



HAL
open science

Intérêt préclinique des organoïdes dans la modélisation du cancer mammaire canin

Camilla Rondeau

► **To cite this version:**

Camilla Rondeau. Intérêt préclinique des organoïdes dans la modélisation du cancer mammaire canin. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04300939

HAL Id: dumas-04300939

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04300939v1>

Submitted on 22 Nov 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

Année 2023

INTÉRÊT PRÉCLINIQUE DES ORGANOÏDES DANS LA MODÉLISATION DU CANCER MAMMAIRE CANIN

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE
présentée et soutenue publiquement devant
la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)
le 4 octobre 2023

par

Camilla RONDEAU

sous la direction de

Fanny PILOT-STORCK

JURY

Président du jury :	M. Alain FONTBONNE	Professeur à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Fanny PILOT-STORCK	Professeur à l'École nationale vétérinaire de Lyon, VetAgro Sup
Examinatrice :	Mme Morgane CANONNE-GUIBERT	Maître de Conférences en Médecine interne à l'EnvA
Membre invité :	Mme Agata RYBICKA	Cheffe de projet de l'étude clinique

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



Version juillet 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	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneq	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	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Benckroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	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-Favre	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	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	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	Guétin-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	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtmet	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	Bérandère	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, Professeur à l'EnvA,

Qui nous fait l'honneur de présider notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

A Mme Fanny PILOT-STORCK, Professeur à l'École nationale vétérinaire de Lyon VetAgroSup,

Pour sa gentillesse, sa disponibilité, la qualité de ses conseils et pour son soutien.

Remerciements chaleureux.

A Mme Morgane CANONNE-GUIBERT, Maître de Conférence à l'EnvA,

Pour sa bienveillance et son soutien.

Sincères remerciements.

A Mme Dominique THIERNY, Présidente fondatrice d'Oncovet (Villeneuve-D'Ascq 59) et d'OCR,

Pour m'avoir permis d'utiliser l'étude clinique 21-ONCO-O1 d'OCR comme sujet de thèse et m'avoir ouvert les portes du laboratoire OCR et PRISM.

Mes plus sincères remerciements pour cette opportunité.

A Mme Agata RYBICKA, Cheffe de projet de l'étude clinique,

Sans qui cette étude clinique n'aurait pas pu se réaliser. Merci pour son soutien et son dévouement à ce projet.

Sincères remerciements.

A Emmanuel Bouchaert,

Pour son accueil, sa disponibilité et son immense gentillesse.

Mes plus tendres et chaleureux remerciements.

A mon père, mes frères et à mon concubin,

Pour leur soutien infaillible et leur amour,

Tendrement.

Table des matières

Liste des figures 3

Liste des tableaux.....5

Liste des abréviations7

Introduction9

Première partie : étude bibliographique..... 11

1. Le carcinome mammaire canin 11

A. Rappels anatomiques et physiologiques de la mamelle chez le chien 11

B. Épidémiologie et facteurs de risque 18

C. Présentation clinique et démarche diagnostique 21

D. Histopathologie et immunophénotypage..... 27

E. Pronostic 59

2. Les organoïdes 72

A. Des structures tridimensionnelles cultivées *in vitro* comme modèles tumoraux 73

B. Intérêt des organoïdes en cancérologie – Application au carcinome mammaire 81

Deuxième partie : étude expérimentale – Projet de recherche 3R-INCA d’OCR et PRISM 91

1. Introduction 91

2. Matériels et méthodes..... 91

A. Objectifs 91

B. Population et design de l’étude 91

C. Recrutement, sites d’investigation et de développement des organoïdes 92

D. Critères d’inclusion et de non-inclusion 92

E. Collecte des échantillons 92

F. Traitement des tissus mammaires prélevés 92

G. Protocole de développement des organoïdes 93

H. Histologie, immunohistochimie, immunofluorescence 94

3. Résultats 95

A. Données épidémiologiques..... 95

B. Histologie, immunohistochimie et immunofluorescence des tumeurs 96

C. Histologie, immunohistochimie et immunofluorescence des organoïdes 97

4. Discussion 97

Conclusion 99

Liste des références bibliographiques 101

Annexe 1 : Photographies des lames des tumeurs mammaires après marquage immunohistochimique (ER-PR-HER2) (Raffo-Romero et al., 2023) 110

Annexe 2 : Immunofluorescence pour Ki-67 sur les lames de tumeurs mammaires (Raffo-Romero et al., 2023) 111

Annexe 3 : Photographies fournies par Emmanuel Bouchaert (OCR) des lames histologiques et immunohistochimiques des tumeurs mammaires envoyées au laboratoire Cerbavet pour interprétation (réalisée en mai-juin 2023) 112

Annexe 4 : Photographies des lames des tumoröides aprs marquage immunohistochimique (ER-PR-HER2) (Raffo-Romero et al., 2023)115

Liste des figures

Figure 1 : Vascularisation artérielle des mamelles chez la chienne (D'après Silver, 1966).....	12
Figure 2 : Drainage et connexions lymphatiques des mamelles de la chienne (D'après Wellehan et al., 2003).....	12
Figure 3 : Structure d'un lobule mammaire avec les détails d'une alvéole sectionnée et son stroma environnant (D'après Bisailon A., 2002).....	14
Figure 4 : Modifications histologiques du tissu mammaire au cours du cycle ovarien chez la chienne (Santos et al., 2010).....	15
Figure 5 : Modifications histologiques subies par la glande mammaire au cours du cycle sexuel de la chienne (Santos et al., 2010).....	16
Figure 6 : Hormones impliquées dans le développement mammaire et la lactogenèse (D'après Klein, 2019).....	18
Figure 7 : Taux d'incidence du cancer mammaire en fonction de l'âge chez les chiennes (Représenté par la courbe à trait plein) (Merlo <i>et al.</i> , 2008).....	19
Figure 8 : Cytoponction à l'aiguille fine d'une masse mammaire d'une chienne (Issue de Burton, 2017).....	22
Figure 9 : Lésion d'ostéopathie hypertrophique secondaire sur les extrémités distales du radius et de l'ulna d'une chienne atteinte d'une tumeur mammaire maligne (Issue de « VET-ORTHOPEDIE » Pages s. d.).....	23
Figure 10 : Cytoponction d'un nœud lymphatique (x50) avec présence de cellules carcinomateuses (Issue de Burton, 2017).....	24
Figure 11 : Images radiographiques et tomodensitométriques thoraciques de chiennes dans le cadre de bilan d'extension en cas de tumeur mammaire.....	25
Figure 12 : Classification histologique des différentes tumeurs et dysplasies mammaires de la chienne selon Goldschmidt (2010) (Goldschmidt et al., 2011 ; Bobillier, 2018).....	29
Figure 13 : Identification des carcinomes mammaires de stade 0 (<i>in situ</i>) par immunohistochimie de p63 (D'après Chocteau et al., 2019).....	33
Figure 14 : Photographies histologiques réalisées par le LAPVSO (Laboratoire Anatomie pathologique Vétérinaire du Sud-Ouest) de plusieurs types de carcinomes mammaires chez la chienne classés selon Goldschmidt après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine : (a) Carcinome simple tubuleux Gx400 ; (b) Carcinome papillaire kystique Gx100 ; (c) Carcinome solide Gx400 ; (d) Carcinome micropapillaire Gx100 ; (e) Carcinome ductulaire Gx200 ; (f) Comédocarcinome Gx40 (Issues de Catoio, 2014) (<i>G</i> : <i>Grossissement</i>).....	34
Figure 15 : Classification des carcinomes mammaires canins de Gilbertson (Gilbertson <i>et al.</i> , 1983).....	36
Figure 16 : Famille ErbB des récepteurs à activité tyrosine kinase (Pellat <i>et al.</i> , 2018).....	41
Figure 17 : Représentation schématisée de l'adressage membranaire d'ER α (D'après Adlanmerini <i>et al.</i> , 2015).....	43
Figure 18 : Impact de l'activation des métalloprotéases matricielles (MMP) 2 et 9 par la voie MISS (D'après Levin, 2003).....	44
Figure 19 : Métabolisme des œstrogènes dans la production de cathécol-œstrogènes cancérogènes (D'après Cavalieri et al., 1997).....	46
Figure 20 : Fonction des médiateurs BRCA1, PALB2, BRCA2 et RAD51 dans la recombinaison homologue (D'après Buisson et Masson, 2013).....	50
Figure 21 : Marqueurs utilisables en immunohistochimie pour différencier les différents types cellulaires de la glande mammaire.....	55
Figure 22 : Classification immunophénotypique du carcinome mammaire invasif de la chienne selon Nielsen <i>et al.</i> (2004) (D'après Mouneyrac, 2018).....	56
Figure 23 : Classification immunophénotypique du carcinome mammaire invasif du chien selon Blows <i>et al.</i> (D'après Mouneyrac, 2018).....	57
Figure 24 : Survie globale (OS) et intervalle sans progression (DFI) des chiennes de la cohorte totale (en mois) selon l'index de Santos.....	69

Figure 25 : Chronologie de la construction d'organoïdes (Issue de 2023, "Optimize your technology", Molecular Devices, <i>The essential guide to organoids in drug discovery</i>).....	74
Figure 26 : Images histologiques et immunohistochimiques comparatives de tumeurs mammaires et de leur organoïde associé (Issues de Sachs et al., 2018).	77
Figure 27 : Mise en évidence de la présence du récepteur à la prolactine selon le milieu de culture utilisé (Issue de Furuta et Bissell, 2016).	79
Figure 28 : Interactions entre composants du microenvironnement immunitaire et cellules tumorales mammaires chez l'humain (Issue de Soysal et al., 2015).	84
Figure 29 : Utilisation de tumoroïdes mammaires en criblage thérapeutique (Sachs et al., 2018).	87
Figure 30 : Ratio redox, NADH τ_m , et FAD τ_m d'organoïdes dérivés de tumeurs mammaires primaires humaines obtenues par retrait chirurgical (D'après Walsh et al., 2014).....	88
Figure 31 : Illustration de l'intérêt préclinique des organoïdes en cas de cancer chez l'humain (Aboukheyr Es et al., 2018).	90
Figure 32 : Stratégie de culture de tumoroïdes à partir de tumeurs mammaires canines (Raffo-Romero et al., 2022).	94

