et 2 ans

post-traitement sont relativement variables entre les études. Ces études restent néanmoins difficilement comparables au vu de la variabilité des protocoles et du matériel de radiothérapie utilisés, des cohortes de patients incluses et de la variabilité des prises en charge suite à l'évolution post-irradiation.

Une étude plus récente de Stiborova *et al.* (2020) incluant 27 chats provenant de trois universités différentes (Suisse, Etats-Unis et Canada) atteints de carcinome sino-nasal et traités par radiothérapie externe basée sur un protocole curatif (10 fractions de 4,2 Gy) a apporté de nouveaux éléments de réponse (Stiborova *et al.*, 2020). La médiane de survie, en considérant toutes les causes de mortalité, était comparable voire discrètement supérieure aux études précédemment décrites, soit 452 jours (IC 95% = [334 ;571] jours). Une mort secondaire à la tumeur était rapportée dans 71,5% des cas (versus 23,8% de mort sans lien avec la tumeur) et le suivi des animaux post-traitement laissait suspecter une progression locale de la tumeur dans 85,2% voire une progression aux nœuds lymphatiques régionaux dans 7,4% des cas, soulignant l'importance des récurrences tumorales dans une thérapie à base de radiothérapie externe. En lien avec cela, l'amélioration des signes cliniques a été rapportée par une réponse complète dans 11,1% des cas, une réponse partielle dans 63% des cas et une maladie stable dans 11,1% des cas. Un contrôle par scanner ou IRM a été réalisé chez 17 chats, montrant une réponse partielle chez 4 chats et des lésions stables chez 6 chats. Les pourcentages de survie à 1 et 2 ans étaient de respectivement 57% (IC 95% = [37 ;77]%) et 27% (IC 95% = [25 ;29]%).

Trois études plus récentes sont venues conforter les résultats de l'étude précédemment décrite. La médiane de survie variait selon les études entre 342 et 591 jours et une amélioration des signes cliniques était notée dans 85 à 92% des cas. Les résultats de ces trois études viennent apporter de nouvelles preuves de l'intérêt de la radiothérapie externe comme traitement des carcinomes nasaux chez le chat (Giuliano et Dobson, 2020) (Yoshikawa *et al.*, 2021) (Frezoulis *et al.*, 2022).

La radiothérapie externe est donc l'indication première dans la gestion des carcinomes nasaux chez le chat mais reste une technique peu ciblée aux cellules tumorales, lourde en temps, en coût et en effets secondaires et peu accessible sur le territoire français.

Tableau 2 - Synthèse des études publiées sur l'efficacité de la radiothérapie externe dans la gestion des tumeurs nasales chez le chat.

REFERENCES DE L'ETUDE	Type de tumeur	Médiane de survie (IC 95%)	Survie post-traitement (IC 95%)	Médiane de non progression (IC 95%)	Réponse clinique
Theon et al. (1994) 16 chats dont 13 traités par radiothérapie mégavoltage et 3 par radiothérapie orthovoltage (28 séances de 4 Gy)	Tumeurs nasales non lympho-prolifératives	11,5 mois (NR) (345 jours)	<ul style="list-style-type: none"> Après 1 an : 44,3% ([29,4 ;59,2]) Après 2 ans : 16,7 ([12,8 ;20,6]) 	10,8 mois	NR
Mellanby et al. (2002) 8 chats traités par radiothérapie mégavoltage (6 séances de 6 Gy ou 4 séances de 8 Gy)	Tumeurs nasales non lympho-prolifératives	382 jours (NR)	<ul style="list-style-type: none"> Après 1 an : 62,5% (NR) 	NR	NR
Fujiwara-Igarashi et al. (2014) 65 chats traités par radiothérapie hypofractionnée palliative (2-6 séances de 6,0-8,1 Gy)	Tumeurs nasales (lympho-prolifératives ou non)	432 jours ([204 ;714]) dont tumeurs non lympho-prolifératives : 450 ([205 ;714])	<ul style="list-style-type: none"> Après 1 an : 54,2% (NR) Après 2 ans : 33,4% (NR) 	229 jours	<ul style="list-style-type: none"> Amélioration clinique : 83,3% Suivi scanner sur 19 chats : réponses complète (3/19) et partielle (13/19)
Stiborova et al. (2020) 27 chats traités par protocole curatif de radiothérapie (10 séances de 4,2 Gy)	Carcinomes nasaux	452 jours ([334 ;571])	<ul style="list-style-type: none"> Après 1 an : 57% ([37 ;77]) Après 2 ans : 27% ([25 ;29]) 	9 mois	<ul style="list-style-type: none"> Amélioration clinique : 74,1% Suivi scanner sur 17 chats : réponse partielle (4/17), lésions stables (6/17)
Giuliano et Dobson (2020) 26 chats traités par radiothérapie fractionnée (dose totale de 34 Gy en 4 ou 6 séances)	Carcinomes nasaux	342 jours (NR)	NR	NR	Amélioration clinique : 92%
Yoshikawa et al. (2021) 42 chats traités par radiothérapie externe (protocoles très variables)	Carcinomes nasaux	591 jours ([315 ;867])	<ul style="list-style-type: none"> Après 1 an : 60,1% Après 2 ans : 29,0% 	459 jours ([292 ;626])	Amélioration clinique : 91,8% (sur 37 chats suivis cliniquement)
Frezoulis et al. (2022) 7 chats traités par radiothérapie hypofractionnée cyclique (cycle de 4 séances de 4 Gy répété 2 fois, dose totale de 48 Gy)	Carcinomes nasaux de stades avancés	460 jours	<ul style="list-style-type: none"> Après 1 an : 80% Après 2 ans : 0% 	NR	<ul style="list-style-type: none"> Amélioration clinique : 6/7 chats Amélioration ou stabilisation de la progression tumorale au scanner : 4/5 chats

* NR : non renseigné

B. Perspectives thérapeutiques

Les études manquent quant à l'efficacité d'un traitement à base d'ITK dans les tumeurs nasales chez le chat et sur les options thérapeutiques d'avenir. Quelques études se sont intéressées aux perspectives thérapeutiques dans le cas de tumeurs nasales chez le chien et sont détaillées ci-dessous.

Une étude de London *et al.* de 2012 propose une première vision quant à l'intérêt de l'utilisation d'un traitement ciblé, ici le tocéranib de nom déposé Palladia ND, dans différentes tumeurs solides (London *et al.*, 2012). Elle s'intéresse notamment à une cohorte de sept chiens diagnostiqués par examens cytologique ou histologique pour des carcinomes nasaux et observe un pourcentage d'amélioration clinique de 71,4% après mis en place du traitement. Cette étude comporte de nombreux biais (historique des traitements, diversité des protocoles) et n'a pas vocation à l'inférence, mais apporte une piste de développement dans le domaine des traitements anti-cancéreux. Les perspectives sont prometteuses notamment dans des tumeurs comme les carcinomes nasaux où les options thérapeutiques sont limitées parfois à la seule radiothérapie externe et alors que l'efficacité du tocéranib dans différentes tumeurs a été démontrée chez le chien, comme mentionné dans la sous-partie précédente.

En médecine humaine où la prévalence des carcinomes est forte dans les tumeurs nasopharyngées, l'immunothérapie est une option thérapeutique à grand potentiel, notamment en cas de métastases ou de récurrence suite au traitement de chimio-radiothérapie mis en place (Wang *et al.*, 2022). En restaurant les réponses immunitaires inhibées par la tumeur, l'immunothérapie permet au système immunitaire de l'individu de reconnaître et détruire les cellules tumorales spécifiquement. Les recherches en médecine humaine sont d'actualité et pourraient se généraliser à l'avenir à la médecine vétérinaire.

La photothérapie dynamique a également été décrite dans une série de cas comprenant trois chiens et un chat atteints de tumeurs nasales. Cette étude a montré une amélioration des signes cliniques à court terme dès 72 heures après le traitement chez les quatre animaux, alors que la réponse à long terme était comparable à celle de la radiothérapie externe chez deux animaux (Lucroy *et al.*, 2003). Cette étude offre une perspective de l'utilisation de la photothérapie dynamique comme nouvelle option thérapeutique des tumeurs nasales chez le chien et le chat.

Troisième partie – Étude expérimentale : expression de VEGFR-2 dans les carcinomes nasaux chez le chat

1. Introduction et objectifs

La synthèse bibliographique des deux premières parties met en évidence le rôle clé de VEGF dans les processus d'angiogenèse et notamment dans la néovascularisation tumorale.

L'expression de VEGF a été démontrée dans de nombreux types tumoraux chez le chien et en particulier dans les carcinomes nasaux. L'utilisation de molécules anti-VEGFR, comme le tocéranib, semble prometteuse dans la prise en charge des carcinomes nasaux chez le chien.

Chez le chat, l'utilisation de marqueurs immunohistochimiques ciblant VEGFR n'a pas été décrite et les études sur l'évaluation de l'expression de VEGFR dans les carcinomes nasaux manquent. C'est en ce sens qu'il a été choisi de mener une étude rétrospective sur l'isoforme majoritairement impliquée dans l'angiogenèse, VEGFR-2, dans les carcinomes nasaux chez le chat.

L'objectif premier de cette étude rétrospective était de mettre au point un protocole d'immunohistochimie sur du tissu de chat à partir de marqueurs anti-VEGFR-2. Le second objectif est d'évaluer semi-quantitativement l'expression de VEGFR-2 et qualitativement sa distribution cellulaire dans les carcinomes nasaux chez le chat.

2. Matériels et méthodes

A. Caractéristiques de l'échantillon

Les chats reçus au Centre hospitalier universitaire vétérinaire d'Alfort (ChuvA, Maisons-Alfort) entre 2007 et 2022 et atteints de carcinome et adénocarcinome nasaux diagnostiqués par examen histologique ont constitué la population d'étude. Ont été exclus les chats ayant reçu une chimiothérapie ou un traitement à base d'ITK précédemment à la réalisation des biopsies nasales.

Les dossiers médicaux disponibles sur le logiciel Clovis® utilisé par le ChuvA ont été consultés. L'identification des patients a été réalisée selon le numéro de dossier utilisé par le ChuvA.

Les données collectées comprenaient le signalement (âge, race, sexe), l'anamnèse (signes cliniques, durée des signes cliniques et traitements mis en place), les signes cliniques à l'examen par le clinicien responsable (écoulements nasal et oculaire, leur latéralité et leur aspect, étternuements, dyspnée, toux, stridor, stertor, *reverse sneezing*, dysphagie, épistaxis et sa latéralité, anorexie/dysorexie, abattement et hyperthermie).

Ont également été repris les résultats d'examens complémentaires sanguins (biochimie, hémogramme, ionogramme et mesure de T4), tomodensitométrie (latéralité, symétrie, lyse osseuse ou cartilagineuse, sécrétions, effets de masse, atteintes sinusales et leur latéralité, atteintes des nœuds lymphatiques régionaux, atteinte oculaire ou auriculaire), rhinoscopique (latéralité, lyse, friabilité de la muqueuse, obstruction des choanes, sécrétions et leur aspect, sténose) et le résultat

du bilan d'extension (présence de métastases et localisation). Les intervalles de référence des paramètres sanguins utilisés ont été fournis par le laboratoire ayant réalisé les analyses (Biopôle de l'EnvA). Les interprétations des examens complémentaires d'imagerie ont été élaborées par des spécialistes ECVDI pour les examens tomodensitométriques et les radiographies de bilan d'extension et par des spécialistes ECVIM ou résidents éligibles pour la rhinoscopie et la réalisation des biopsies. L'interprétation des cytologies des nœuds lymphatiques a été réalisée par le service d'anatomo-pathologie du Biopôle de l'EnvA.

Le diagnostic de confirmation a consisté en un examen histologique sur prélèvements de biopsies nasales de chat à la pince à biopsie rigide, fixées au formol 10% puis incluses peu de temps après la fixation dans un bloc de paraffine et coupés sur lame avec coloration à l'hématoxyline-éosine-safran. La lecture des lames (diagnostic, index mitotique et emboles) a été réalisée par un anatomo-pathologiste du Biopôle de l'EnvA.

Un groupe témoin était constitué de cinq chats sains (absence d'atteinte nasale et mort secondaire à une affection n'affectant pas les voies respiratoires hautes) sur lesquels des biopsies nasales en phase post-mortem immédiate ont été réalisées par N. Diop, ancien élève de l'EnvA. Le traitement des prélèvements était le même que décrit dans le paragraphe précédent et une lecture des lames par un anatomo-pathologiste du Biopôle de l'EnvA a permis d'exclure la présence de processus tumoral.

B. Évaluation immunohistochimique de l'expression de VEGFR-2

a. Réactifs d'immunohistochimie

Pour la réalisation du marquage immunohistochimique, a été choisi comme anticorps primaire un anticorps polyclonal anti-VEGFR-2 de lapin commercialisé par Abcam® et référencé *ab2349* validé chez le chien, l'homme et la souris (ABCAM, 2021). Il n'existe en réalité aucun anticorps anti-VEGFR-2 commercialisé dont la réactivité chez le chat a été décrite dans la littérature. Le choix de l'anticorps s'est donc fondé sur l'homologie des séquences VEGFR-2 entre l'espèce cible et le chat, la nécessité d'utiliser des anticorps adaptés à des blocs de paraffine ainsi que la facilité d'accès du produit commercialisé.

La comparaison entre les séquences VEGFR-2 (autrement appelé KDR) montrent une homologie de 93,22% entre le l'homme et le chat (référence de séquences homme / chat : P35968 / M3WBW2), de 96,90% entre le chien et le chat (référence de séquences chien : Q2XPT7) et de 86,52% entre la souris et le chat (référence de séquences souris : P35918) (UNIPROT, s. d.). La proximité d'homologie des séquences de VEGFR-2 justifie l'utilisation de l'anticorps *ab2349* dans cette étude, en l'absence d'anticorps anti-VEGFR-2 disponible validé chez le chat.

b. Technique d'immunohistochimie

Des coupes de 5 µm à partir des blocs de paraffine précédemment utilisés pour le diagnostic histologique ont été réalisées par une ingénieure du Biopôle de l'ENVA et ont permis d'obtenir les lames utilisées pour le marquage immunohistochimique. L'ensemble des étapes décrites ci-après ont été réalisées par l'automate *Discovery XT* de la marque Ventana®. Le protocole choisi était basé sur celui proposé par Abcam® pour l'anticorps *ab2349* choisi.

Les lames ont subi un déparaffinage et une réhydratation. Un démasquage de l'antigène était réalisé par incubation dans une solution de citrate à pH 6 pendant 36 minutes. L'anticorps primaire dilué à 1 :100 était incubé pendant 60 minutes à température ambiante. L'anticorps secondaire était incubé pendant 16 minutes avant de réaliser une contre-coloration à l'hématoxyline sur 4 minutes suivie d'un traitement post-coloration au *bluing reagent* pendant 4 minutes.

c. Témoins positifs

Des témoins positifs correspondaient à du tissu de granulation de chien et de chat. Ce choix s'est basé premièrement sur une étude sur les carcinomes à cellules transitionnelles canins, utilisant un anticorps anti-VEGFR2 de lapin différent de celui utilisé dans notre expérimentation et dont le témoin positif était du tissu de granulation d'hémangiosarcome cutané (Walters *et al.*, 2018). Par ailleurs, la fixation de l'anticorps *ab2349* utilisé dans cette expérimentation, a été validée en 2015 sur du tissu de granulation de chien par le vétérinaire pathologiste Francisco Fernandez Flores sur le site de abcam (ABCAM, 2021).

Aucune étude n'a montré l'expression de VEGFR-2 dans du tissu de granulation de chat ; néanmoins, compte tenu des processus de néovascularisation décrits dans le développement d'un tissu de granulation et de l'expression de VEGFR-2 dans le tissu de granulation de chien, nous étions confiants dans la possibilité que du tissu de granulation félin exprime le récepteur VEGFR-2.

d. Méthode d'évaluation qualitative et semi-quantitative de l'expression de VEGFR-2

Il a été choisi d'évaluer l'expression de VEGFR-2 par une méthode de scoring semi-quantitative appelée *immunoreactivity score* (IRS) utilisée dans plusieurs études (Kabak *et al.*, 2020) (Liu *et al.*, 2014). Le pourcentage de cellules marquées était enregistré sur dix champs présentant un marquage, au grossissement x 400 ; en parallèle, un score qualitatif d'intensité du marquage était déterminé pour chaque champ, selon une échelle allant de 0 pour une absence de marquage à 3 pour un marquage intense. Le score IRS est obtenu en multipliant le pourcentage moyen de cellules marquées par l'intensité moyenne des cellules marquées comme précédemment décrite ; le score s'échelonnait ainsi de 0 à 300.

En parallèle, était déterminée la distribution préférentielle du marquage dans la cellule selon trois localisations : nucléaire, cytoplasmique et membranaire.

La détermination de l'IRS et l'évaluation de la distribution cellulaire du marquage était réalisée par deux personnes à l'aveugle, soit sans distinction entre les lames des chats malades et témoins : le premier était moi-même, étudiant vétérinaire de dernière année et le deuxième était un anatomo-pathologiste spécialiste EBVS en pathologie vétérinaire du service d'anatomo-pathologie du Biopôle de l'EnvA.

3. Résultats

A. Caractéristiques de l'échantillon

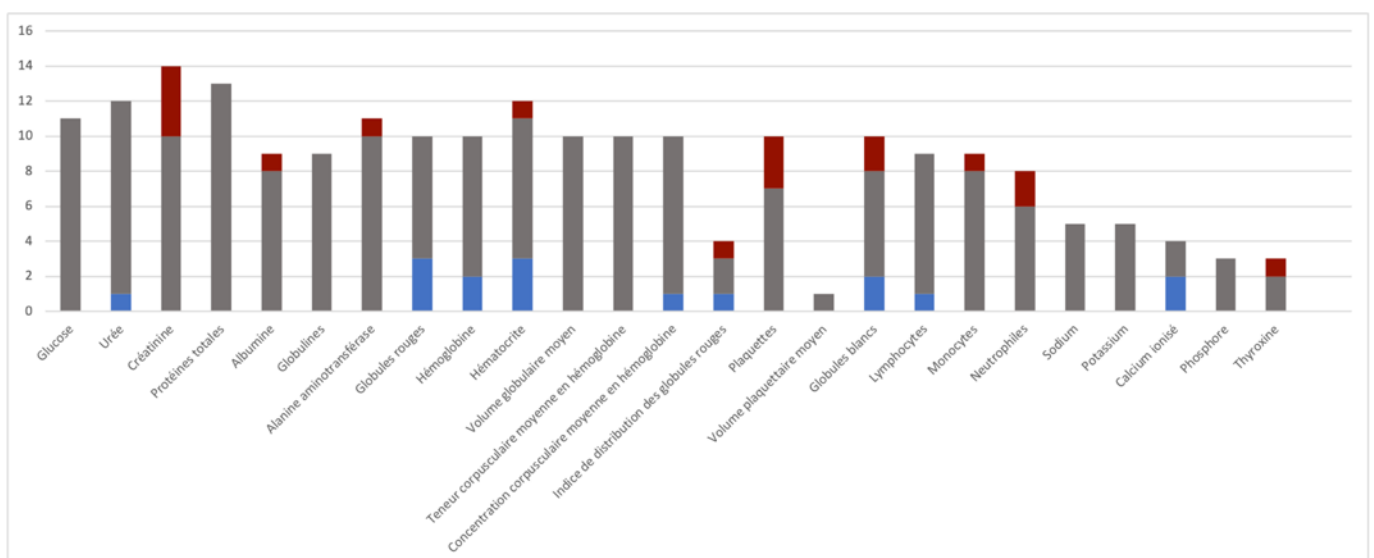
Dix-neuf chats ont été recrutés dans cette étude : dix-huit ont été inclus et un chat ayant reçu une chimiothérapie précédemment à la réalisation des biopsies a été exclu. L'étude a inclus ainsi 9 chats mâles dont 8 castrés et 9 chats femelles dont 7 stérilisés. La race européenne était majoritaire (n=14) ; l'âge variait de 5,5 à 23 ans avec une moyenne à 14 ans ; le poids variait de 2,2 à 7,5 kg avec une moyenne à 4,3 kg. Le détail de signalement est disponible en Annexe 1.

Dans cet échantillon, l'âge au moment de la déclaration des signes cliniques était en moyenne de 13,6 ans et leur durée avant présentation en consultation était en moyenne de 3,6 mois. La présentation clinique majoritaire était un jetage (n=13 ; 72,2%), préférentiellement unilatéral (n=10 ; 55,6%) et d'aspect macroscopique variable, des étternuements (n=12 ; 66,7%), une dyspnée (n=10 ; 55,6%) et une épistaxis (n=10 ; 55,6%) qui semblerait préférentiellement unilatérale – les données étant manquantes pour quatre des dix chats présentant une épistaxis (Annexe 2).

Les analyses sanguines ont révélé une augmentation discrète à modérée de la concentration plasmatique en créatinine sur 4 des 11 chats testés. Une anémie discrète à modérée normocytaire normochrome était présente chez 2 des 10 testés et une thrombocytose chez 3 des 10 chats testés. Une leucopénie était observée chez 2 des 10 chats testés et une leucocytose chez 2 des 10 chats testés, neutrophilique chez 1 chat. Une hypocalcémie ionisée a été identifiée chez 2 des 4 chats testés. Une hyperthyroxinémie était présente chez 1 des 3 chats testés (Annexe 3).

Figure 12 - Modification des paramètres sanguins parmi les chats inclus dans l'étude ayant eu des analyses sanguines (source : Biopôle de l'EnvA)

Nombre de chats ayant, pour chaque paramètre mesuré, un résultat dans l'intervalle de référence de l'espèce (colonne grise), un résultat supérieur à la valeur supérieure de l'intervalle de référence (colonne rouge) ou un résultat inférieur à la valeur inférieure de l'intervalle de référence (colonne bleue).



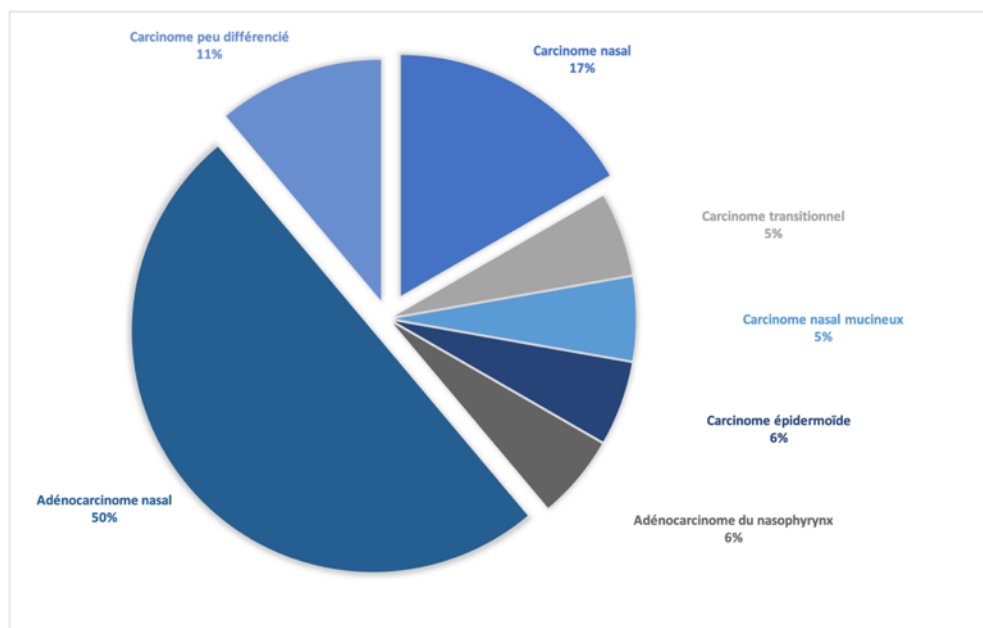
Un examen tomodensitométrique a été réalisé sur treize chats. L'atteinte était unilatérale (n=7 ; 53,8%) ou bilatérale (n=6 ; 46,2%) et l'ensemble des lésions bilatérales était asymétrique. Les lésions majoritairement observées étaient une lyse osseuse (n=9 ; 69,2%), une extension aux sinus (n=11 ; 84,6%), la présence de sécrétions dans les cavités nasales (n=7 ; 53,8%) et une atteinte des nœuds lymphatiques régionaux (n=7 ; 53,8%) (Annexe 4).