Liste des tableaux

Tableau 1 : Stades cliniques des tumeurs mammaires canines (D'après Owen et World Health Organization, 1980 ; Sorenmo et al., 2019 ; Sorenmo et al., 2009).....	26
Tableau 2 : Résumé des caractéristiques morphologiques des différents types de carcinomes mammaires (Selon Goldschmidt et al., 2011).	31
Tableau 3 : Stades histologiques des carcinomes mammaires canins selon Chocteau, Nguyen et Abadie (Selon Chocteau et al., 2019).	33
Tableau 4 : Critères histologiques pour déterminer le grade d'une tumeur mammaire maligne chez la femme (Selon Elston et Ellis, 1991).	35
Tableau 5 : Détermination du grade d'une tumeur mammaire maligne chez la femme (Selon Elston et Ellis, 1991).	36
Tableau 6 : Critères histologiques utilisés dans le grading de Peña & Clemente (Peña et al., 2013).	37
Tableau 7 : Détermination du grade du carcinome mammaire canin (Selon Peña et al., 2013).....	37
Tableau 8 : Extraits de données chiffrées relatives à la dissémination lymphatique (taux de survie) obtenues sur des études de cohorte de chiennes à tumeur(s) mammaire(s) maligne(s) (D'après Yamagami et al., 1996 ; Karayannopoulou et al., 2005).	61
Tableau 9 : Taux de survie en fonction du stade clinique TNM (<i>Tumor, Nodes, Metastasis</i>) au cours des deux années suivant la mammectomie (Yamagami <i>et al.</i> , 1996).....	62
Tableau 10 : Temps de survie médian (mois) en fonction du stade clinique TNM au cours des deux années suivant la mammectomie (Issu de Philibert <i>et al.</i> , 2003).....	62
Tableau 11 : Orientation pronostique en fonction de la valeur des critères cellulaires	63
Tableau 12 : Taux de survie obtenus par Karayannopoulou <i>et al.</i> dans leur cohorte de 85 chiennes à carcinomes mammaires (Karayannopoulou <i>et al.</i> , 2005).....	65
Tableau 13 : Temps de survie obtenus dans les études de cohorte de Santos <i>et al.</i> et Brunetti <i>et al.</i> en utilisant le système de grading de Elston & Ellis (ou méthode de Nottingham ou grade de Scarff-Bloom-Richardson découlant de ce dernier).	66
Tableau 14 : Pourcentages de récurrences et récurrences invasives obtenus dans l'étude de Gilbertson <i>et al.</i> dans la création de leur système de grading des tumeurs mammaires canines. .	67
Tableau 15 : Temps de survie obtenus dans les études de cohorte de Peña <i>et al.</i> et Carvalho <i>et al.</i> en utilisant le système de grading de Peña & Clemente.....	68
Tableau 16 : Relevé chiffré des études menées sur la valeur pronostique de l'immunophénotypage des tumeurs mammaires canines.	71
Tableau 17 : Comparatif entre les différents modèles expérimentaux utilisables en cancérologie (Issu de Yang <i>et al.</i> , 2020).	75
Tableau 18 : Résumé des caractéristiques épidémiologiques des animaux prélevés.	95
Tableau 19 : Statut histologique - immunophénotype des tumeurs prélevées.	96
Tableau 20 : Interprétation des lames histologiques et immunohistochimiques des organoïdes. .	97

Liste des abréviations

BMP : *Bone Morphogenetic Protein*
Cellules NK : *Cellules Natural Killer*
CFI : *Cancer-Free Interval*
CK : *Cytokératine*
CMI : *Carcinome Mammaire Inflammatoire*
CNA : *Copy Number Alteration*
COMT : *Catechol-O-methyltransferase*
DC : *Dendritic Cells*
EGF-R : *Epithelial Growth Factor Receptor*
ER : *Estrogen Receptor*
ERK : *Extracellular-Responses Kinase*
FGF : *Fibroblast Growth Factor*
FAM83 : *Family with Sequence Similarity 83 Member*
GH : *Growth Hormone* ou *Hormone de croissance*
HER2 : *Human Epidermal growth factor Receptor 2*
HPF : *High-Power Field* ou *Champ à fort grossissement*
IGF : *Insulin-like Growth Factor*
IL : *Interleukine*
L-MTP-PE : *Liposome-encapsulated Muramyl Tripeptide PhosphatidylEthanolamine*
LINC : *Linker of Nucléoskeleton and cytoskeleton*
MEC : *Matrice Extra-Cellulaire*
NKT : *Natural Killer T*
NL : *Nœuds lymphatiques*
NPI : *Nottingham Prognostic Index*
PDX : *Patient-Derived Xenograft*
PDTO : *Patient-Derived Tumor Organoid*
PI3K : *Phosphatidylinositol 3-Kinase*
PNN : *Polynucléaire neutrophile*
PR : *Progesterone Receptor*
RNC : *Rapport Nucléo-Cytoplasmique*
ROCK : *Rho-associated coiled-coil Containing protein Kinase*
SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*
TAMs : *Tumor-Associated Macrophages*
TILs : *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*
TLRs : *Toll-Like Receptors*
TMC : *Tumeurs Mammaires Canines*
TNF α : *Tumor Necrosis Factor α*

Introduction

Les organoïdes sont des structures multicellulaires tridimensionnelles cultivées en milieux enrichis spécifiques qui reproduisent *in vitro* des tumeurs prélevées au préalable et dont ils sont issus. Ils semblent être, à l'heure actuelle un modèle préclinique plus représentatif et éthique que les lignées cellulaires ou les xénogreffes pour tester l'efficacité et la toxicité des chimiothérapies. Ils sont par ailleurs de bons outils dans la recherche de nouvelles molécules et autres innovations thérapeutiques en cancérologie (immunothérapie, virothérapie...) (Yang *et al.*, 2020).

L'objectif de ce travail est de montrer que les organoïdes sont de bons modèles précliniques dans le cas du carcinome mammaire canin.

Il a été démontré que le carcinome mammaire canin était un bon modèle de comparaison de qualité du cancer du sein chez la femme de par ses similitudes sur de multiples aspects (macroscopiques, cliniques, histopathologiques, moléculaires, etc.) (Abdelmegeed et Mohammed, 2018).

Les organoïdes pourraient à l'avenir être utilisés non seulement en médecine humaine dans le cas du cancer du sein associé à un fort taux de mortalité chez la femme. En effet, la Société Américaine du Cancer a estimé le taux de nouveau diagnostic à 30 % chaque année. (« Breast Cancer Statistics | How Common Is Breast Cancer? », s. d.). Ils pourraient aussi potentiellement être utilisés en cancérologie vétérinaire par extension.

L'étude clinique menée au cours de cette thèse a consisté en la collection de carcinomes mammaires de chiennes prélevés à la suite d'exérèses chirurgicales réalisées dans diverses cliniques vétérinaires localisées aux alentours de Lille dans le Département du Nord en France mais également en Belgique. Une comparaison des profils histopathologiques et moléculaires de ces derniers avec leurs organoïdes correspondants a ensuite été réalisée.

Il s'agit donc ici d'étudier les organoïdes sont des modèles représentatifs des tumeurs mammaires.

Première partie : étude bibliographique

Dans un premier temps, une présentation des différentes données bibliographiques sur le carcinome mammaire canin sera réalisée. Cette partie sera surtout dédiée aux aspects histologiques et immunohistochimiques. Puis une vue d'ensemble des connaissances actuelles sur les organoïdes (leur utilité en recherche et leur application en médecine en tant que modèle préclinique sera proposée. On s'appuiera alors essentiellement sur l'exemple du carcinome mammaire canin.

1. Le carcinome mammaire canin

Après quelques rappels anatomiques et histologiques de la mamelle, il s'agira d'aborder une vue d'ensemble du carcinome mammaire chez la chienne en insistant plus particulièrement sur les aspects histopathologiques et d'immunophénotypage.

A. Rappels anatomiques et physiologiques de la mamelle chez le chien

a. Anatomie de la mamelle

La chienne possède généralement dix mamelles réparties en deux chaînes mammaires ; une à droite de la ligne blanche et une à gauche. On trouve dans l'ordre :

- Deux paires de mamelles thoraciques (M1 et M2)
- Deux paires de mamelles abdominales (M3 et M4)
- Une paire de mamelles inguinales (M5)

L'absence de M1 est fréquente en particulier chez les races de petits formats.

Concernant l'irrigation sanguine, les mamelles thoraciques M1 et M2 sont irriguées par l'artère épigastrique superficielle crâniale ainsi que des branches des artères thoraciques interne et accessoirement par les artères thoraciques latérale et intercostale. Les mamelles M4 et M5 sont quant à elles irriguées par l'artère épigastrique superficielle caudale. La mamelle M3 reçoit une irrigation des réseaux antérieur et postérieur puisqu'elle est alimentée par l'artère épigastrique superficielle crâniale qui s'anastomose avec l'artère épigastrique caudale (Figure 1) (Silver, 1966).

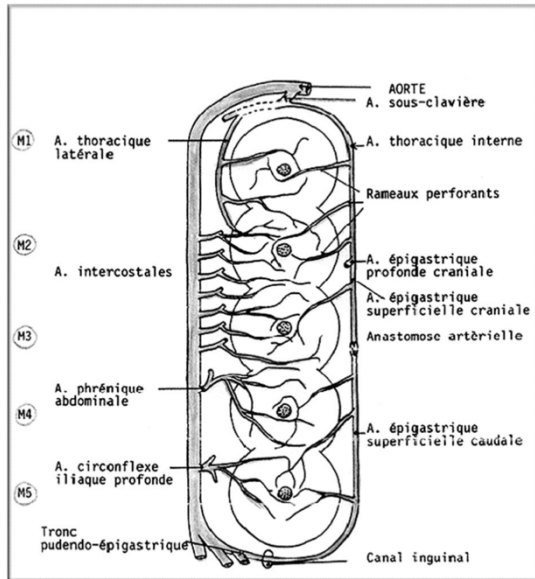


Figure 1 : Vascularisation artérielle des mamelles chez la chienne (D'après Silver, 1966).

Le drainage lymphatique est assuré par (Figure 2) :

- Les nœuds lymphatiques axillaires pour les mamelles thoraciques (M1 et M2) et les mamelles abdominales antérieures (M3).
- Les nœuds lymphatiques inguinaux superficiels et profonds pour les mamelles abdominales postérieures et inguinales (M4, M5) mais aussi les mamelles abdominales antérieures (M3).

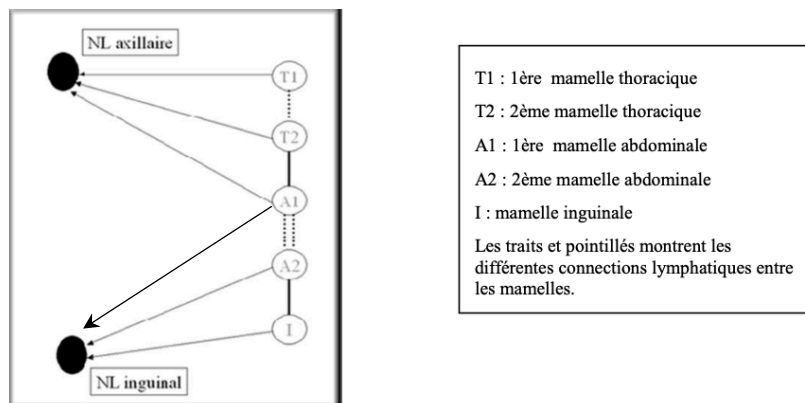


Figure 2 : Drainage et connexions lymphatiques des mamelles de la chienne (D'après Wellehan et al., 2003).

b. Histologie et Physiologie de la mamelle chez la chienne

La glande mammaire est une glande cutanée modifiée ; plus précisément une glande tubulo-alvéolaire apocrine qui commence à entamer son développement à l'état embryonnaire (mise en forme de la structure et localisation) et l'achève au cours de la puberté (élongation et embranchement du système canalaire, développement du tissu interstitiel, vascularisation) majoritairement sous le contrôle d'œstrogènes.

Le développement de la mamelle est complet à la fin de la première gestation ; la mamelle passe alors d'une structure majoritairement conjonctive à une structure épithélio-glandulaire active (Reece, s. d. ; Reece *et al.*, 2015).

- *Structure et histologie de la mamelle*

Le tissu mammaire est constitué de lobes mammaires qui regroupent plusieurs lobules divisés par du tissu conjonctif fibro-adipeux richement vascularisé en forme de grappe eux-mêmes composés de multiples « sacs glandulaires » bordés d'un épithélium simple nommés acini ou alvéole (Figure 3). Il est par ailleurs localisé dans du tissu sous-cutané riche en fibres de collagène et élastiques et en adipocytes.