Une rhinoscopie a été réalisée sur neuf chats. L'atteinte était unilatérale (n=5 ; 55,6%) ou bilatérale (n=4 ; 44,4%). Les lésions majoritairement observées étaient la présence d'une sténose des cavités nasales (n=7 ; 77,8%) et une obstruction des choanes (n=5 ; 55,6%) (Annexe 5).

Au bilan d'extension, des métastases ont été mises en évidence chez 4 des 16 chats dont le bilan a été réalisé, dont 1 chat présentant des métastases pulmonaires et 3 chats au nœuds lymphatiques loco-régionaux (mandibulaire et pré-scapulaire) (Annexe 6).

Un examen histologique était réalisé sur les dix-huit chats inclus dans l'étude. Les lames sur biopsies nasales mettaient en évidence 9 adénocarcinomes nasaux, 3 carcinomes nasaux et 2 carcinomes peu différenciés. Les autres types tumoraux comprenaient 1 carcinome transitionnel, 1 carcinome nasal mucineux, 1 carcinome épidermoïde et 1 adénocarcinome du nasopharynx.

Figure 13 - Répartition des types de tumeurs des chats inclus dans l'étude selon les résultats de l'examen histologique (source Biopôle de l'EnvA)

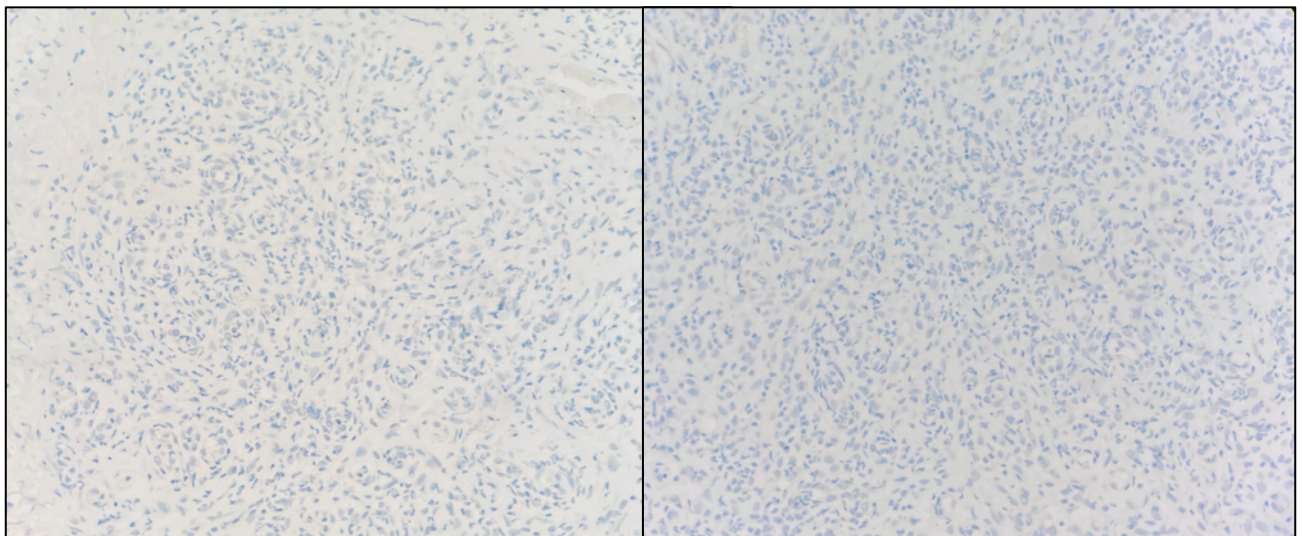


B. Évaluation immunohistochimique de l'expression de VEGFR-2

a. Mise au point du protocole d'immunohistochimie

La réalisation d'immunohistochimie sur tissu de granulation de chien et chat comme décrite précédemment ne mettait en évidence aucun marquage. L'expérience était réalisée une deuxième fois avec le même protocole en incluant les tissus de granulation initialement testés et de nouveaux tissus de granulation de la biobanque du biopôle de l'EnvA, ce qui ne permettait pas d'obtenir un marquage (Figure 14).

Figure 14 - Coupes immunohistochimiques au microscope (grossissement x 200) de tissus de granulation de chat (à gauche) et de chien (à droite) selon le protocole initialement établi



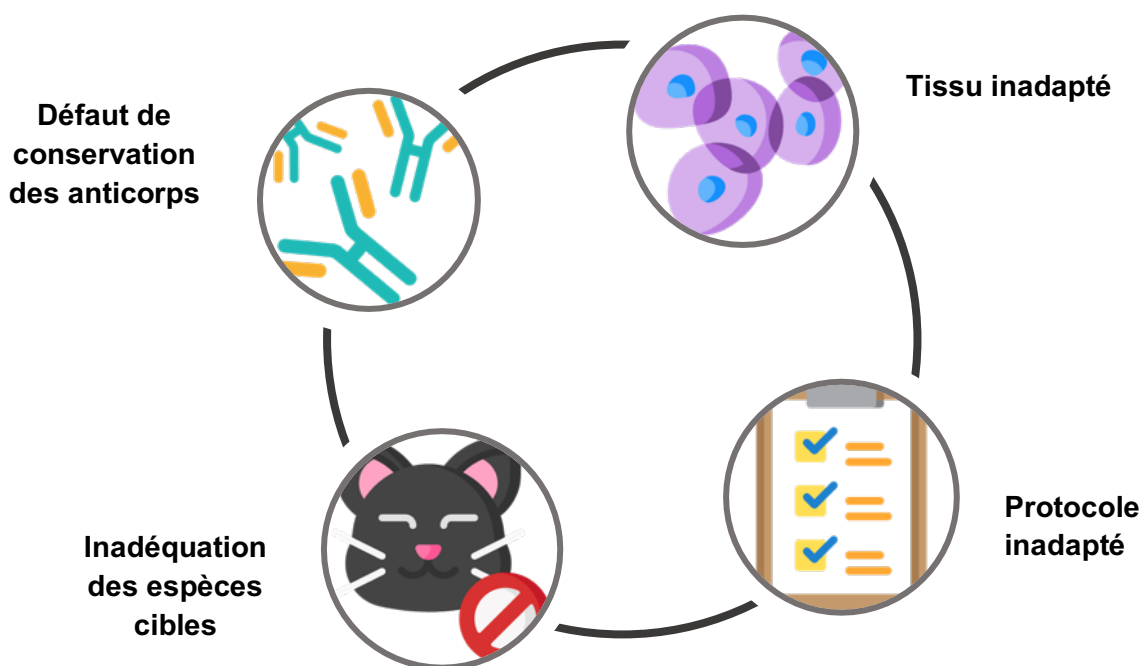
b. Hypothèses

Abcam assurant une réactivité de son anticorps chez le chien, les témoins positifs utilisant du tissu de chien devaient en théorie marquer pour l'anticorps choisi.

Une remise en question de l'ensemble de la procédure était alors initiée afin d'optimiser les changements de protocole expérimental. L'origine d'une absence de marquage peut être vue selon quatre angles, listés ci-dessous (Figure 15).

- L'anticorps a subi des dégradations lors de la conservation ou son transport.
- Le tissu choisi comme témoin positif n'exprimait pas ou alors de manière insuffisante le récepteur VEGFR-2.
- Le protocole proposé par abcam® ne permettait pas le marquage du récepteur VEGFR-2.
- L'anticorps choisi n'était pas adapté au marquage de VEGFR-2 chez le chien et le chat.

Figure 15 - Angles de discussion pour expliquer l'absence de marquage des témoins positifs



Une vérification des conditions de transport et de stockage auprès de abcam® et du biopôle permettait d'exclure un possible défaut de dégradation de l'anticorps depuis son envoi jusqu'à son utilisation pour les manipulations.

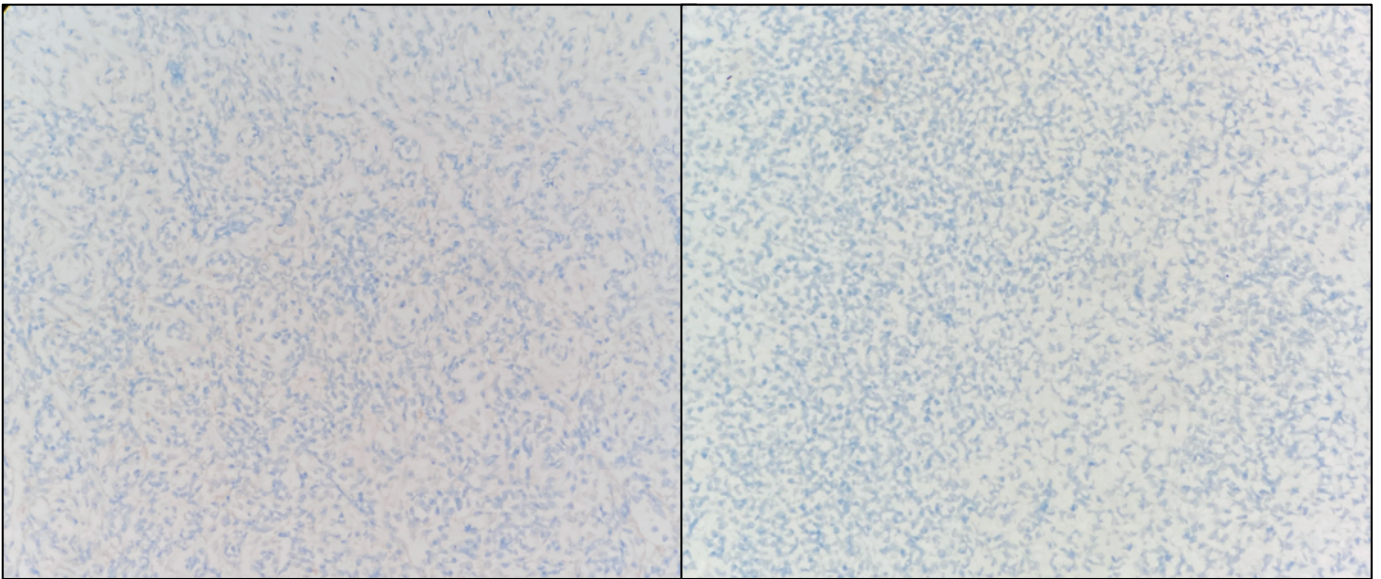
Ayant plusieurs sources confirmant la pertinence du tissu de granulation de chien comme témoin positif d'un marquage de VEGFR-2, les premiers changements ont porté sur le protocole d'immunohistochimie préconisé par abcam® via la notice d'utilisation du produit.

c. Deuxième mise au point du protocole d'immunohistochimie

Le protocole initialement utilisé a été décrit dans trois études utilisant l'anticorps ab2349 : une étude sur modèle murin (Ziegler *et al.*, 2019), une sur modèle humain (Ibrahim *et al.*, 2011) et une sur modèle canin (Kimura *et al.*, 2022). Le protocole complet d'immunohistochimie n'est pas détaillé dans la publication de Ibrahim *et al.* ; une prise de contact n'a pas été fructueuse. L'étude de Ziegler *et al.*, quant à elle, décrit une technique d'immunohistochimie sur lame congelée et non paraffinée comme utilisée dans notre expérimentation. Ainsi, seule l'étude de Kimura *et al.* s'intéressant à l'expression de VEGFR-2 dans diverses tumeurs a servi de modèle pour adapter le protocole utilisé, après confirmation par email que le protocole décrit sur la publication correspondait de manière exacte à ce qui avait été réalisé en pratique.