Chaque lobule englobe un canal intralobulaire dans lequel sont recueillis les produits issus de la sécrétion mammaire. Les canaux intralobulaires fusionnent ensuite pour donner des canaux extralobulaires qui fusionneront à leur tour pour donner les canaux galactophores (ou lactifères) capables de se dilater pour stocker le lait.

Les canaux intralobulaires sont constitués d'un épithélium cubique simple et de cellules myoépithéliales fusiformes et les canaux extralobulaires d'un épithélium cubique simple en partie proximale puis bistratifié en partie distale et de quelques fibres musculaires lisses. Les conduits lactifères quant à eux se composent d'un épithélium cubique bistratifié et de fibres musculaires lisses.

Les cellules acineuses des alvéoles peuvent se différencier en cellules sécrétoires à l'origine de la production des composants du lait (lipides, protéines et lactose) en phase de lactation. On peut observer dans ces cas-là des gouttelettes lipidiques en région apicale. Des cellules myoépithéliales ou cellules de Boll se répartissent autour de ces cellules acineuses et permettent l'éjection du lait (Reece *et al.*, 2015).

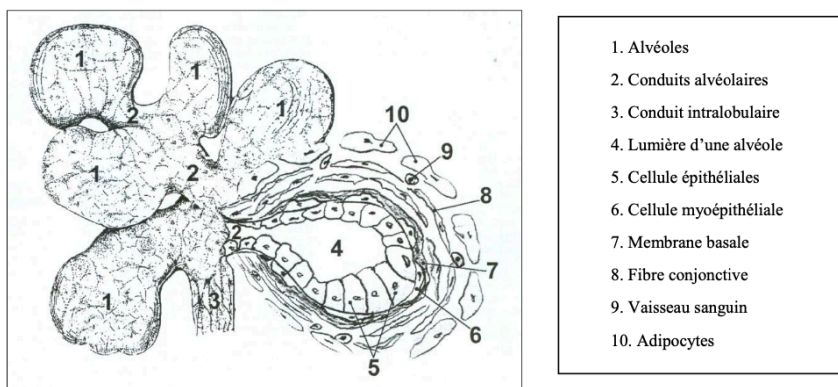


Figure 3 : Structure d'un lobule mammaire avec les détails d'une alvéole sectionnée et son stroma environnant (D'après Bisailon A., 2002).

- *Évolution de la glande mammaire au cours du cycle sexuel de la chienne*

La mamelle subit successivement des phases de développement, de sécrétion, d'involution et de repos au cours du cycle sexuel se traduisant par de nombreuses modifications histologiques (Figure 4 et 5) (Rehm *et al.*, 2007 ; M. Santos *et al.*, 2010 ; Sorenmo *et al.*, 2011).

Au cours du pro-oestrus, la glande mammaire est inactive et principalement constituée de canaux interlobulaires dans un tissu interstitiel dense. On retrouve également durant cette phase quelques lobules occasionnels.

Un début de prolifération de l'épithélium des canaux intralobulaires se met ensuite en place au cours de l'œstrus, à l'origine de la formation de petits lobules composés d'un épithélium pluristratifié.

En début de diœstrus, le taux élevé de progestérone (sécrétée par le corps jaune) accélère le développement des canaux intralobulaires et donc la formation de lobules. Les vaisseaux sanguins du tissu interstitiel sont alors congestionnés. En fin de diœstrus, le développement mammaire atteint son apogée avec la formation d'alvéoles sécrétoires (unités fondamentales de la glande) au niveau de la partie terminale des canaux intralobulaires.

Ces alvéoles deviennent moins sécrétoires en phase débutante d'anœstrus ; elles sont alors bordées par des cellules épithéliales vacuolaires avec une membrane basale plus importante. Les lobules montrent des modifications histologiques associées à la régression progressive mammaire avec une augmentation du tissu connectif et une infiltration lymphocytaire. En fin d'anœstrus, ces modifications deviennent alors plus marquées :

- La taille des lobules et le diamètre de la lumière des canaux sont diminués.
- Le tissu conjonctif intralobulaire devient plus proéminent et le stroma interlobulaire plus abondant et plus compact par densification du réseau de fibres de collagène.

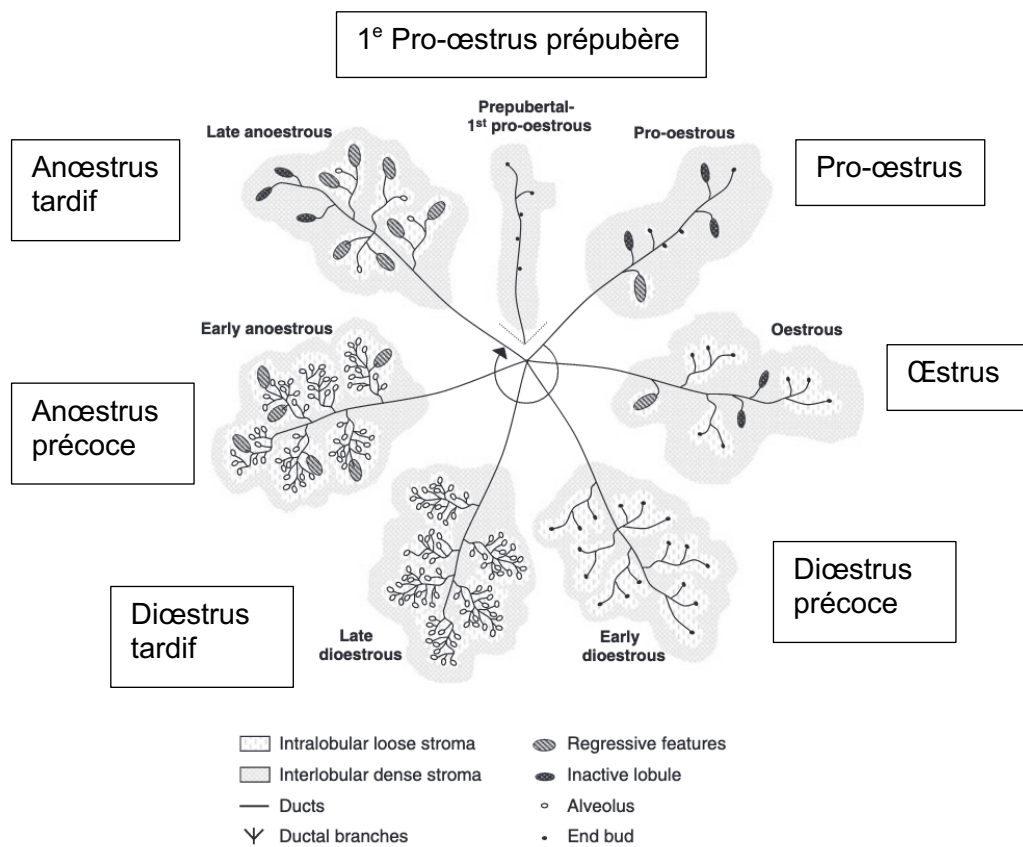


Figure 4 : Modifications histologiques du tissu mammaire au cours du cycle ovarien chez la chienne (Santos et al., 2010).

Intralobular loose stroma : stroma interlobulaire lâche

Interlobular dense stroma : stroma interlobulaire dense

Ducts : canaux

Ductal branches : branches canalaires

Regressive features : éléments en cours de dégénérescence

Inactive lobule : lobule inactif

Alveolus : alvéole

End bud : bouton terminal

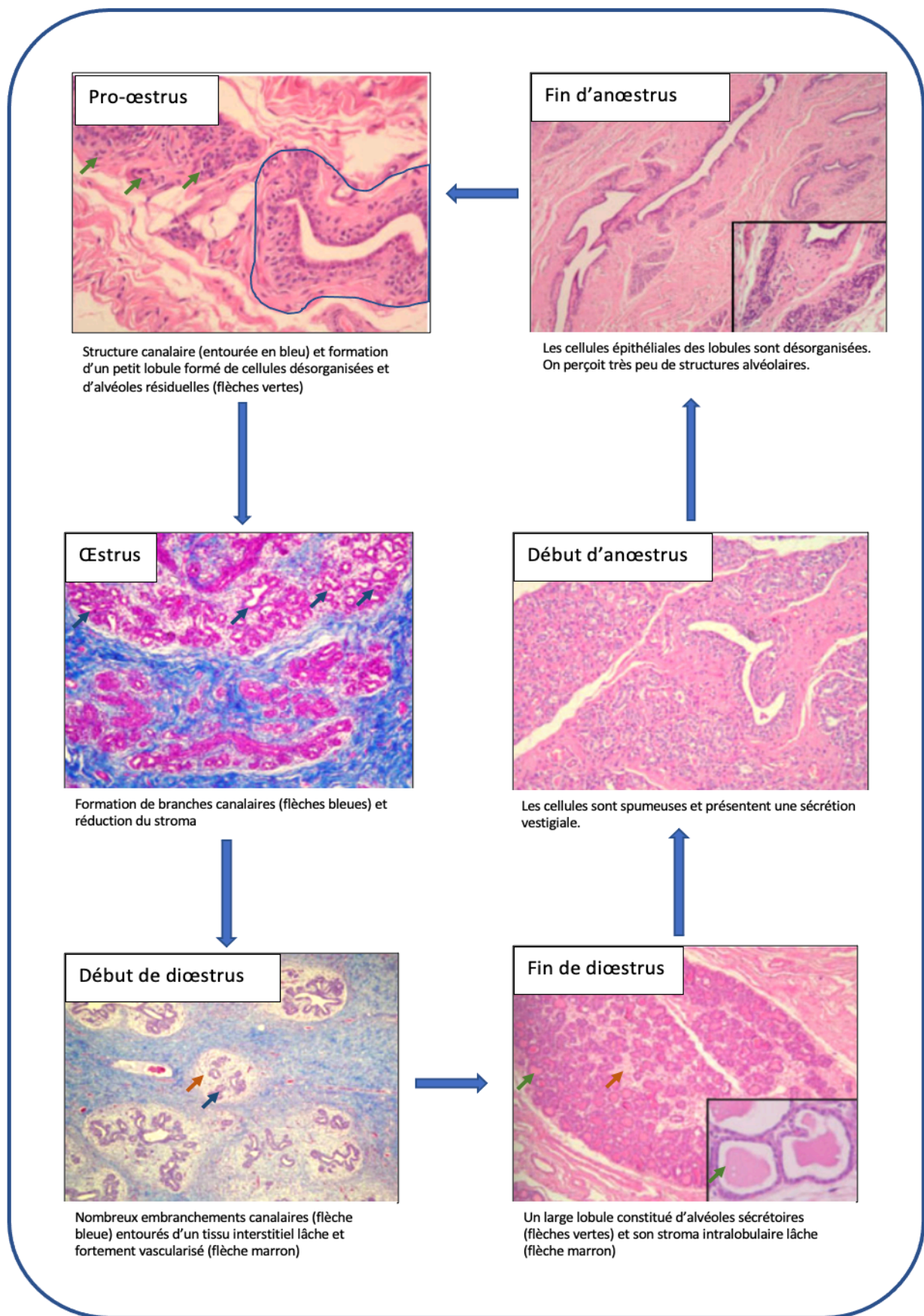


Figure 5 : Modifications histologiques subies par la glande mammaire au cours du cycle sexuel de la chienne (Santos et al., 2010).

- *Régulation endocrinienne du développement mammaire et de la lactogénèse*
 - Hormones stéroïdiennes

Le tissu glandulaire mammaire normal contient des récepteurs aux œstrogènes et des récepteurs à la progestérone.

Les œstrogènes sécrétés en majorité au cours du pro-œstrus et de l'œstrus stimulent la prolifération des cellules épithéliales du système canaliculaire et du stroma. La progestérone principalement sécrétée au cours du dioestrus, favorise quant à elle la prolifération des cellules myoépithéliales et du système alvéolaire.

Cela explique donc qu'au cours de la gestation, où le taux de progestérone est maintenu élevé dans l'organisme, les alvéoles et unités sécrétoires prennent de l'ampleur dans le tissu mammaire (Sherwood *et al.*, 2016).

- Prolactine

La prolactine est une hormone synthétisée par l'hypophyse antérieure et impliquée dans le processus de lactogénèse. Elle est contrôlée par la sécrétion de deux hormones hypothalamiques : la PRH (*Prolactin Releasing Hormone* ou hormone libératrice de la prolactine) et la PIH (*Prolactin Inhibiting Hormone* ou hormone inhibitrice de la prolactine qui est la dopamine).

Des concentrations élevées en prolactine contribuent au développement de la glande mammaire en induisant la synthèse des enzymes nécessaires à la production du lait.

En milieu de gestation chez la chienne, la glande mammaire est totalement capable de produire du lait mais les taux en œstrogènes et en progestérone maintenus élevés dans l'organisme inhibent l'action de la prolactine sur la sécrétion de lait. C'est lors de la chute brutale des concentrations en œstrogènes et en progestérone (due à la lutéolyse après relargage de prostaglandines), c'est-à-dire après expulsion du placenta au moment de la parturition que la lactation peut s'initier par désinhibition de la prolactine (Sherwood *et al.*, 2016).

- Ocytocine

L'ocytocine est un neuropeptide synthétisé par l'hypophyse postérieure ou neurohypophyse qui agit sur les muscles lisses de l'utérus et des glandes mammaires. Elle permet la contraction des muscles lisses des glandes mammaires et ainsi l'éjection du lait (Sherwood *et al.*, 2016).

- GH (*Growth Hormone*)

La synthèse de l'hormone de croissance GH (*Growth Hormone*) et de récepteurs à cette hormone par la glande mammaire est induite par des concentrations élevées en progestérone notamment au cours de la phase de prolifération mammaire en dioestrus. Elle permet d'accélérer le processus de développement canalaire (van Garderen et Schalken, 2002).

□ IGF-1 (Insulin Growth Factor-1)

L'IGF-1 est également impliqué dans la prolifération des cellules mammaires notamment au cours de la gestation.

En effet, une hausse de concentration en progestérone favoriserait la production autocrine de GH qui stimulerait directement la sécrétion locale et systémique d'IGF-1. Par ailleurs, cette sécrétion d'IGF-1 influencerait les taux d'œstrogènes. Une boucle hormonale d'entretien qui favoriserait ainsi la formation de tissu mammaire (Queiroga *et al.*, 2008).

En résumé, les œstrogènes et la GH permettent le développement du système canaliculaire et du stroma tandis que la progestérone et la prolactine permettent le développement du système alvéolaire. Le processus de lactogénèse est majoritairement contrôlé par la prolactine (Figure 6).

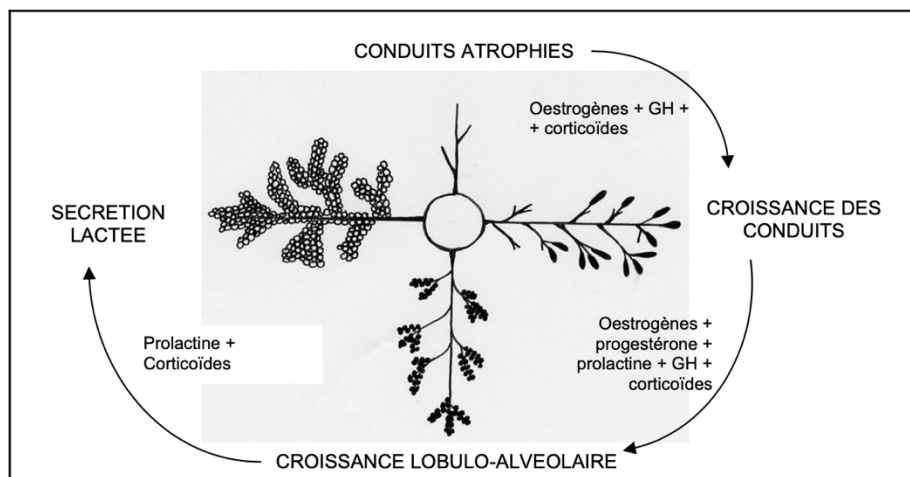


Figure 6 : Hormones impliquées dans le développement mammaire et la lactogénèse (D'après Klein, 2019).

B. Épidémiologie et facteurs de risque

Les tumeurs mammaires sont des affections fréquentes notamment chez la chienne âgée et entière.

Les diverses études réalisées en Europe montrent en moyenne une incidence annuelle de 200 cas pour 100 000 chiennes. (Dobson *et al.*, 2002 ; Vascellari *et al.*, 2016)

Elles représentent 27 % des tumeurs canines dans l'étude de Dessimoulie la situant ainsi au premier rang des tumeurs les plus représentées. (Dessimoulie, 2008).

La plupart des études réalisées sur les tumeurs mammaires chez la chienne recensent entre 30 % et 50 % de tumeurs mammaires malignes aussi appelées cancers mammaires (Perez Alenza *et al.*, 2000a ; Misdorp, 2002 ; Sorenmo, 2003 ; Merlo *et al.*, 2008 ; Santos *et al.*, 2015 ; Pastor *et al.*, 2018).

Les cancers mammaires représentent par ailleurs 70,5 % des cancers collectés sur les femelles dans l'étude sur l'incidence du cancer chez le chien de Merlo de 2008 (Merlo *et al.*, 2008).

a. Age

L'âge moyen d'apparition des tumeurs mammaires s'établit suivant les études entre 9 ans et 11 ans (Gama *et al.*, 2010 ; Hanzenne *et al.*, 2010 ; Lana, 2007 ; Misdorp, 2002 ; Pastor *et al.*, 2018 ; Perez Alenza *et al.*, 2000a ; Santos *et al.*, 2015). L'incidence augmente avec l'âge avec un pic à 9-11 ans (Figure 7) (Merlo *et al.*, 2008 ; Dessimoulie, 2008 ; Pastor *et al.*, 2018).

Les chiennes atteintes de tumeur(s) mammaire(s) maligne(s) sont significativement plus âgées que celles présentant une ou plusieurs tumeur(s) bénigne(s) ; 9,5 versus 8,5 ans (Pastor *et al.*, 2018 ; Sorenmo *et al.*, 2009 ; Vascellari *et al.*, 2016).

Le risque de développer un adénocarcinome mammaire (qui est un cancer mammaire) est 3,59 fois plus élevé à partir de 10 ans qu'en dessous de 9 ans chez la chienne selon l'étude épidémiologique de Dessimoulie. Dans cette étude, les chiennes atteintes de tumeur(s) mammaire(s) âgées de 10 ans et plus présentaient dans 57 % une tumeur maligne (Dessimoulie, 2008). Elles sont extrêmement rares avant l'âge de 5 ans (Perez Alenza *et al.*, 2000a).

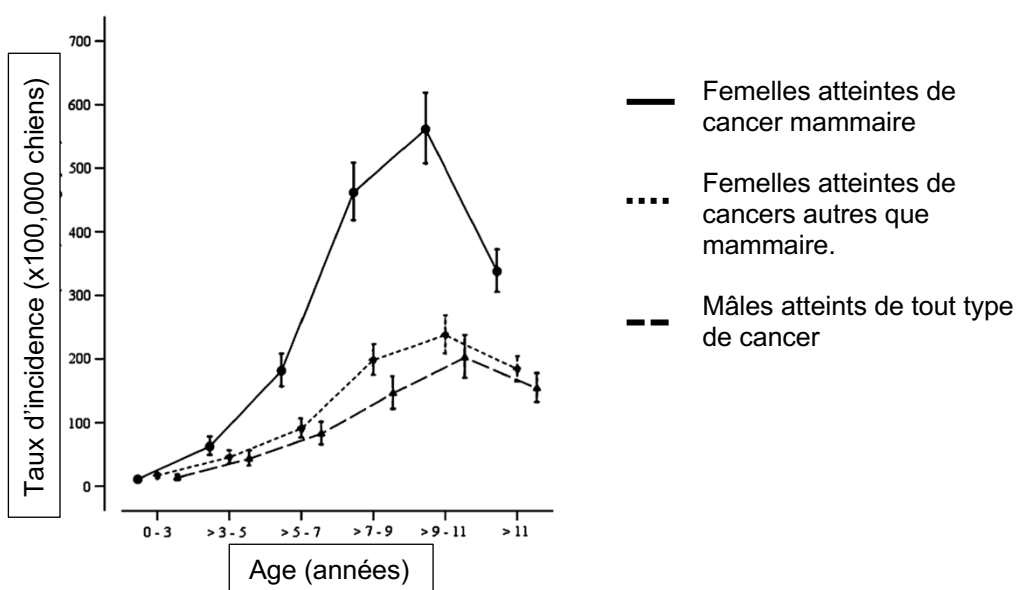


Figure 7 : Taux d'incidence du cancer mammaire en fonction de l'âge chez les chiennes (Représenté par la courbe à trait plein) (Merlo *et al.*, 2008).

b. Sexe

On retrouve dans la littérature sur une population de chiens recrutés pour tumeur mammaire 1 % de mâles (Dessimoulie, 2008). Ceci explique que nous nous restreindrons ici aux cas des chiennes.

c. Prédispositions raciales

Les tumeurs mammaires sont globalement plus souvent rencontrées sur des chiennes de petit et moyen formats (< 25 kg) (Hanzenne *et al.*, 2010 ; Moe, 2001 ; Mouneyrac, 2018 ; Pastor *et al.*, 2018).

Les différentes études épidémiologiques menées sur les tumeurs mammaires de la chienne montrent que les chiennes de pure race développent plus fréquemment de tumeur(s) mammaire(s) que les races croisées (Merlo *et al.*, 2008 ; Pastor *et al.*, 2018 ; Perez Alenza *et al.*, 2000a ; Vascellari *et al.*, 2016).

Selon les études, on retrouve différentes races avec un taux d'incidence d'apparition des tumeurs mammaires plus élevé : les Retriever, les chiens d'eau et les chiens de chasse (Épagneul Breton et Braque en majorité), les Teckel et les molossoïdes, les chiens de pâturage et les chiens de compagnie (Bouledogue, Boston Terrier, Cavalier King Charles...) (Lana, 2007 ; Moe, 2001 ; Pastor *et al.*, 2018 ; Perez Alenza *et al.*, 2000a ; Sorenmo *et al.*, 2009).

La race ne semble cependant pas intervenir sur la durée de survie et ne semble pas prédisposer à un type particulier d'adénocarcinome (Hanzenne *et al.*, 2010 ; Moe, 2001 ; Pastor *et al.*, 2018). Selon l'étude de Dessimoulie de 2018, le Caniche et le Bleu de Gascogne ont environ 2,5 fois plus de risques de développer des adénocarcinomes mammaires que les chiennes d'autres races (Dessimoulie, 2008).

d. Statut hormonal

La stérilisation a un rôle protecteur majeur contre l'apparition de tumeurs mammaires.

L'incidence des tumeurs mammaires est plus élevée chez les femelles entières (North et Banks, 2009). En effet, elles représentent 50 % à 70 % des tumeurs chez la chienne non stérilisée (Moe, 2001 ; Vascellari *et al.*, 2016).