Le démasquage de l'antigène a été modifié par l'utilisation d'une solution tampon basique (pH=8) à l'EDTA auquel a été ajoutée une protéase comme décrit dans l'étude de Kimura *et al.*. Le reste du protocole d'immunohistochimie étant relativement similaire à celui décrit par l'étude de Kimura *et al.*, aucun autre changement du protocole n'a été réalisé. Le nouveau protocole d'immunohistochimie ne permettait à nouveau pas d'obtenir un marquage (Figure 16).

Figure 16 - Coupes immunohistochimiques au microscope (grossissement x 200) de tissus de granulation de chat (à gauche) et de chien (à droite) après modification du protocole d'immunohistochimie



En l'absence de marquage malgré les deux changements de protocole réalisés, il est décidé de considérer notre deuxième hypothèse à savoir le choix du tissu utilisé comme témoin positif comme non adéquat.

d. Évaluation de tissus comme témoin positif

Les études décrites dans le paragraphe précédent et utilisant le même anticorps ab2349 n'ont pas utilisé de témoin positif, ce qui a été confirmé par échange email avec les laboratoires. La recherche bibliographique a donc été élargie à des études cherchant à évaluer l'expression de VEGFR-2 sur du tissu animal sans que l'anticorps utilisé ne soit l'anticorps ab2349.

L'étude de Kimura *et al.* précédemment citée s'intéresse à diverses tumeurs canines sur lesquelles a été évaluée l'expression de VEGFR-2 (Kimura *et al.*, 2022). Cette étude révèle un marquage plus important sur les cellules tumorales comparées aux cellules stromales et sur les tumeurs épithéliales comparées aux tumeurs mésenchymateuses. Le choix des tissus comme témoins positifs s'est donc centré sur des tumeurs épithéliales.

L'expression de VEGFR-2 a été démontrée dans les adénocarcinomes mammaires de chien. L'étude de Song *et al.* de 2020 utilise ainsi ce tissu comme témoin positif dans l'évaluation de VEGFR-2 dans les encéphalites dysimmunitaires du chien (Song *et al.*, 2020).

Deux études rétrospectives ont étudié l'expression de VEGFR-2 par immunohistochimie dans les carcinomes urothéliaux chez le chien.

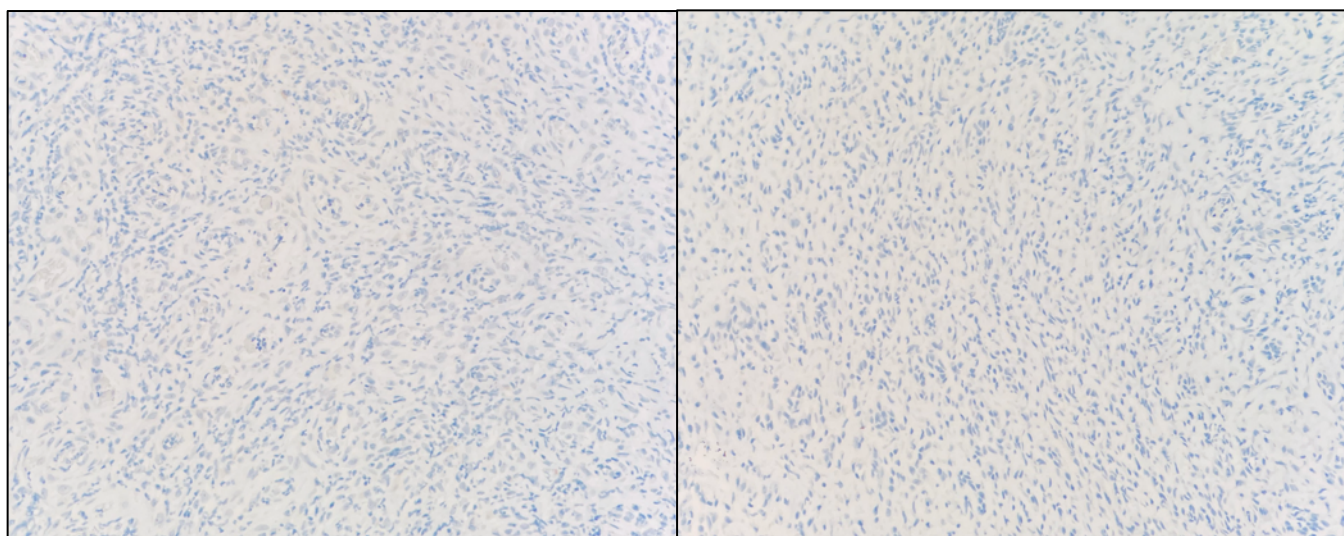
La première étude utilisait des anticorps anti-VEGFR-2 sur dix-sept biopsies de carcinomes urothéliaux en comparaison à dix-sept biopsies vésicales de chien atteints de cystite et à huit biopsies vésicales d'animaux sains. L'ensemble des dix-sept échantillons de carcinomes urothéliaux présentait un marquage à VEGFR-2 (Setyo *et al.*, 2023).

La deuxième étude utilisait des anticorps anti-VEGFR-2 sur trente biopsies de carcinomes urothéliaux en comparaison à dix biopsies vésicales de chien atteints de cystite et à dix biopsies

vésicales d'animaux sains. A nouveau, l'ensemble des trente échantillons de carcinomes urothéliaux présentait un marquage à VEGFR-2 dont 80% montrait un marquage modéré à intense selon l'échelle d'intensité définie dans l'étude (Walters *et al.*, 2018).

Au regard de la bibliographie précédemment citée, les tissus sélectionnés comme témoins positifs pour la mise au point du protocole d'immunohistochimie ont été des biopsies de carcinomes urothéliaux de chien et une biopsie de carcinome urothélial sur pièce d'autopsie de chat et une biopsie d'adénocarcinome mammaire de chien. De nouvelles expériences ont été réalisées selon le protocole proposé par Abcam® et le protocole adapté détaillé dans la sous-partie précédente et n'ont pas permis de mettre en évidence un marquage (Figure 17).

Figure 17 - Coupes immunohistochimiques au microscope (grossissement x 200) de carcinomes urothéliaux de chat (à gauche) et de chien (à droite)



4. Discussion : limites et perspectives

Les carcinomes nasaux restent des tumeurs rares chez le chat, même en centre de référent recevant de nombreux chats présentant une atteinte des voies respiratoires supérieures comme le ChuvA. Les études disponibles sur le sujet restent peu nombreuses et incluent pour la quasi-totalité un nombre restreint de cas. Néanmoins, les résultats obtenus, en termes de données épidémiologiques et d'examens d'imagerie, endoscopique et histologique, sont semblables à ce qui a été décrit dans les précédentes études et détaillés dans la deuxième partie de ce rapport (Henderson *et al.*, 2004 ; Mukaratirwa *et al.*, 2001 ; Tromblee *et al.*, 2006).

La réalisation des marquages immunohistochimiques sur l'échantillon a été compromise par un échec dans la mise au point du protocole sur témoins positifs. Une modification du protocole proposé par la société Abcam® commercialisant l'anticorps puis un changement des tissus choisis comme témoins positifs n'ont pas permis de résoudre l'absence de marquage.

Plusieurs hypothèses sont à envisager pour expliquer cette absence de marquage.

En premier lieu, un défaut du flacon d'anticorps reçu peut être envisagé : une demande d'échange auprès de Abcam® pourrait être réalisée en s'assurant que les conditions de transport et stockage sont assurées, en vue de renouveler les expériences.

En second lieu, un renouvellement des expériences pourrait être envisagé en incluant d'autres tissus de chien comme témoin positif que les carcinomes urothéliaux et mammaires testés.

Enfin, l'anticorps choisi pourrait ne pas réagir avec les récepteurs VEGFR-2 chez le chien comme indiqué par le fabricant et chez le chat pour lequel aucune étude n'a montré de marquage immunohistochimique de l'anticorps ab2349 dans cette espèce. Il pourrait alors être envisagé de changer de type d'anticorps anti-VEGFR-2, notamment en utilisant un autre anticorps anti-VEGFR-2 commercialisé par Abcam®.

Il pourrait également être envisagé d'étudier un autre récepteur à activité tyrosine kinase ciblé par les ITK actuellement commercialisés en médecine vétérinaire. Le récepteur PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*) est étroitement lié à VEGFR et fonctionne notamment en synergie dans les phénomènes d'angiogenèse comme mentionné dans la première partie.

Le facteur PDGF (*platelet derived growth factor*) est considéré comme un facteur de croissance paracrine en conditions physiologiques. L'expression de PDGF et de son récepteur est régulée spatio-temporellement pendant le développement embryonnaire et dans certaines réponses hypertrophiques physiologiques. Ainsi, la production de PDGF est restreinte à un nombre limité de populations cellulaires, avec une action plutôt locale.

Les profils d'expression de PDGF et de son récepteur au sein de l'organisme sont complexes ; il est néanmoins possible de distinguer des profils généraux selon les sous-types. Le facteur PDGF-B est préférentiellement exprimé par les cellules endothéliales vasculaires, les mégacaryocytes et les cellules neuronales. Les facteurs PDGF-A et PDGF-C sont exprimés dans les cellules épithéliales, les cellules musculaires et les progéniteurs neuronaux. L'expression de PDGF-D est moins bien caractérisée : ce facteur est retrouvé dans les fibroblastes et certaines cellules musculaires lisses. En ce qui concerne les récepteurs à PDGF : PDGFR- α est exprimé par les cellules mésenchymateuses et particulièrement par les progéniteurs mésenchymateux du poumon, de la peau, de l'intestin et par les progéniteurs des oligodendrocytes ; PDGFR- β est exprimé en particulier par les cellules musculaires lisses des vaisseaux et par les péricytes (Andrae *et al.*, 2008).

Le récepteur PDGFR est certes un proto-oncogène mais est également impliqué dans d'autres processus pathologiques qu'ils soient vasculaires – athérosclérose, hypertension pulmonaire, rétinopathies vasculaires – ou fibrotiques – fibroses pulmonaire, hépatiques, dermiques, rénale, cardiaque. Il serait également impliqué dans les maladies liées aux greffes (*chronic graft-versus-host disease*) et dans des maladies infectieuses, notamment par liaison aux protéines virales de papillomavirus bovin E5 (Andrae *et al.*, 2008) (Demoulin et Essaghir, 2014).

Le facteur PDGF est impliqué dans différentes voies dans le développement tumoral. La signalisation autocrine de PDGF favoriserait la croissance auto-suffisante de la tumeur par la prolifération de clones de cellules pré-tumorales ou de cellules génétiquement instables qui deviendront malignes par des altérations génétiques ultérieures. Le facteur PDGF serait également impliqué dans l'angiogenèse du stroma tumoral et dans l'invasion et le développement de métastases de certaines tumeurs épithéliales en favorisant la croissance des cellules vasculaires et non vasculaires du stroma tumoral. Le facteur PDGF limiterait enfin la distribution des traitements anti-cancéreux aux cellules tumorales en agissant sur la pression hydrostatique interstitielle au sein du stroma tumoral (Östman, 2004) (Andrae *et al.*, 2008).

La pertinence d'évaluer le récepteur PDGFR dans les carcinomes nasaux chez le chat repose sur deux points : le facteur PDGF est impliqué dans la prolifération cellulaire et en particulier dans le développement tumoral. De plus, des spécialités vétérinaires ciblant PDGFR sont actuellement disponibles en médecine vétérinaire, comme Masivet ND et Palladia ND précédemment mentionnées.

Conclusion

Les carcinomes *sensu largo* constituent en termes de prévalence la deuxième tumeur nasale chez le chat après les lymphomes, avec une majorité d'adénocarcinomes nasaux. Les chats atteints de carcinome nasal sont préférentiellement des animaux âgés, sans prédisposition de race ou de sexe. Les signes cliniques spécifiques principalement rencontrés sont un jetage plus ou moins associé à une épistaxis, des éternuements, une dyspnée et de manière plus occasionnelle une déformation faciale et de l'épiphora. Les examens d'orientation privilégiés sont des examens tomodensitométrique et rhinoscopique. Le diagnostic de certitude passe par un examen histologique sur biopsies nasales.

Les options thérapeutiques des carcinomes nasaux sont actuellement limitées chez le chat et privilégient la radiothérapie externe, technique peu ciblée aux cellules tumorales, lourde en temps, en coût et en effets secondaires et peu disponible sur le territoire français. De nouvelles voies de traitement sont actuellement en recherche, particulièrement en médecine humaine : les thérapies ciblées ont pour avantages d'agir préférentiellement sur les cellules tumorales, de diminuer les effets secondaires et de faciliter la disponibilité et l'administration du médicament.

Les ITK sont une famille de molécules de thérapie ciblée en plein essor depuis le début du siècle et arrivés sur le marché vétérinaire depuis plus de dix ans. Leur utilisation est particulièrement décrite dans le traitement de certaines tumeurs, en médecine humaine comme en médecine vétérinaire, en alternative aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés en particulier au récepteur VEGFR participant aux phénomènes d'angiogenèse nécessaires à la croissance tumorale. Son expression a été décrite chez le chien et notamment dans les carcinomes nasaux mais aucune étude concluante n'a mis en évidence l'expression de VEGFR dans des tumeurs chez le chat.

Notre étude n'a pu être menée à terme du fait d'une difficulté à mettre au point le protocole expérimental sur témoins positifs. L'évaluation de VEGFR dans les carcinomes nasaux de chat et donc encore à déterminer afin de pouvoir justifier l'utilisation des ITK dans le traitement de ces tumeurs chez le chat.

A l'issue de nos manipulations, il est donc proposé de renouveler les expériences menées en changeant d'anticorps anti-VEGFR-2 utilisé par un autre anticorps anti-VEGFR et en s'assurant de la qualité du flacon utilisé. Il pourrait également être envisagé l'étude d'un autre RTK tel que le récepteur PDGFR, impliqué dans la prolifération et survie cellulaires et dont l'activité est liée à celle de VEGFR dans les phénomènes d'angiogenèse.

Liste des références bibliographiques

- ABCAM (2021) Anti-VEGF Receptor 2 antibody - ab2349. [<https://www.abcam.com/vegf-receptor-2-antibody-ab2349/reviews/51954>] (consulté le 24/04/2023).
- ABRAMSSON, A., KURUP, S., BUSSE, M., *et al.* (2007) Defective N-sulfation of heparan sulfate proteoglycans limits PDGF-BB binding and pericyte recruitment in vascular development. *Genes & Development* vol. 21, n° 3, p. 316-331. [<https://doi.org/10.1101/gad.398207>]
- ALONSO-MIGUEL, D., GARCÍA-SAN JOSÉ, P., GONZÁLEZ SANZ, S., *et al.* (2021) Evaluation of palliative therapy, alone or in combination with toceranib phosphate, in dogs diagnosed with metastatic or recurrent beta-cell neoplasia. *New Zealand Veterinary Journal* vol. 69, n° 4, p. 234-239. [<https://doi.org/10.1080/00480169.2021.1905569>]
- ANDRAE, J., GALLINI, R., BETSHOLTZ, C. (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Development* vol. 22, n° 10, p. 1276-1312. [<https://doi.org/10.1101/gad.1653708>]
- BALL, S.G., SHUTTLEWORTH, C.A., KIELTY, C.M. (2007) Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. *Journal of Cell Biology* vol. 177, n° 3, p. 489-500. [<https://doi.org/10.1083/jcb.200608093>]
- BELSHAW, Z., CONSTANTIO-CASAS, F., BREARLEY, M.J., *et al.* (2011) COX-2 expression and outcome in canine nasal carcinomas treated with hypofractionated radiotherapy*†. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 9, n° 2, p. 141-148. [<https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2010.00243.x>]
- BERGER, E.P., JOHANNES, C.M., JERGENS, A.E., *et al.* (2018) Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia®) use in the treatment of gastrointestinal stromal tumors of dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 32, n° 6, p. 2045-2053. [<https://doi.org/10.1111/jvim.15335>]
- BETSHOLTZ, C. (2004) Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine & Growth Factor Reviews* vol. 15, n° 4, p. 215-228. [<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.005>]
- BOGOYEVITCH, M.A., BARR, R.K., KETTERMAN, A.J. (2005) Peptide inhibitors of protein kinases-discovery, characterisation and use. *Biochimica Et Biophysica Acta* vol. 1754, n° 1-2, p. 79-99. [<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.025>]
- BOUYSSOU, S., HAMMOND, G.J., EIVERS, C. (2021) Comparison of CT features of 79 cats with intranasal mass lesions. *Journal of Feline Medicine and Surgery* vol. 23, n° 10, p. 987-995. [<https://doi.org/10.1177/1098612X21994396>]
- BREEN, E.C. (2007) VEGF in biological control. *Journal of Cellular Biochemistry* vol. 102, n° 6, p. 1358-1367. [<https://doi.org/10.1002/jcb.21579>]
- CARDONES, A.R., BANEZ, L.L. (2006) VEGF Inhibitors in Cancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design* vol. 12, n° 3, p. 387-394. [<https://doi.org/10.2174/138161206775201910>]
- CARMELIET, P. (2005) VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology* vol. 69, n° Suppl. 3, p. 4-10. [<https://doi.org/10.1159/000088478>]
- CHEN, B., LIN, S.J.-H., LI, W.-T., *et al.* (2020) Expression of HIF-1 α and VEGF in feline mammary gland carcinomas: association with pathological characteristics and clinical outcomes. *BMC Veterinary Research* vol. 16, n° 1, p. 125. [<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02338-y>]
- CORLESS, C., SCHROEDER, A., GRIFFITH, D., *et al.* (2005) PDGFRA Mutations in Gastrointestinal Stromal Tumors: Frequency, Spectrum and In Vitro Sensitivity to Imatinib. *Journal of Clinical Oncology* vol. 23, p. 5357-64. [<https://doi.org/10.1200/JCO.2005.14.068>]
- COTO, G.M., MUSSER, M.L., TROPF, M.A., *et al.* (2021) A Multi-Institutional Retrospective Analysis of Toceranib Phosphate for Presumed or Confirmed Canine Aortic Body Chemodectomas. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 8, p. 635057. [<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.635057>]
- COX, N.R., BRAUNER, W.R., POWERS, R.D., *et al.* (1991) Tumors of the nose and paranasal sinuses in cats: 32 cases with comparison to a national database (1977 through 1987). *The Journal of the American Animal Hospital Association (USA)* vol. 27, n° 3, p. 339-347.

- DE LORENZI, D., BERTONCELLO, D., BOTTERO, E. (2008) Squash-preparation cytology from nasopharyngeal masses in the cat: cytological results and histological correlations in 30 cases. *Journal of Feline Medicine and Surgery* vol. 10, n° 1, p. 55-60. [https://doi.org/10.1016/j.jfms.2007.06.014]
- DEMOULIN, J.-B., ESSAGHIR, A. (2014) PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews* vol. 25, n° 3, p. 273-283. [https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.03.003]
- DERVISIS, N., KLAHN, S. (2016) Therapeutic Innovations: Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer. *Veterinary Sciences* vol. 3, n° 1, p. 4. [https://doi.org/10.3390/vetsci3010004]
- DIOP N. (2021) Évaluation immunohistochimique de l'expression de Cox-2 dans les carcinomes nasaux chez le chat. Thèse de Médecine Vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.
- DOS ANJOS, D.S., VITAL, A.F., LAINETTI, P. de F., *et al.* (2019) Deregulation of VEGFR-2 and PDGFR Expression and Microvascular Density in a Triple-Negative Model of Canine Malignant Mammary Tumors with Lymph Node or Lung Metastasis. *Veterinary Sciences* vol. 6, n° 1, p. 3. [https://doi.org/10.3390/vetsci6010003]
- DU, Z., LOVLY, C.M. (2018) Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer* vol. 17, n° 1, p. 58. [https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4]
- EHLING, T.J., KLEIN, M.K., SMITH, L., *et al.* (2022) A prospective, multi-centre, Veterinary Radiation Therapy Oncology Group study reveals potential efficacy of toceranib phosphate (Palladia) as a primary or adjuvant agent in the treatment of canine nasal carcinoma. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 20, n° 1, p. 293-303. [https://doi.org/10.1111/vco.12776]
- EKSTRAND, A.J., JAMES, C.D., CAVENEY, W.K., *et al.* (1991) Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Research* vol. 51, n° 8, p. 2164-2172.
- ELLIOTT, J.W. (2019) Response and outcome following toceranib phosphate treatment for stage four anal sac apocrine gland adenocarcinoma in dogs: 15 cases (2013-2017). *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 254, n° 8, p. 960-966. [https://doi.org/10.2460/javma.254.8.960]
- ELLIOTT, J.W., SWINBOURNE, F., PARRY, A., *et al.* (2017) Successful treatment of a metastatic, gastrointestinal stromal tumour in a dog with toceranib phosphate (Palladia). *The Journal of Small Animal Practice* vol. 58, n° 7, p. 416-418. [https://doi.org/10.1111/jsap.12657]
- ESTEBAN-VILLARRUBIA, J., SOTO-CASTILLO, J.J., POZAS, J., *et al.* (2020) Tyrosine Kinase Receptors in Oncology. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21, n° 22, p. 8529. [https://doi.org/10.3390/ijms21228529]
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2009a) Masivet. In *European Medicines Agency*. [https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/masivet] (consulté le 17/05/2023).
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2009b) Palladia. In *European Medicines Agency*. [https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/palladia] (consulté le 17/05/2023).
- FANTL, W.J., JOHNSON, D.E., WILLIAMS, L.T. (1993) Signalling by Receptor Tyrosine Kinases. *Annual Review of Biochemistry* vol. 62, n° 1, p. 453-481. [https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.002321]
- FREDRIKSSON, L., LI, H., ERIKSSON, U. (2004) The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine & Growth Factor Reviews* vol. 15, n° 4, p. 197-204. [https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.007]
- FREZOULIS, P., HARPER, A. (2022) The role of toceranib phosphate in dogs with non-mast cell neoplasia: A systematic review. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 20, n° 2, p. 362-371. [https://doi.org/10.1111/vco.12799]
- FREZOULIS, P.S., HARPER, A., MASON, S.L. (2022) Use of a cyclical hypofractionated radiotherapy regime ('QUAD shot') for the treatment of feline sinonasal carcinomas. *Journal of Feline Medicine and Surgery* vol. 24, n° 12, p. 1212-1218. [https://doi.org/10.1177/1098612X211070737]
- FUJIWARA-IGARASHI, A., FUJIMORI, T., OKA, M., *et al.* (2014) Evaluation of outcomes and radiation complications in 65 cats with nasal tumours treated with palliative hypofractionated