Par ailleurs, les femelles entières développent plus souvent des formes malignes que les femelles stérilisées (Oliveira *et al.*, 2003 ; Pastor *et al.*, 2018 ; Vascellari *et al.*, 2016). En effet, 11,67 % des chiennes à cancers mammaires étaient stérilisées dans l'étude de Pastor menée en 2018 et 73 % des chiennes à adénocarcinomes mammaires n'étaient pas stérilisées dans l'étude épidémiologique de Hanzenne de 2010. Le statut hormonal ne semble cependant pas influencer sur la survie globale (Hanzenne *et al.*, 2010). Vascellari *et al.* (2016) observe enfin une plus grande proportion de carcinomes complexes chez les femelles entières (Vascellari *et al.*, 2016).

L'âge de stérilisation a également une influence prépondérante d'après l'étude princeps de Schneider menée en 1969. En effet la proportion de chiennes stérilisées ayant développé une tumeur mammaire maligne varie selon l'âge de stérilisation. Elle a été évaluée à 0,5 % lorsque la stérilisation a lieu avant les premières chaleurs, à 8 % entre les 1^e et les 2^e chaleurs et à 26 % entre les 2^e et les 3^e chaleurs. Après l'âge de 2,5 ans, la stérilisation perd son effet protecteur sur le cancer mammaire (Schneider *et al.*, 1969). Ces conclusions restent à l'heure actuelle à confirmer par des études sur de plus grands échantillons et avec un groupe contrôle comparable (Beauvais *et al.*, 2012).

C. Présentation clinique et démarche diagnostique

a. Évaluation clinique

La présentation d'une chienne pour tumeur mammaire implique le relevé d'une anamnèse (antécédents de tumeur(s) mammaire(s) et/ou de lactations de pseudo-gestation) et d'un examen clinique complet. Toute chienne entière âgée non présentée pour ce motif devrait subir un dépistage rapide par palpation des mamelles (Dobson *et al.*, 2002).

Les tumeurs mammaires peuvent se présenter sous forme de masse(s), de nodule(s) sous-cutané(s) ou de plaque(s) ferme(s). Elles peuvent être simples ou multiples, unilatérales ou multilatérales. Différents aspects cliniques sont associés à une croissance tumorale maligne comme la rapidité de croissance, l'adhérence de la masse aux plans musculaires profonds, la détection d'une chaleur locale, d'un œdème, ou d'une ulcération (Dobson *et al.*, 2002).

Les nœuds lymphatiques périphériques (axillaires et inguinaux) devront être palpés. Dans 10 % à 50 % des cas de tumeur(s) mammaire(s) chez la chienne une hypertrophie du ou des nœud(s) lymphatique(s) est retrouvée (Yamagami *et al.*, 1996). Une augmentation de la taille, une inflammation ou une adhérence détectée au niveau de ces derniers est en faveur d'une infiltration tumorale régionale qui sera par la suite un élément pronostique à prendre en compte. Cette infiltration devra cependant être évaluée par cytologie et/ou histologie.

La plupart des tumeurs mammaires canines concernent les mamelles M4 et M5 (60 % des cas) (Bostock, 1975a ; Mouneyrac, 2018). Les tissus mammaires et environnants y sont naturellement plus larges ; une palpation minutieuse devra donc être réalisée pour détecter des tumeurs de petite taille dans cette région (Cassali *et al.*, 2020 ; Sorenmo *et al.*, 2019).

Selon l'étude de Sorenmo de 2009, 70 % des chiennes ont plus d'un nodule lors du diagnostic (Sorenmo *et al.*, 2009).

b. Diagnostic

Pour déterminer la nature et les caractéristiques d'une tumeur mammaire, une cytologie de la ou des masse(s) mammaire(s) permettra dans un premier temps de savoir s'il s'agit bien d'une prolifération cellulaire de nature tumorale, de déterminer l'origine des cellules tumorales (dans le cas du carcinome mammaire, de cellules épithéliales) et enfin d'évaluer la malignité de la tumeur.

Cependant, la réalisation de la cytoponction est limitée par la taille des masses ou des nodules et la qualité du prélèvement. Il faut que le prélèvement soit représentatif des cellules de la lésion, que la quantité de cellules soit suffisante et qu'elles soient bien conservées.

Dans l'étude de Sorenmo de 2009, 67 % des chiennes à tumeur(s) mammaire(s) maligne(s) présentaient également des lésions histologiques bénignes concomitantes selon la section de la masse. On peut donc s'attendre à ce que la cytologie soit différente selon les angles d'introduction de l'aiguille fine (Sorenmo *et al.*, 2009).

Les critères de malignité utilisés en cytologie sont (Figure 8) (Sharkey et Radin, 2020) :

- L'hypercellularité,
- La présence de pléomorphisme cellulaire (anisocytose, macrocytose, rapport nucléocytoplasmique (RNC) élevé) et nucléaire (anisocaryose, macrocaryose, fragmentation nucléaire, multinucléation, chromatine « moulée »),
- Un nombre de mitoses augmenté,
- La présence de mitoses atypiques.

Pour le diagnostic de tumeur maligne, la sensibilité et la spécificité de la cytologie sont respectivement de 88 % et 96 %. La corrélation entre analyse cytologique et histologique est quant à elle comprise entre 68 % et 93 % selon les études (Cassali *et al.*, 2007 ; Simon *et al.*, 2009 ; Sorenmo *et al.*, 2019).

La cytoponction nous fournit donc plutôt un diagnostic d'orientation mais présente une bonne spécificité dans la détection de tumeur(s) mammaire(s) maligne(s).

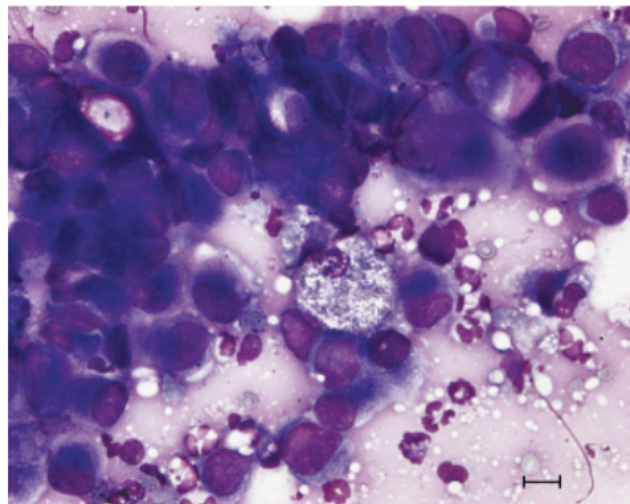


Figure 8 : Cytoponction à l'aiguille fine d'une masse mammaire d'une chienne (Issue de Burton, 2017).

On observe une population cellulaire de type épithéliale glandulaire aux critères de malignité marqués (anisocaryose, macrocaryose, macronucléoles) en faveur d'un diagnostic de carcinome.

Dans la majorité des cas, le diagnostic se base sur un examen histologique de la tumeur dit « gold standard » (Magnol *et al.*, 1998). On peut le réaliser avant exérèse chirurgicale par biopsies. L'intérêt est alors d'émettre un diagnostic de certitude (type et malignité de la tumeur) et d'évaluer le grade histologique (*cf. partie D*) avant intervention chirurgicale. En réalité, cet examen est généralement réalisé après exérèse chirurgicale. C'est un élément déterminant dans l'évaluation du pronostic et dans le choix ou non d'utiliser des thérapies complémentaires après chirurgie (« Confirmer et préciser le diagnostic d'une tumeur », s. d.).

c. Syndromes paranéoplasiques

Les trois principaux syndromes paranéoplasiques retrouvés en cas de cancers mammaires sont : la fièvre, la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et le syndrome de Cadiot-Ball ou ostéopathie hypertrophique qui se traduit par une réaction périostée diaphysaire des os longs et se caractérise par des déformations douloureuses des extrémités distales d'un ou de plusieurs membres (Figure 9) (Sorenmo *et al.*, 2019).



Figure 9 : Lésion d'ostéopathie hypertrophique secondaire sur les extrémités distales du radius et de l'ulna d'une chienne atteinte d'une tumeur mammaire maligne (Issue de « VET-ORTHOPEDIE » Pages s. d.).

d. Bilan d'extension régionale et générale

En moyenne, 30 % des tumeurs mammaires malignes ont une évolution métastatique (Santos *et al.*, 2015). Étant donné le risque élevé de dissémination métastatique, un bilan d'extension est préconisé avant d'envisager toute prise en charge thérapeutique en particulier s'il s'agit d'une petite tumeur où la réalisation d'une analyse cytologique et histologique est compromise.

La voie préférentielle de dissémination métastatique pour les carcinomes est la voie lymphatique (North et Banks, 2009).

La principale localisation de métastases à distance des carcinomes mammaires canins sont les nœud lymphatique drainant la mamelle affectée et les poumons. On en trouve également dans le foie et les os, et de manière plus anecdotique, l'encéphale. L'animal peut présenter selon la localisation des métastases divers signes cliniques comme une dyspnée, une boiterie, des signes nerveux, de la léthargie, de la fatigue et une perte de poids. La sévérité des signes dépend de la localisation et de l'étendue des métastases (Magnol *et al.*, 1998 ; Sorenmo, 2003).

Pour cela, plusieurs examens complémentaires peuvent être envisagés avant d'envisager une exérèse chirurgicale. Dans un premier temps, des analyses sanguines seront réalisées pour bilan pré-anesthésique. Elles permettent également de soupçonner une atteinte hépatique ou encéphalique.

L'évaluation des nœuds lymphatiques par palpation est difficile (notamment pour les nœuds lymphatiques axillaires et inguinaux), peu sensible, peu spécifique (une hypertrophie peut correspondre à un processus inflammatoire) et subjective. Des cytoponctions des nœuds lymphatiques loco-régionaux (axillaires et inguinaux superficiels) sont donc préconisées pour détecter la présence de cellules épithéliales tumorales et donc une extension régionale de la tumeur (Figure 10).

On aborde également le potentiel intérêt de réaliser une cartographie des nœuds lymphatiques sentinelles par scintigraphie (avec du technétium, de l'héméosidérine autogène, ...). Très peu d'études ont été menées sur le chien quant à l'utilisation de cet outil potentiellement diagnostique et pronostique (Sorenmo *et al.*, 2019).

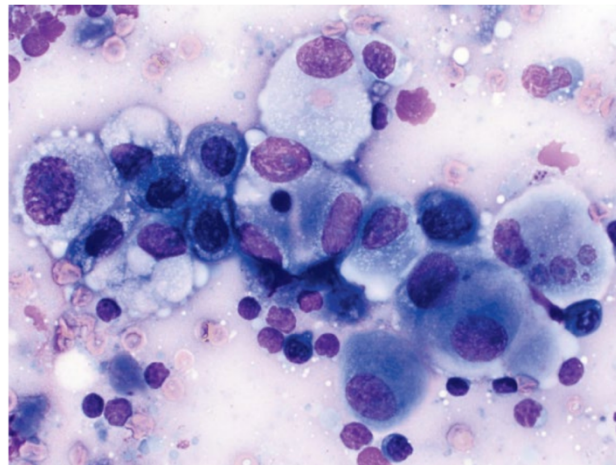


Figure 10 : Cytoponction d'un nœud lymphatique (x50) avec présence de cellules carcinomateuses (Issue de Burton, 2017).