- radiotherapy. *Veterinary Journal* vol. 202, n° 3, p. 455-461. [https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.016]
- GIULIANO, A., DOBSON, J. (2020) Clinical response and survival time of cats with carcinoma of the nasal cavity treated with palliative coarse fractionated radiotherapy. *Journal of Feline Medicine and Surgery* vol. 22, n° 10, p. 922-927. [https://doi.org/10.1177/1098612X19893445]
- GIULIANO, A., SALGÜERO, R., DOBSON, J. (2015) Metastatic anal sac carcinoma with hypercalcaemia and associated hypertrophic osteopathy in a dog. *Open Veterinary Journal* vol. 5, n° 1, p. 48-51.
- GRAEVEN, U., FIEDLER, W., KARPINSKI, S., *et al.* (1999) Melanoma-associated expression of vascular endothelial growth factor and its receptors FLT-1 and KDR. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* vol. 125, n° 11, p. 621-629. [https://doi.org/10.1007/s004320050325]
- GRAMER, I., KILLICK, D., SCASE, T., *et al.* (2017) Expression of VEGFR and PDGFR- α - β in 187 canine nasal carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 15, n° 3, p. 1041-1050. [https://doi.org/10.1111/vco.12245]
- GRIMMINGER, F., GÜNTHER, A., VANCHERI, C. (2015) The role of tyrosine kinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal* vol. 45, n° 5, p. 1426-1433. [https://doi.org/10.1183/09031936.00149614]
- HAHN, K. a., OGLIVIE, G., RUSK, T., *et al.* (2008) Masitinib is Safe and Effective for the Treatment of Canine Mast Cell Tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 22, n° 6, p. 1301-1309. [https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0190.x]
- HARRIS, B.J., LOURENÇO, B.N., DOBSON, J.M., *et al.* (2014) Diagnostic accuracy of three biopsy techniques in 117 dogs with intra-nasal neoplasia. *The Journal of Small Animal Practice* vol. 55, n° 4, p. 219-224. [https://doi.org/10.1111/jsap.12187]
- HEATON, C.M., FERNANDES, A.F.A., JARK, P.C., *et al.* (2020) Evaluation of toceranib for treatment of apocrine gland anal sac adenocarcinoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 34, n° 2, p. 873-881. [https://doi.org/10.1111/jvim.15706]
- HEINRICH, M.C., CORLESS, C.L., DUENSING, A., *et al.* (2003) PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* vol. 299, n° 5607, p. 708-710. [https://doi.org/10.1126/science.1079666]
- HENDERSON, S.M., BRADLEY, K., DAY, M.J., *et al.* (2004) Investigation of nasal disease in the cat—A retrospective study of 77 cases. *Journal of Feline Medicine and Surgery* vol. 6, n° 4, p. 245-257. [https://doi.org/10.1016/j.jfms.2003.08.005]
- HERRERA, R.J., GARCIA-BERTRAND, R. (2018) Chapter 3 - Origin of Modern Humans. In Herrera, R.J., Garcia-Bertrand, R. (Éd.), *Ancestral DNA, Human Origins, and Migrations*. London, Academic Press, p. 61-103. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804124-6.00003-3]
- HOLTERMANN, N., KIUPEL, M., HIRSCHBERGER, J. (2017) The tyrosine kinase inhibitor toceranib in feline injection site sarcoma: efficacy and side effects. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 15, n° 2, p. 632-640. [https://doi.org/10.1111/vco.12207]
- HURWITZ, H., FEHRENBACHER, L., NOVOTNY, W., *et al.* (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* vol. 350, n° 23, p. 2335-2342. [https://doi.org/10.1056/NEJMoa032691]
- IBRAHIM, A., MBODJI, K., HASSAN, A., *et al.* (2011) Anti-inflammatory and anti-angiogenic effect of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in intestinal microvascular endothelium. *Clinical Nutrition* vol. 30, n° 5, p. 678-687. [https://doi.org/10.1016/j.clnu.2011.05.002]
- IMPELLIZERI, J.A., ESPLIN, D.G. (2008) Expression of cyclooxygenase-2 in canine nasal carcinomas. *Veterinary Journal* vol. 176, n° 3, p. 408-410. [https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.03.022]
- IVY, S.P., WICK, J.Y., KAUFMAN, B.M. (2009) An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. *Nature Reviews Clinical Oncology* vol. 6, n° 10, p. 569-579. [https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.130]
- JAIN, R. (2001) Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature Medicine* vol. 7, n° 9, p. 987-989. [https://doi.org/10.1038/nm0901-987]

- KABAK, Y.B., SOZMEN, M., DEVRIM, A.K., *et al.* (2020) Expression levels of angiogenic growth factors in feline squamous cell carcinoma. *Acta Veterinaria Hungarica* vol. 68, n° 1, p. 37-48. [https://doi.org/10.1556/004.2020.00005]
- KAJDANIUK, D., MAREK, B., BORGIEL-MAREK, H., *et al.* (2011) Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology. *Endokrynologia Polska* vol. 62, n° 5, p. 444-455.
- KAMBA, T., TAM, B.Y.Y., HASHIZUME, H., *et al.* (2006) VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* vol. 290, n° 2, p. H560-H576. [https://doi.org/10.1152/ajpheart.00133.2005]
- KATAYAMA, R., HUELSMEYER, M.K., MARR, A.K., *et al.* (2004) Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* vol. 54, n° 1, p. 25-33. [https://doi.org/10.1007/s00280-004-0780-7]
- KIM, C., MATSUYAMA, A., MUTSAERS, A.J., *et al.* (2017) Retrospective evaluation of toceranib (Palladia) treatment for canine metastatic appendicular osteosarcoma. *The Canadian Veterinary Journal* vol. 58, n° 10, p. 1059-1064.
- KIMURA, M., MIYAHARA, K., YAMASAKI, M., *et al.* (2022) Comparison of vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor 2 expression and its relationship to tumor cell proliferation in canine epithelial and mesenchymal tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science* vol. 84, n° 1, p. 133-141. [https://doi.org/10.1292/jvms.21-0388]
- KLEITER, M., MALARKEY, D.E., RUSLANDER, D.E., *et al.* (2004) Expression of cyclooxygenase-2 in canine epithelial nasal tumors. *Veterinary Radiology & Ultrasound: The Official Journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association* vol. 45, n° 3, p. 255-260. [https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2004.04046.x]
- KUCA T. (2013) Etude préliminaire de l'usage des inhibiteurs de la COX-2 dans le traitement des tumeurs canines. Thèse de Médecine Vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire de Toulouse.
- KUMAR, V.B.S., VIJI, R. i., KIRAN, M. s., *et al.* (2007) Endothelial cell response to lactate: Implication of PAR modification of VEGF. *Journal of Cellular Physiology* vol. 211, n° 2, p. 477-485. [https://doi.org/10.1002/jcp.20955]
- LASOTA, J., MIETTINEN, M. (2006) KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Seminars in Diagnostic Pathology* vol. 23, n° 2, p. 91-102. [https://doi.org/10.1053/j.semmp.2006.08.006]
- LAVER, T., LONDON, C.A., VAIL, D.M., *et al.* (2018) Prospective evaluation of toceranib phosphate in metastatic canine osteosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 16, n° 1, p. E23-E29. [https://doi.org/10.1111/vco.12328]
- LAWRENCE, J., SABA, C., GOGAL JR, R., *et al.* (2012) Masitinib demonstrates anti-proliferative and pro-apoptotic activity in primary and metastatic feline injection-site sarcoma cells*. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 10, n° 2, p. 143-154. [https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00291.x]
- LEW, F.H., MCQUOWN, B., BORREGO, J., *et al.* (2019) Retrospective evaluation of canine heart base tumours treated with toceranib phosphate (Palladia): 2011-2018. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 17, n° 4, p. 465-471. [https://doi.org/10.1111/vco.12491]
- LIU, J., LIU, C., QIU, L., *et al.* (2014) Overexpression of both platelet-derived growth factor-BB and vascular endothelial growth factor-C and its association with lymphangiogenesis in primary human non-small cell lung cancer. *Diagnostic Pathology* vol. 9, n° 1, p. 128. [https://doi.org/10.1186/1746-1596-9-128]
- LONDON, C., MATHIE, T., STINGLE, N., *et al.* (2012) Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia®) in solid tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 10, n° 3, p. 194-205. [https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00275.x]
- LONDON, C.A. (2013) Kinase dysfunction and kinase inhibitors. *Veterinary Dermatology* vol. 24, n° 1, p. 181- 187.e39-40. [https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01081.x]
- LONDON, C.A. (2009) Tyrosine Kinase Inhibitors in Veterinary Medicine. *Topics in Companion Animal Medicine, Oncology* vol. 24, n° 3, p. 106-112. [https://doi.org/10.1053/j.tcam.2009.02.002]

- LONDON, C.A., MALPAS, P.B., WOOD-FOLLIS, S.L., *et al.* (2009) Multi-center, Placebo-controlled, Double-blind, Randomized Study of Oral Toceranib Phosphate (SU11654), a Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, for the Treatment of Dogs with Recurrent (Either Local or Distant) Mast Cell Tumor Following Surgical Excision. *Clinical Cancer Research* vol. 15, n° 11, p. 3856-3865. [<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1860>]
- LUCROY, M.D., LONG, K.R., BLAIK, M.A., *et al.* (2003) Photodynamic Therapy for the Treatment of Intranasal Tumors in 3 Dogs and 1 Cat. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 17, n° 5, p. 727-729. [<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02509.x>]
- MALINOWSKI, C. (2006) Canine and feline nasal neoplasia. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* vol. 21, n° 2, p. 89-94. [<https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2005.12.016>]
- MARECH, I., PATRUNO, R., ZIZZO, N., *et al.* (2014) Masitinib (AB1010), from canine tumor model to human clinical development: Where we are? *Critical Reviews in Oncology/Hematology* vol. 91, n° 1, p. 98-111. [<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.12.011>]
- MCDONALD, N.Q., MURRAY-RUST, J., BLUNDELL, T.L. (1995) The first structure of a receptor tyrosine kinase domain: a further step in understanding the molecular basis of insulin action. *Structure* vol. 3, n° 1, p. 1-6. [[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00129-0)]
- MELLANBY, R., HERRTAGE, M., DOBSON, J. (2002) Long-term outcome of eight cats with non-lymphoproliferative nasal tumours treated by megavoltage radiotherapy. *Journal of Feline Medicine & Surgery* vol. 4, n° 2, p. 77-81. [<https://doi.org/10.1053/jfms.2001.0159>]
- MERINO-GUTIERREZ, V., BORREGO, J.F., PUIG, J., *et al.* (2021) Treatment of advanced-stage canine nasal carcinomas with toceranib phosphate: 23 cases (2015-2020). *The Journal of Small Animal Practice* vol. 62, n° 10, p. 881-885. [<https://doi.org/10.1111/jsap.13387>]
- MORINI, M., GENTILINI, F., TURBA, M.E., *et al.* (2022) Mutational Analysis of c-KIT and PDGFRA in Canine Gastrointestinal Stromal Tumors (GISTs). *Veterinary Sciences* vol. 9, n° 7, p. 376. [<https://doi.org/10.3390/vetsci9070376>]
- MUKARATIRWA, S., VAN DER LINDE-SIPMAN, J., GRUYSS, E. (2001) Feline Nasal and Paranasal Sinus Tumours: Clinicopathological Study, Histomorphological Description and Diagnostic Immunohistochemistry of 123 Cases. *Journal of Feline Medicine and Surgery* vol. 3, n° 4, p. 235-245. [<https://doi.org/10.1053/jfms.2001.0141>]
- MUSSER, M.L., TAIKOWSKI, K.L., JOHANNES, C.M., *et al.* (2018) Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia®) use in the treatment of inoperable, metastatic, or recurrent canine pheochromocytomas: 5 dogs (2014-2017). *BMC Veterinary Research* vol. 14, n° 1, p. 272. [<https://doi.org/10.1186/s12917-018-1597-7>]
- NAGATA, K., LAMB, M., GOLDSCHMIDT, M.H., *et al.* (2014) The usefulness of immunohistochemistry to differentiate between nasal carcinoma and lymphoma in cats: 140 cases (1986–2000). *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 12, n° 1, p. 52-57. [<https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2012.00330.x>]
- NASCIMENTO, C., GAMEIRO, A., FERREIRA, J., *et al.* (2021) Diagnostic Value of VEGF-A, VEGFR-1 and VEGFR-2 in Feline Mammary Carcinoma. *Cancers* vol. 13, n° 1, p. 117. [<https://doi.org/10.3390/cancers13010117>]
- NATOLI, C., PERRUCCI, B., PERROTTI, F., *et al.* (2010) Tyrosine Kinase Inhibitors. *Current Cancer Drug Targets* vol. 10, n° 5, p. 462-483. [<https://doi.org/10.2174/156800910791517208>]
- OLSSON, A.-K., DIMBERG, A., KREUGER, J., *et al.* (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 7, n° 5, p. 359-371. [<https://doi.org/10.1038/nrm1911>]
- ÖSTMAN, A. (2004) PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine & Growth Factor Reviews* vol. 15, n° 4, p. 275-286. [<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.002>]
- PARACHINI-WINTER, C., CURRAN, K.M., PELLIN, M., *et al.* (2019) Cutaneous and subcutaneous metastasis of appendicular osteosarcoma in dogs: 20 cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 33, n° 5, p. 2200-2208. [<https://doi.org/10.1111/jvim.15557>]
- PAUL, M.K., MUKHOPADHYAY, A.K. (2004) Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *International Journal of Medical Sciences* vol. 1, n° 2, p. 101-115.