La radiographie thoracique reste l'examen complémentaire le plus utilisé pour détecter les métastases pulmonaires car il s'agit d'un examen simple à mettre en œuvre, rapide et peu coûteux. Il s'agit d'une étape primordiale dans la démarche diagnostique notamment dans l'évaluation du stade clinique (*cf. partie C.d.*). On réalise généralement deux clichés orthogonaux. Des images nodulaires homogènes sont en faveur de la présence de métastases pulmonaires mais aucun diagnostic de certitude ne peut être établi. Lorsqu'elles sont nombreuses et de grande taille (> 1 cm), on parle d'image radiographique en « lâcher de ballons ». La radiographie pulmonaire est une technique peu sensible car elle ne permet de visualiser que des métastases de taille supérieure à 5 mm. Le rôle principal de la radiographie est de sélectionner les patients qui d'après l'anamnèse et les images obtenues nécessitent d'autres examens pour confirmer le diagnostic ou envisager une intervention chirurgicale (Schevenement, 2010).

Le scanner est une technique d'imagerie plus sensible. Il permet quant à lui de visualiser des métastases de taille supérieure à 2 mm et donc de détecter plus précocement une infiltration pulmonaire (Pückler, 2021).

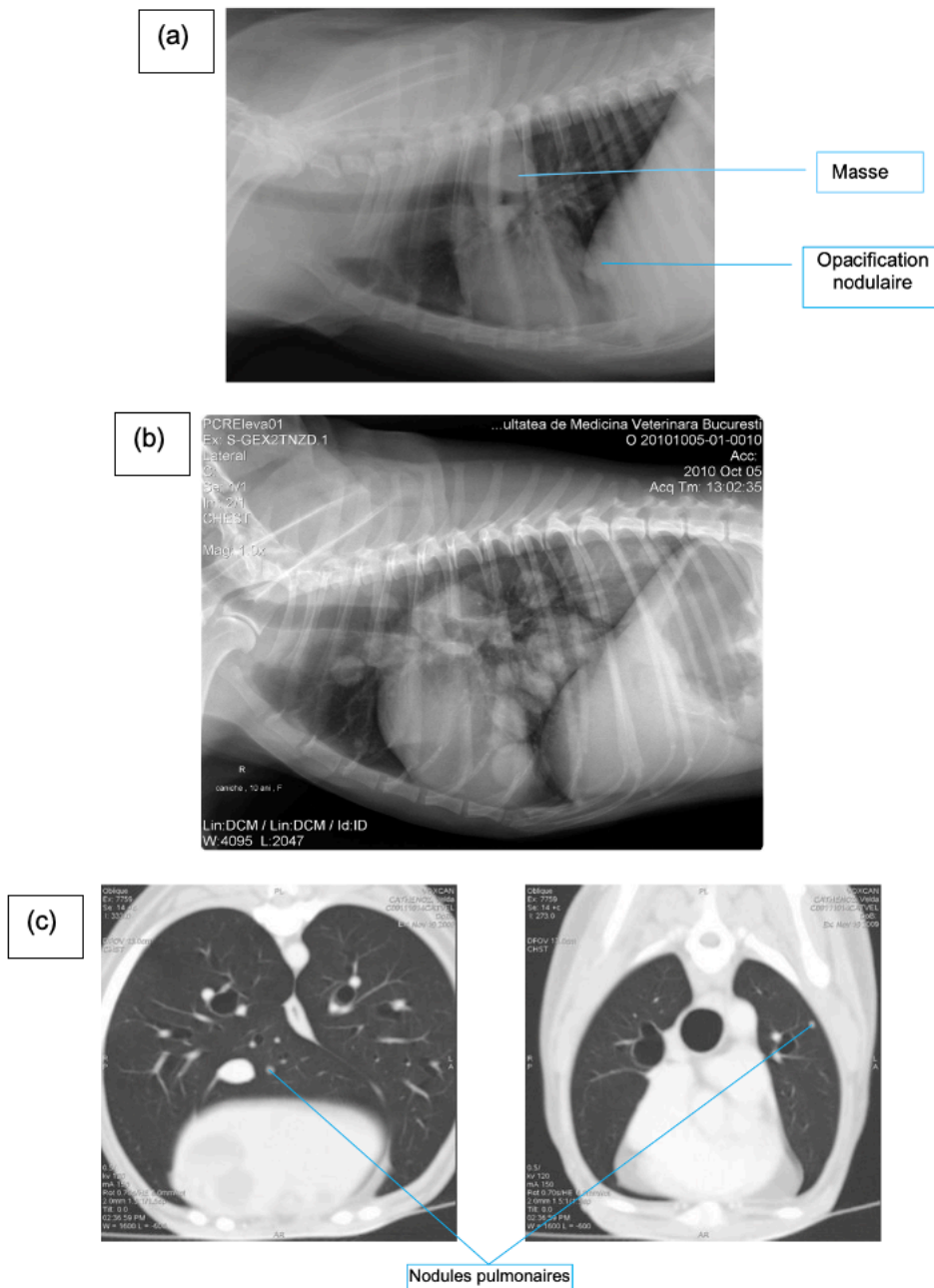


Figure 11 : Images radiographiques et tomodensitométriques thoraciques de chiennes dans le cadre de bilan d'extension en cas de tumeur mammaire

- (a) Radiographie thoracique du profil droit d'un chien Beagle de 15 ans présenté pour nodules mammaires (SCHEVENEMENT, 2010) (Service d'Imagerie Médicale de l'ENVL).
- (b) Radiographie du profil droit d'une chienne Caniche de 10 ans montrant de multiples nodules pulmonaires en « lâcher de ballons » (Issue de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Bucharest).
- (c) Images tomodensitométriques d'un chien de 12 ans suivi pour carcinome mammaire : coupes transversales du thorax en « fenêtre pulmonaire » (SCHEVENEMENT, 2010) (Service d'Imagerie Médicale de l'ENVL).

Une échographie abdominale pourra être envisagée sur des chiennes chez qui l'on suspecte une atteinte lymphatique régionale et/ou chez qui des modifications biochimiques chimiques ont été mises en évidence (par exemple, une augmentation des phosphatases alcalines pourrait être en faveur d'une infiltration hépatique) (Sorenmo *et al.*, 2019).

e. Stade clinique : Classification TNM

Le stade TNM (*Tumors, Nodes, Metastasis*) correspond à l'étendue du cancer. Il permet d'évaluer le degré d'évolution de la tumeur, la stratégie thérapeutique et apporte une valeur pronostique. On classe ainsi les tumeurs mammaires selon trois critères (Tableau 1) :

- L'extension locale (T pour *Tumors*) : taille et infiltration de la tumeur ;
- L'extension régionale (N pour *Nodes*) : envahissement ou non des nœuds lymphatiques, nombre et emplacement (confirmé par diagnostic histologique après retrait des nœuds lymphatiques) ;
- L'extension à distance (M pour *Metastasis*) : présence ou non de métastases dans des organes à distance.

Stade	Extension locale : Taille de la tumeur	Extension régionale : Infiltration des nœuds lymphatiques régionaux	Extension à distance : Métastases
Stade I	$T_1 < 3$ cm	N_0	M_0
Stade II	T_2 3-5 cm	N_0	M_0
Stade III	$T_3 > 5$ cm	N_0	M_0
Stade IV	T_1, T_2, T_3	N_1 (Infiltration d'au moins un nœud lymphatique)	M_0
Stade V	T_1, T_2, T_3	N_0, N_1	M_1 (Présence de métastases)

Tableau 1 : Stades cliniques des tumeurs mammaires canines (D'après Owen et World Health Organization, 1980 ; Sorenmo *et al.*, 2019 ; Sorenmo *et al.*, 2009).

Des suffixes sont également attribués pour les stades T1 et T3 selon l'adhérence de la masse aux tissus profonds :

- a) Non adhérent
- b) Adhérent à la peau
- c) Adhérent au muscle

On utilisera cette classification uniquement pour des tumeurs épithéliales (non inflammatoires) et non pour les sarcomes (Bobillier, 2018 ; Sorenmo *et al.*, 2019).

D. Histopathologie et immunophénotypage

Le diagnostic de certitude de la nature des tumeurs mammaires repose sur l'examen histologique. L'immunohistochimie permet par ailleurs d'analyser les profils d'expression de protéines cellulaires. Elle est ainsi utilisée comme outil de compréhension de la cancérogenèse ou de détection du cancer mais aussi comme élément pronostique et prédictif.

L'établissement de classifications histologiques et moléculaires des carcinomes mammaires chez la chienne permet ainsi au vétérinaire d'évaluer assez rapidement et efficacement un pronostic ; et donc d'orienter son plan thérapeutique.

a. Classification histologique

- *Nomenclature et définitions*

Les carcinomes dérivent des cellules épithéliales. On parle d' « adénocarcinome » quand ils dérivent de cellules épithéliales glandulaires. Les sarcomes sont des tumeurs dérivant des cellules mésenchymateuses.

Une tumeur est dite « simple » lorsqu'elle est constituée uniquement de cellules épithéliales et « complexe » lorsqu'elle est constituée de cellules épithéliales et myoépithéliales. Dans le cas du carcinome complexe, la composante maligne ne concerne que la partie épithéliale de la tumeur. Un carcinosarcome est une tumeur mixte c'est-à-dire un carcinome complexe au sein duquel des remaniements métaplasiques (formation de tissu osseux, cartilagineux ou graisseux) se sont réalisés au sein de la composante myoépithéliale (Magnol *et al.*, 1998).

Les tumeurs qualifiées de « canalaire » sont des tumeurs issues des canaux interlobulaires. Elles seront qualifiées de « lobulaires » dans le cas où elles sont issues des acini ou des canaux intralobulaires (Sorenmo *et al.*, 2019).

- *Critères de malignité*

La première difficulté est de déterminer si les tumeurs analysées sont bénignes ou malignes. Les critères de malignité utilisés par Goldschmidt sont (Goldschmidt *et al.*, 2011) :

- Le type tumoral,
- La présence de pléomorphisme nucléaire et cellulaire (anisocytose, anisocaryose, macronucléoles, multinucléation, RNC élevé...),
- La présence de zones nécrotiques distribuées aléatoirement au sein de la tumeur,
- L'infiltration péritumorale et lymphatique,
- La présence de métastases dans les nœuds lymphatiques loco-régionaux.

- *Méthodes de classification histologique et caractéristiques morphologiques*
 - Classification descriptive adaptée aux carcinomes mammaires canins de Goldschmidt

La première classification histologique nommée classification WHO (*World Health Organization*) des tumeurs chez les carnivores domestiques incluant les tumeurs et les dysplasies mammaires a été établie en 1974 par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et se base sur la classification utilisée pour le cancer du sein chez la femme. Elle divisait les tumeurs mammaires en cinq groupes : les carcinomes, les sarcomes, les ostéosarcomes, les tumeurs bénignes et les tumeurs non classées. Des modifications de cette classification en 1999 a abouti à une réorganisation des différents sarcomes.

En 2010, une classification adaptée aux carcinomes mammaires canins a été proposée par Goldschmidt. Dans cette classification certains types de tumeurs ont été individualisés et reconnus comme entités et certaines tumeurs considérées bénignes à l'origine sont désormais considérées malignes (Goldschmidt *et al.*, 2011). Par rapport à la classification WHO, elle prend en compte 6 sous-types supplémentaires : le carcinome cribiforme, le carcinome micro-papillaire infiltrant, le comédocarcinome, le carcinome papillaire intra-ductulaire, le carcinome et myoépithéliome malin (Figure 12, Tableau 2) (Catoio, 2014).

Pour le myoépithéliome malin, les cellules sont fusiformes et entourées d'une matrice myxoïde. Quant au carcinome anaplasique, il ne peut être classé comme adénocarcinome, carcinome solide, carcinome squameux ou mucineux car aucun trait ne prédomine sur un autre. Il est caractérisé par une invasion étendue des vaisseaux lymphatiques environnants par des embolus vasculaires. Dans le cas où cet envahissement aboutit à la formation d'œdèmes sévères notamment lorsque les vaisseaux lymphatiques dermiques sont atteints, on parle alors de carcinome inflammatoire qui est une entité tumorale à part entière dans cette classification (Bobillier, 2018 ; Goldschmidt *et al.*, 2011).

1 : Tumeurs épithéliales malignes

Carcinome-in situ
Carcinome simple
a. Tubulaire
b. Tubulopapillaire
c. Cystique-papillaire
d. Cribriforme
Carcinome micropapillaire invasif
Carcinome solide
Comedocarcinome
Carcinome anaplasique
Carcinome se développant dans un adénome complexe ou dans une tumeur mixte

Carcinome complexe
Carcinome et myoépithéliome malin
Carcinome mixte
Carcinome canalaire
Carcinome papillaire intracanaire

2. Types particuliers de tumeurs épithéliales malignes

Carcinome squameux
Carcinome adénoquameux
Carcinome mucineux
Carcinome sécrétoire (riche en lipide)
Carcinome à cellules fusiformes
Myoépithéliome malin
Variant Carcinome squameux
Variant carcinome
Carcinome inflammatoire

3. Tumeurs mésoenchymateuses malignes : les sarcomes

Ostéosarcome
Chondrosarcome
Fibrosarcome
Hémangiosarcome
Autres sarcomes

4. Carcinosarcomes : Tumeurs mammaires mixtes malignes

5. Tumeurs bénignes

Adénome simple
Adénome papillaire intracanaire (papillome canalaire)
Adénome canalaire (adénome basaloïde)
Fibroadénome
Myoépithéliome
Adénome complexe (Adénomyoépithéliome)
Tumeur mixte bénigne

6. Hyperplasies et dysplasies

Ectasies canalaire
Hyperplasie lobulaire (adénose)
Régulière
Avec une activité sécrétoire (lactique)
Avec de la fibrose
Avec des atypies
Epithéliose
Papillomatose
Modification fibroadénomateuse
Gynécomastie

7. Tumeurs du téton

Adénome
Carcinome
Carcinome avec infiltration de l'épiderme

8. Hyperplasies et dysplasies du téton

Mélanose de la peau du téton

Figure 12 : Classification histologique des différentes tumeurs et dysplasies mammaires de la chienne selon Goldschmidt (2010) (Goldschmidt et al., 2011 ; Bobillier, 2018).

Type histologique	Sous-type histologique	Architecture	Caractéristiques microscopiques
Carcinome <i>in situ</i>		<p>Nodule bien délimité à densité cellulaire forte et composé d'amas cellulaires en forme de tubules irréguliers n'ayant pas envahi la lame basale du tissu mammaire.</p> <p>Difficulté à différencier des lésions hyperplasiques et dysplasiques atypiques.</p>	<p>Perte de polarité cellulaire et nucléaire avec anisocytose et anisocaryose.</p> <p>Cytoplasme éosinophile.</p> <p>Activité mitotique faible</p> <p>RNC élevé, noyau hyperchromatique à chromatine dense basophile.</p>
Carcinome simple	Tubulaire	Arrangement cellulaire sous forme de tubules bien délimités associés dans un stroma fibrovasculaire.	<p>Possibles micro- ou macronucléoles.</p> <p>Cytoplasme éosinophile.</p> <p>Activité mitotique variable.</p>
	Tubulo-papillaire	Tubules majoritairement arrangés sous forme de papilles pédonculées ou sessiles et supportés par un stroma fibrovasculaire fin.	(Cf. tubulaire)
	Papillaire kystique	Papilles étendues à lumière dilatée d'aspect kystique.	Contenu éosinophile avec macrophages et neutrophiles dégénérés.
	Cribiforme	Arrangement cellulaire sous forme de passoire. La lumière est alors entourée de ponts de cellules tumorales.	<p>Anisocaryose et anisocytose modérée.</p> <p>Index mitotique variable.</p>
Carcinome micro-papillaire invasif		<p>Présence d'un ou plusieurs agrégats cellulaires intracanalaires et de papilles non supportées par un stroma et entourées d'espaces lacunaires.</p> <p>Souvent associé à une infiltration dans les tissus périphériques.</p>	<p>Cytoplasme éosinophile.</p> <p>RNC élevé.</p> <p>Macronucléoles, chromatine dense et granuleuse.</p> <p>Anisocytose et anisocaryose modérée à sévère.</p> <p>Activité mitotique élevée.</p>
Carcinome solide ou trabéculaire		Amas cellulaires denses et irréguliers en forme de nids ou cordons formant des lobules.	Chromatine en pointillé.

			<p>Noyau hyperchromatique et nucléole basophile.</p> <p>Anisocytose et anisocaryose modérée à sévère.</p> <p>Activité mitotique variable.</p>
Comédocarcinome		Présence de zones nécrotiques (éosinophiles) au centre de la tumeur.	Matériel éosinophile avec débris cellulaires, neutrophiles nécrotiques et macrophages.
Carcinome squameux		<p>Composé d'un épithélium squameux (les cellules sont soit d'origine canalaire extra-lobulaire soit d'origine canalaire mammaire ayant subi une métaplasie squameuse).</p> <p>Formation de perles de kératine.</p>	Présence de filaments de kératine.
Carcinome mucineux		Production de mucine et présence d'une matrice myxoïde.	
Carcinome se développant dans un adénome complexe ou une tumeur mixte		Tumeur bénigne sur laquelle repose des amas de cellules épithéliales pléomorphiques avec un nombre élevé de mitoses.	
Carcinome canalaire		<p>Amas cellulaires arrangés en cordons ou tubules entourant une lumière en forme de fente et entourées d'une couche de cellules myoépithéliales.</p> <p>Possible extension des cellules basales et myoépithéliales.</p>	<p>Présence d'anisocytose et d'anisocaryose marquée.</p> <p>Activité mitotique intense.</p>
Carcinome papillaire intra-canaire		Prolifération de cellules épithéliales en plusieurs couches formant des papilles intra-canales entourées d'un tissu conjonctif fibreux et de cellules myoépithéliales.	

Tableau 2 : Résumé des caractéristiques morphologiques des différents types de carcinomes mammaires (Selon Goldschmidt et al., 2011).

□ Stade histologique de Chocteau, Nguyen et Abadie

Chocteau, Nguyen et Abadie ont proposé en 2017 un nouveau système de classification plus précis et plus fiable que le système de classification clinique TNM (Chocteau *et al.*, 2019). Ce système est inspiré de celui créé par l'AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) en 2007 pour le cancer du sein et adapté au carcinome mammaire canin (Tableau 3, Figure 13).

Dans cette classification, le stade T est remplacé par la « taille tumorale pathologique » (pT) (qui correspond au plus large diamètre en millimètres sur les lames histologiques) et N par le « stade ganglionnaire pathologique » (pN) (confirmé par immunohistochimie). Les deux autres critères utilisés sont l'invasion péritumorale (nommée *invasion*) et lymphovasculaire (LVI). Leur étude a montré que ce système était fortement associé au devenir des chiennes à carcinomes mammaires (suivis pendant 2 ans après exérèse chirurgicale) et est un outil d'utilité majeure dans le choix des options thérapeutiques (notamment dans la mise en place d'une chimiothérapie adjuvante) (Chocteau *et al.*, 2019).

Pour définir le stade histologique, on détermine dans un premier temps le caractère invasif ou *in situ* du carcinome mammaire par immunomarquage de p63 (*cf. partie C.d Immunophénotypage*). Ce marqueur permet d'identifier la présence ou non de cellules myoépithéliales (par marquage nucléaire et membranaire) autour des cellules néoplasiques. On retrouve ces cellules adjacentes dans le cas du carcinome *in situ* (Chocteau *et al.*, 2019).

Cette classification histologique présente cependant quelques limites. Elle ne s'applique qu'aux carcinomes et non aux carcinosarcomes ou sarcomes mammaires ; qui plus est uniquement aux carcinomes de stade TNM I à III c'est-à-dire sans métastases à distance. Par ailleurs, elle est inspirée de la septième édition de la classification de l'AJCC dont il existe déjà une huitième réédition depuis 2017 (Chocteau *et al.*, 2019 ; Mouneyrac, 2018).

Stade	Invasion	Taille pathologique de la tumeur	Invasion lymphovasculaire	Stade ganglionnaire pathologique
Stade 0	<i>In situ</i> (p63+)	Toute taille	LVI-	pN0 ou pNX
Stade I	Invasif (p63-)	pT1 ≤ 20 mm	LVI-	pN0 ou pNX
Stade II	Invasif (p63-)	pT2 > 20 mm	LVI+ et/ou pN+	
Stade IIIA	Invasif (p63-)	pT1 ≤ 20 mm		
Stade IIIB	Invasif (p63-)	pT2 > 20 mm		

Tableau 3 : Stades histologiques des carcinomes mammaires canins selon Chocteau, Nguyen et Abadie (Selon Chocteau et al., 2019).

LVI- : absence d'invasion lymphovasculaire

LVI+ : présence d'invasion lymphovasculaire

pN0 : absence de métastases dans les nœuds lymphatiques

pN+ : présence de métastases dans les nœuds lymphatiques

pNX : stade ganglionnaire inconnu

pT1 : tumeur de taille ≤ 20 mm

pT2 : tumeur de taille > 20 mm

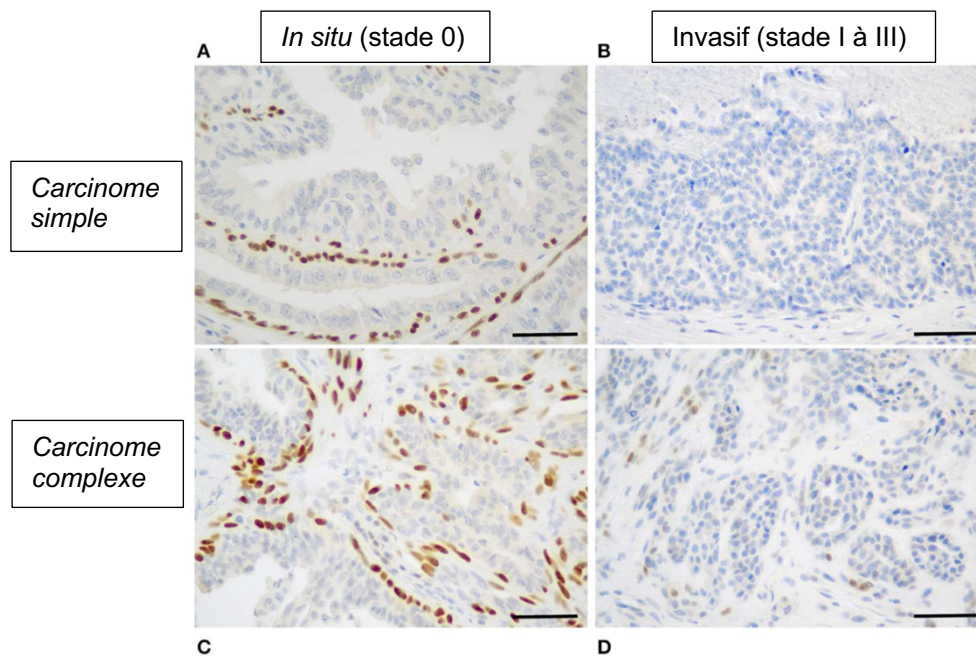


Figure 13 : Identification des carcinomes mammaires de stade 0 (*in situ*) par immunohistochimie de p63 (D'après Chocteau et al., 2019).