- QIN, S., LI, A., YI, M., *et al.* (2019) Recent advances on anti-angiogenesis receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology* vol. 12, n° 1, p. 27. [https://doi.org/10.1186/s13045-019-0718-5]
- SCHLESSINGER, J. (2000) Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* vol. 103, n° 2, p. 211-225. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00114-8]
- SCHOENBORN, W.C., WISNER, E.R., KASS, P.P., *et al.* (2003) Retrospective assessment of computed tomographic imaging of feline sinonasal disease in 62 cats. *Veterinary Radiology & Ultrasound* vol. 44, n° 2, p. 185-195. [https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2003.tb01269.x]
- SETYO, L.C., DONAHOE, S.L., SHEARER, P.L., *et al.* (2023) Immunohistochemical analysis of expression of VEGFR2, KIT, PDGFR- β , and CDK4 in canine urothelial carcinoma. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* vol. 35, n° 2, p. 109-115. [https://doi.org/10.1177/10406387221146247]
- SHEPPARD-OLIVARES, S., BELLO, N.M., WOOD, E., *et al.* (2020) Toceranib phosphate in the treatment of canine thyroid carcinoma: 42 cases (2009-2018). *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 18, n° 4, p. 519-527. [https://doi.org/10.1111/vco.12571]
- SHIOMITSU, K., JOHNSON, C.L., MALARKEY, D.E., *et al.* (2009) Expression of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor in malignant canine epithelial nasal tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 7, n° 2, p. 106-114. [https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2009.00178.x]
- SITOHY, B., NAGY, J.A., DVORAK, H.F. (2012) Anti-VEGF/VEGFR Therapy for Cancer: Reassessing the Target. *Cancer Research* vol. 72, n° 8, p. 1909-1914. [https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3406]
- SONG, J.-H., YU, D.-H., HWANG, T.-S., *et al.* (2020) Expression of platelet-derived growth factor receptor- α/β , vascular endothelial growth factor receptor-2, c-Abl, and c-Kit in canine granulomatous meningoencephalitis and necrotizing encephalitis. *Veterinary Medicine and Science* vol. 6, n° 4, p. 965-974. [https://doi.org/10.1002/vms3.314]
- STIBOROVA, K., MEIER, V.S., TAKADA, M., *et al.* (2020) Definitive-intent radiotherapy for sinonasal carcinoma in cats: A multicenter retrospective assessment. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 18, n° 4, p. 626-633. [https://doi.org/10.1111/vco.12583]
- TAKANO, T., OHYAMA, T., KOKUMOTO, A., *et al.* (2011) Vascular endothelial growth factor (VEGF), produced by feline infectious peritonitis (FIP) virus-infected monocytes and macrophages, induces vascular permeability and effusion in cats with FIP. *Virus Research* vol. 158, n° 1, p. 161-168. [https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.03.027]
- THÉON, A.P., PEASTON, A.E., MADEWELL, B.R., *et al.* (1994) Irradiation of nonlymphoproliferative neoplasms of the nasal cavity and paranasal sinuses in 16 cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 204, n° 1, p. 78-83.
- TROMBLEE, T.C., JONES, J.C., ETUE, A.E., *et al.* (2006) Association Between Clinical Characteristics, Computed Tomography Characteristics, and Histologic Diagnosis for Cats with Sinonasal Disease. *Veterinary Radiology & Ultrasound* vol. 47, n° 3, p. 241-248. [https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2006.00134.x]
- UNIPROT (2023) Blast results. [https://www.uniprot.org/blast/uniprotkb/ncbiblast-R20230424-142236-0877-55222098-p1m/overview] (consulté le 24/04/2023).
- WALTERS, L., MARTIN, O., PRICE, J., *et al.* (2018) Expression of receptor tyrosine kinase targets PDGFR- β , VEGFR2 and KIT in canine transitional cell carcinoma. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 16, n° 1, p. E117-E122. [https://doi.org/10.1111/vco.12344]
- WANG, S., CHEN, S., ZHONG, Q., *et al.* (2022) Immunotherapy for the treatment of advanced nasopharyngeal carcinoma: a promising new era. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* vol. 149, n°5, p. 2071-2079 [https://doi.org/10.1007/s00432-022-04214-8]
- WERGIN, M.C., KASER-HOTZ, B. (2004) Plasma Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Measured in Seventy Dogs with Spontaneously Occurring Tumours. *In Vivo* vol. 18, n°1, p. 15-20.
- YAMAZAKI, H., MIURA, N., LAI, Y.-C., *et al.* (2017) Effects of toceranib phosphate (Palladia) monotherapy on multidrug resistant lymphoma in dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science* vol. 79, n° 7, p. 1225-1229. [https://doi.org/10.1292/jvms.16-0457]

- YAMAZAKI, H., TANAKA, T., MIE, K., *et al.* (2020) Assessment of postoperative adjuvant treatment using toceranib phosphate against adenocarcinoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 34, n° 3, p. 1272-1281. [<https://doi.org/10.1111/jvim.15768>]
- YOSHIKAWA, H., GIEGER, T.L., SABA, C.F., *et al.* (2021) Retrospective evaluation of intranasal carcinomas in cats treated with external-beam radiotherapy: 42 cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 35, n° 2, p. 1018-1030. [<https://doi.org/10.1111/jvim.16098>]
- ZIEGLER, J., ZALLES, M., SMITH, N., *et al.* (2019) Targeting ELTD1, an angiogenesis marker for glioblastoma (GBM), also affects VEGFR2: molecular-targeted MRI assessment. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* vol. 9, n° 1, p. 93-109.

Annexes

Annexe 1 - Signalement des chats inclus dans l'étude

Légende des races : 1 = Européen ; 2 = Maine Coon ; 3 = Ragdoll ; 4 = Sacré de Birmanie.

	N° de dossier	Nom	Race	Âge	Poids	Mâle	Femelle	Castré	Stérilisée
1	A13-882	Satine	1	17	4.4	0	1	0	1
2	A09-3275	Galinette	1	23	7.5	0	1	0	1
3	A14-13496	Mimi	1	19	3.5	0	1	0	1
4	A16-3764	Bettyblue	4	13	2.2	0	1	0	1
5	A10-2534	Savana	1	21	3.2	0	1	0	0
6	A11-2608	Casimir	1	17	6.65	1	0	1	0
7	A18-10733	Simba	2	11	4.75	1	0	1	0
8	A11-7437	Flamme	1	10	5.5	0	1	0	0
9	A07-322	Venus Star	3	16	5.4	0	1	0	1
10	A19-7736	Pépère	1	10	4.45	1	0	1	0
11	A08-3843	Kiki	1	11	3	0	1	0	1
12	A12-1781	Poum	1	13	5	1	0	0	0
13	A19-1668	Gribouille	1	10	6.345	1	0	1	0
14	A16-9611	Canelle	1	14	3.3	0	1	0	1
15	A20-10153	Moki	1	5.5	3.2	1	0	1	0
16	A20-10439	Flocon	1	15	3.4	1	0	1	0
17	A09-11776	Eccio	4	11	3	1	0	1	0
18	A21-1219	Rubi	1	NR	3	1	0	1	0
	Total :					9	9	8	7
	Moyenne :			13.91	4.32				
	Médiane :			13	3.95				

Annexe 2 - Caractéristiques épidémiologiques des chats inclus dans l'étude

NR = non renseigné

N° de dossier	< 10 ans	Âge de déclaration symptômes	Jetage	Latéralité		Aspect		
				Unilatéral	Bilatéral	Sanguinolent	Purulent	Mucopurulent
A13-882	0	17	1	1	0	1	0	0
A 09-3275	0	21	1	1	0	1	0	0
A14-13496	0	18.7	1	0	1	1	0	0
A16-3764	0	12.8	1	0	1	0	1	0
A10-2534	0	21	1	0	1	1	0	0
A11-2608	0	16.5	1	1	0	0	1	0
A18-10733	0	10.9	1	1	0	1	0	0
A11-7437	0	10	0	0	0	0	0	0
A07-322	0	15.9	1	1	0	0	0	1
A19-7736	0	10	0	0	0	0	0	0
A08-3843	0	10.8	1	1	0	1	1	0
A12-1781	0	12.8	1	1	0	0	1	0
A19-1668	1	9.3	0	0	0	0	0	0
A16-9611	0	13.9	0	0	0	0	0	0
A20-10153	1	5.4	0	0	0	0	0	0
A20-10439	0	14.9	1	1	0	0	1	1
A09-11776	0	10.8	1	1	0	0	0	1
A21-1219	NR	NR	1	1	0	0	0	1
Total	2		13	10	3	6	5	4
%	11.1%		72.2%	55.6%	16.7%	33.3%	27.8%	22.2%
Moyenne		13.6						
Médiane		12.8						

N° de dossier	Écoulements oculaires	Latéralité		Aspect		Éternuements	Dyspnée	Respiration sifflante	Toux	Stertor
		Unilatéral	Bilatéral	Séieux	Muco-purulent					
A13-882	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
A 09-3275	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
A14-13496	0	0	0	0	0					
A16-3764	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
A10-2534	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A11-2608	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
A18-10733	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
A11-7437	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
A07-322	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
A19-7736	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
A08-3843	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
A12-1781	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
A19-1668	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A16-9611	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
A20-10153	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0
A20-10439	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0
A09-11776	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
A21-1219	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1
Total	6	5	1	6	0	12	10	5	7	5
%	33.3%	27.8%	5.6%	33.3%	0.0%	66.7%	55.6%	27.8%	38.9%	27.8%

N° de dossier	Reverse Sneezing	Dysphagie	Epistaxis	Latéralité		Anorexie / Dysorexie	Hyperthermie	Abattement
				Unilatéral	Bilatéral			
A13-882	0	0	1	1	0	0	0	0
A 09-3275	0	0	1	1	0	0	0	1
A14-13496			1	0	1	0	0	0
A16-3764	0	1	0	0	0	1	1	0
A10-2534	0	0	1	NR	NR	0	0	1
A11-2608	0	0	0	0	0	0	0	0
A18-10733	0	0	1	NR	NR	1	0	1
A11-7437	0	0	0	0	0	0	0	0
A07-322	0	1	0	0	0	0	0	0
A19-7736	0	1	0	0	0	1	0	0
A08-3843	1	1	1	1	0	1	0	1
A12-1781	0	0	1	NR	NR	0	0	0
A19-1668	0	0	0	0	0	0	0	0
A16-9611	0	0	0	0	0	0	0	0
A20-10153	0	0	0	0	0	1	0	0
A20-10439	0	0	0	0	0	1	1	1
A09-11776	0	0	1	NR	NR	0	0	0
A21-1219	1	0	1	1	0	1	0	0
Total	2	4	9	4	1	7	2	5
%	11.1%	22.2%	50.0%	22.2%	5.6%	38.9%	11.1%	27.8%

Annexe 3 - Analyses sanguines des chats inclus dans l'étude

N° de dossier	BIOCHIMIE						
	Glucose	Urée	Créatinine	PT	Albumine	Globulines	ALAT
Unité	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	UI/L
A13-882	2.01	0.65	11	81	33	48	68
A09-3275	1.47	0.75	29	77	33	44	56
A14-13496							
A16-3764				75			
A10-2534	0.8	0.5	12				58
A11-2608							
A18-10733	1.4	0.609	22.9	64			41
A11-7437	1.04	0.5	18	82	34	48	47
A07-322	1.6	0.43	14	88	36	52	38
A19-7736	1.88	0.537	13.4	84	34	50	132
A08-3843							
A12-1781			13	72			
A19-1668	1.74	0.43	14	91	33	58	32
A16-9611	1.33	0.64	14	75	32	44	33
A20-10153	1.11	0.312	12.5	72	32	40	56
A20-10439	0.97	0.546	16.5	75	30	45	64
A09-11776		0.62	19.8				
A21-1219			16	68			
Moyenne	1.40	0.54	16.15	77.23	33.00	47.67	56.82

N° de dossier	HEMATOLOGIE											
	GR	Hb	Ht	VGM	TCMH	CCMH	IDG	Plaquettes	VPM	GB	Lymphocytes	Monocytes
Unité	10 ¹² /L	g/dL	%	fL	-	g/dL	-	10 ⁹ /L	fL	10 ⁹ /L	10 ⁹ /L	10 ⁹ /L
A13-882	9.73	14	39.9	41	14.4	35.1	73.9	97000		15270	1680	310
A09-3275	6.67	9.8	27.8	41.7	14.7	35.3	148.7	378000		4870	330	210
A14-13496												
A16-3764												
A10-2534												
A11-2608												
A18-10733	9.08	13.8	41.6	45.8	15.2	33.2	13.6	129000		8600	1700	390
A11-7437	8.01	12	33.4	41.7	15	35.9		465000		22300	1560	890
A07-322	10.33	16.3	42	40.7	15.8	38.8		170000		6990	1260	350
A19-7736	6.26	8.7	26.3	42	13.9	33	28.5	102000	14.5	23300	2200	540
A08-3843												
A12-1781			49									
A19-1668	5.47	6.7	20.3	37.1	12.2	33		539000		9170	1780	540
A16-9611	9.53	13	35.7	37.5	13.6	36.4		315000		6140	3193	246
A20-10153	8.52	12.5	34.4	40.4	14.7	36.3		176000		6760	2430	330
A20-10439	9.21	13.4	38	46.6	14.5	14.5		576000		16960		
A09-11776												
A21-1219			30									
Moyenne	8.28	12.02	34.87	41.45	14.40	33.15	66.18	294700	14.50	12036.00	1792.56	422.89

Neutrophiles 10 ⁹ /L	N° de dossier Unité	IONOGRAMME				ENDOCRINOLOGIE
		Sodium mmol/L	Potassium mmol/L	Calcium ionisé mmol/L	Phosphore mmol/L	Thyroxine nmol/L
12220	A13-882					
4160	A09-3275					
	A14-13496					
	A16-3764	161	3.7			
	A10-2534					
	A11-2608					
5860	A18-10733	159	4			
18730	A11-7437					
5170	A07-322					
	A19-7736	152.9	3.94	1.08		
	A08-3843					
	A12-1781					
6680	A19-1668			0.98	53	41.2
2088	A16-9611				40	34.4
3410	A20-10153	151.4	4.58	1.27		
	A20-10439	156.2	4.11	1.25		64
	A09-11776				49.48	
	A21-1219					
7289.75	Moyenne	156.10	4.07	1.15	47.49	46.53

Annexe 4 - Résultats de l'examen tomodensitométrique des chats inclus dans l'étude

N° dossier	Scanner	Latéralité		Symétrie si bilatérale		Lyse osseuse cartilagineuse	Sécrétions	Effets masses	Atteintes sinusales
		Unilatéral	Bilatérale	Symétrique	Asymétrique				
A13-882	1	0	1	0	1	1		1	1
A09-3275	1	0	1	0	1	1	1	0	1
A14-13496	0								
A16-3764	0								
A10-2534	1	1	0	0	0	1	0	0	1
A 11-2608	0								
A18-10733	1	0	1	0	1	0	1	0	1
A11-7437	1	0	1	0	1	1	1	1	1
A07-322	1	0	1	0	1	1	0	1	0
A19-7736	1	0	1	0	1	1	1	1	1
A08-3843	0								
A12-1781	1	1	0	0	0		0	0	1
A19-1668	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A16-9611	0								
A20-10153	1	1	0	0	0	1	1	0	1
A20-10439	1	1	0	0	0	1	1	1	1
A09-11776	1	1	0	0	0	0	1	0	1
A21-1219	1	1	0	0	0	1	0	1	1
Total	13	7	6	0	6	9	7	6	11
%	72.2%	53.8%	46.2%	0.0%	46.2%	69.2%	53.8%	46.2%	84.6%

N° dossier	Latéralité		Adénopathie	Atteinte de l'espace	Atteintes des bulles	Réhaussement
	Unilatérale	Bilatérale				
A13-882	0	1	0	1	0	0
A09-3275	0	1	1		0	0
A14-13496						
A16-3764						
A10-2534	1	0	0			
A 11-2608						
A18-10733	0	1	1			1
A11-7437	0	1	1	1	0	1
A07-322	0	0	1		0	0
A19-7736		1	0		0	0
A08-3843						
A12-1781	1	0	0	1	0	0
A19-1668	0	0	0		0	0
A16-9611						
A20-10153	1	0	1			
A20-10439	0	1	1			
A09-11776	1	0	0			1
A21-1219	1	0	1		1	1
Total	5	6	7	3	1	4
%	38.5%	46.2%	53.8%	23.1%	7.7%	30.8%

Annexe 5 - Résultats d'endoscopie des chats inclus dans l'étude

NR = non renseigné

N° de dossier	Endoscopie	Latéralité		Lyse	Muqueuse friable	Obstruction des choanes	Sécrétions	Sécrétions mucopurulentes	Présence d'une sténose
		Unilatérale	Bilatérale						
A13-882	0	0	1	1	0	0	0	0	1
A09-3275	1	1	0	0	1	0	0	0	0
A14-13496	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A16-3764	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A10-2534	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A11-2608	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A18-10733	1	0	1	0	0	1	0	0	1
A11-7437	1	1	0	0	0	1	1	NR	1
A07-322	1	0	0	0	0	1	1	NR	0
A19-7736	1	0	1	0	0	1	0	0	1
A08-3843	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A12-1781	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A19-1668	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A16-9611	1	1	0	0	0	1	0	0	1
A20-10153	1	0	1	0	1	0	0	0	1
A20-10439	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A09-11776	1	1	0	1	0	0	1	1	0
A21-1219	1	1	0	1	0	1	1	NR	1
Total	9	5	4	3	2	5	4	1	7
%	50.0%	55.6%	44.4%	33.3%	22.2%	55.6%	44.4%	11.1%	77.8%

Annexe 6 - Bilan d'extension des chats inclus dans l'étude

NR = non renseigné

N° de dossier	Métastases	Pulmonaire	Nœuds lymphatiques	Autres
A13-882	1	1	0	0
A09-3275	1	0	1	
A14-13496	0	0	0	0
A16-3764	0	0	0	0
A10-2534	0	0	0	0
A11-2608	0	0	0	0
A18-10733	1	0	1	0
A11-7437	0	0	0	0
A07-322	0	0	0	0
A19-7736	NR	NR	NR	NR
A08-3843	0	0	0	0
A12-1781	0	0	0	0
A19-1668	0	0	0	0
A16-9611	0	0	0	0
A20-10153	0	0	0	0
A20-10439	NR	NR	NR	NR
A09-11776	0	0	0	0
A21-1219	1	0	1	0
Total	4	1	3	0

MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE D'ÉVALUATION DE L'EXPRESSION DE VEGFR-2 DANS LES CARCINOMES NASAUX FÉLINS PAR IMMUNOHISTOCHIMIE

AUTEUR : Florian GUÉGANOU

RÉSUMÉ :

Les carcinomes nasaux sont la deuxième tumeur nasale la plus représentée chez le chat derrière les lymphomes nasaux, avec une majorité d'adénocarcinomes. La prise en charge actuellement recommandée est la radiothérapie externe, dont les études montrent une efficacité satisfaisante mais qui reste un traitement peu ciblé aux cellules tumorales, lourde en temps, en coût et en effets secondaires et peu disponible sur le territoire français. De nouvelles voies thérapeutiques sont en recherche en médecine humaine et vétérinaire et les thérapies ciblées semblent prometteuses comme traitement anti-cancéreux ciblé aux cellules tumorales, présentant peu d'effets secondaires avec une bonne disponibilité et une facilité d'administration. Les inhibiteurs des tyrosine kinases sont une famille de molécules de thérapie ciblée particulièrement en développement comme traitement anti-cancéreux.

Le facteur de croissance endothélial vasculaire VEGF est une protéine impliquée dans la vasculogénèse au cours de l'embryogénèse et dans l'angiogénèse au cours de phénomènes physiologiques. L'implication de VEGF a également été montrée dans les processus tumoraux, en favorisant une angiogénèse excessive au sein de la tumeur permettant ainsi sa croissance. Son récepteur VEGFR est en particulier la cible d'inhibiteur des tyrosine kinases dont une spécialité vétérinaire est actuellement disponible sur le marché vétérinaire : le tocéranib, de nom déposé Palladia ND. Son efficacité a été démontrée chez le chien en particulier sur les adénocarcinomes des sacs anaux et des tumeurs neuro-endocrines et des premiers résultats prometteurs ont été publiés notamment sur les tumeurs gastro-intestinales stromales et les carcinomes nasaux.

Une étude rétrospective a été réalisée sur 18 chats atteints de carcinomes nasaux. La mise au point du protocole d'immunohistochimie n'a pas donné de résultats satisfaisants et l'étude n'a pas pu apporter de réponse quant à l'expression du récepteur VEGFR dans les carcinomes nasaux chez le chat en comparaison à du tissu nasal sain. Un changement d'anticorps anti-VEGFR pourrait être envisagé dans un premier temps et l'étude d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase tel que PDGFR pourrait également être intéressante.

MOTS CLÉS :

AFFECTION NASALE, CARCINOME NASAL, CHAT, IMMUNOHISTOCHIMIE, NEOPLASIE, TUMEUR, FACTEUR DE CROISSANCE ENDOTHELIAL VASCULAIRE.

JURY :

Présidente : Pr Fanny PILOT-STORCK

Directrice de thèse : Dr Morgane CANONNE-GUIBERT

Examineur : Pr Grégory JOUVION

Invité : Dr Jérémie BEGUIN

DEVELOPMENT OF A PROTOCOL FOR THE EVALUATION OF VEGFR-2 EXPRESSION IN FELINE NASAL CARCINOMAS BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY

AUTHOR: Florian GUÉGANOU

SUMMARY:

Nasal carcinoma is the second most common nasal tumour in cats after nasal lymphoma, with a majority of adenocarcinomas. The currently recommended treatment is external radiotherapy, which studies show to be satisfactorily effective but which remains a treatment that is not very targeted at the tumour cells, is time-consuming and costly, has high side effects and is not widely available in France. New therapeutic issues are being explored in human and veterinary medicine and targeted therapies seem promising as anti-cancer treatments targeted at tumour cells, with few side effects, good availability and ease of administration. Tyrosine kinase inhibitors are a family of targeted therapy molecules that are particularly under development as anti-cancer treatments.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a protein involved in vasculogenesis during embryogenesis and in angiogenesis during physiological phenomena. VEGF has also been shown to be involved in tumour processes, promoting excessive angiogenesis within the tumour and thus enabling its growth. Its receptor VEGFR is in particular the target of tyrosine kinase inhibitors, of which a veterinary speciality is currently available on the veterinary market: toceranib (Palladia ND). Its efficacy has been demonstrated in dogs, particularly in anal sac adenocarcinomas and neuroendocrine tumours, and initial promising results have been published, particularly in gastrointestinal stromal tumours and nasal carcinomas.

A retrospective study was carried out on 18 cats with nasal carcinomas. The development of the immunohistochemistry protocol did not give satisfactory results and the study could not provide an answer to the expression of the VEGFR receptor in nasal carcinomas in cats compared to healthy nasal tissue. A change of anti-VEGFR antibody could be considered as a first step and the study of other tyrosine kinases receptors such as PDGFR could also be interesting.

KEYWORDS:

CAT, IMMUNOHISTOCHEMISTRY, NASAL DISEASE, NASAL CARCINOMA, NEOPLASIA, TUMOR, VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR.

JURY:

Chairperson: Pr Fanny PILOT-STORCK

Thesis Director: Dr Morgane CANONNE-GUIBERT

Reviewer: Pr Grégory JOUVION

Guest: Dr Jérémy BEGUIN