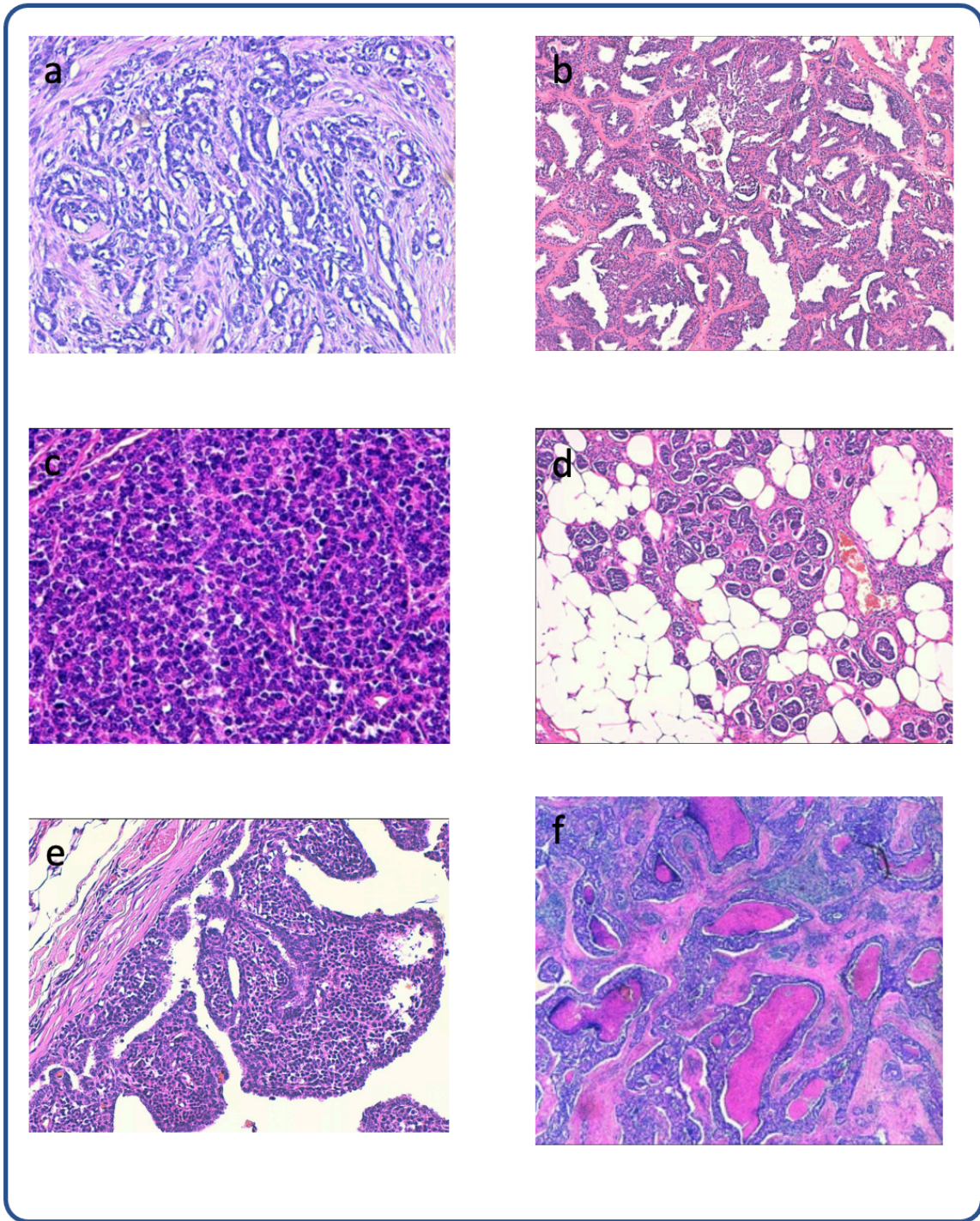


Figure 14 : Photographies histologiques réalisées par le LAPVSO (Laboratoire Anatomie pathologique Vétérinaire du Sud-Ouest) de plusieurs types de carcinomes mammaires chez la chienne classés selon Goldschmidt après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine : (a) Carcinome simple tubuleux Gx400 ; (b) Carcinome papillaire kystique Gx100 ; (c) Carcinome solide Gx400 ; (d) Carcinome micropapillaire Gx100 ; (e) Carcinome ductulaire Gx200 ; (f) Comédocarcinome Gx40 (Issues de Catoio, 2014) (G : Grossissement)

b. Grading histologique

Le grade est une évaluation de la différenciation d'un cancer à partir de critères histologiques (variables selon le grading utilisé) afin de prévoir son évolution et son pronostic. Cette évaluation ne se base pas uniquement sur le type histologique déterminé après analyse mais aussi sur la présence de pléomorphisme nucléaire, sur l'index mitotique, la présence d'aires de nécrose, l'étendue de l'invasion péritumorale et lymphatique mais aussi la présence ou non de métastases locorégionales (Kaszak *et al.*, 2018). Il ne mesure pas l'avancement du cancer. Il s'exprime généralement sous forme de note (I, II ou III) ou de niveau (bas, intermédiaire ou élevé) (North et Banks, 2009 ; Sorenmo *et al.*, 2019).

Plusieurs systèmes de grading sont actuellement utilisés pour le carcinome mammaire canin :

- Le grading de Elston et Ellis c'est-à-dire celui utilisé chez la femme pour le cancer du sein (qui est la dernière modification du grading de Scarff, Bloom et Richardson) applicable au chien selon certaines études (Karayannopoulou *et al.*, 2005).
- Le grading de Gilbertson adapté aux carcinomes mammaires canins ; il s'applique à tous les carcinomes qu'ils soient *in situ* ou infiltrants.
- Le grading de Peña & Clemente qui s'applique à tous les carcinomes mammaires du chien mais pas aux carcinosarcomes et aux sarcomes.

- *Grading de Elston et Ellis ou Méthode de Nottingham*

Le grade de chaque tumeur est déterminé par l'association de trois critères : la formation de tubes, le pléomorphisme nucléaire et l'index mitotique (Tableaux 4 et 5) (Elston et Ellis, 1991).

	Formation de tubes	Pléomorphisme nucléaire	Nombres de mitoses pour 10 champs microscopiques
1 point	Nombreuse (> 75 %)	Petits noyaux	0 - 10
2 points	Modérée (10 - 75 %)	Augmentation de taille modérée	10 - 19
3 points	Peu ou pas de formation (< 10 %)	Variations marquées	>20

Tableau 4 : Critères histologiques pour déterminer le grade d'une tumeur mammaire maligne chez la femme (Selon Elston et Ellis, 1991).

Score total	Grade de malignité
3 à 5	I : Tumeur bien différenciée
6 à 7	II : Tumeur modérément différenciée
8 à 9	III : Tumeur peu différenciée

Tableau 5 : Détermination du grade d'une tumeur mammaire maligne chez la femme (Selon Elston et Ellis, 1991).

Ce type de grading n'est applicable qu'aux carcinomes infiltrants. Il est d'une grande valeur pronostique pour les carcinomes mammaires de la chienne mais ne prend cependant pas en compte l'effraction et l'embolisation vasculaire qui sont des critères de taille dans l'évaluation du pronostic et dans la mise en place d'une thérapie adaptée (Magnol *et al.*, 1998).

- *Grading de Gilbertson*

Gilbertson *et al.* ont adapté aux carcinomes mammaires canins (*in situ* et infiltrants) le système de classification du cancer du sein chez la femme. Ils proposent d'évaluer le pronostic vital de l'animal selon les caractéristiques morphologiques suivantes : le degré de prolifération des canaux épithéliaux, le degré d'extension de la maladie, la réaction cellulaire lymphoïde (pour le « stade ») et le degré de différenciation nucléaire pour les lésions de prolifération maligne (pour le « grade ») (Figure 15).

Caractère de la tumeur (ou « stade »)

- Stade 0 : Caractère *in situ* (prolifération de cellules malignes limitée au canal épithélial sans envahissement du stroma)
- Stade I : Carcinome infiltrant sans emboles
- Stade II : Carcinome infiltrant avec emboles ou métastases ganglionnaires
- Stade III : Carcinome infiltrant avec métastases parenchymateuses (généralisées)

Pléomorphisme (ou « grade »)

- 1 : Noyaux anaplasiques
- 2 : Noyaux modérément différenciés
- 3 : Noyaux bien différenciés

Figure 15 : Classification des carcinomes mammaires canins de Gilbertson (Gilbertson *et al.*, 1983).

- *Grading de Peña & Clemente*

Ce grading est inspiré de celui de Elston et Ellis et se base sur l'addition de trois critères histologiques : la proportion de tubules, les atypies nucléaires ou le degré de pléomorphisme nucléaire et l'activité mitotique.

Les trois critères se voient attribuer un score entre 1 et 3. Scores qui seront additionnés pour donner le grade (Tableaux 6 et 7) (Peña *et al.*, 2013).

Pourcentage de formation de tubules	Pléomorphisme nucléaire	Index mitotique pour 10 champs microscopiques	Score
> 75 %	Minime : noyaux petits et uniformes ; nucléoles occasionnellement bien visibles	0 - 9	1
10 - 75 %	Modéré : anisocaryose/macrocaryose modérée ; nucléoles hyperchromatiques ; forte présence de nucléoles avec potentiels macronucléoles	10 - 19	2
< 10 %	Marqué : macrocaryose/anisocaryose marquée ; nucléoles hypertromatiques ; multiples macronucléoles	>20	3

Tableau 6 : Critères histologiques utilisés dans le grading de Peña & Clemente (Peña et al., 2013).

Score	Grade	Qualification
3 - 5	I	Faible grade
6 - 7	II	Grade intermédiaire
8 - 9	III	Haut grade

Tableau 7 : Détermination du grade du carcinome mammaire canin (Selon Peña et al., 2013).

c. Immunomarquage : Outil de compréhension de la cancérogenèse, de détection et de classification moléculaire des carcinomes mammaires canins

L'immunohistochimie permet d'analyser les profils d'expression de protéines cellulaires et est ainsi utilisée comme outil de compréhension de la cancérogenèse dans le domaine de la recherche. Elle est également utilisée comme outil de détection, pronostique et d'orientation thérapeutique pour un vétérinaire praticien. On utilise pour cela des anticorps dirigés contre les antigènes ciblés sur prélèvements fixés au formol et inclus en paraffine et parfois même en cytologie. Une réaction colorimétrique permet ensuite la mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé (Sarli *et al.*, 2002).

On considère des tissus positifs ou négatifs à un marqueur par comparaison avec des contrôles positifs et négatifs standardisés qui fixent des seuils de positivité selon la concentration ou le nombre de protéines cibles détectées (Cassali *et al.*, 2020).

Certains d'entre eux ont permis de générer diverses classifications moléculaires via l'établissement d'immunophénotypes qui se révèlent être de bons outils pronostiques. Élément que nous approfondirons dans une autre partie dédiée à cela par la suite.

- *Principaux marqueurs utilisés comme témoins de l'acquisition de propriétés tumorales et outils diagnostiques*

La genèse du cancer au sens large est basée dans un premier temps sur la transformation cellulaire d'une seule et unique cellule qui prolifère de manière clonale par la suite. Cette transformation est le résultat de l'accumulation d'altérations génétiques (via l'apparition de mutations) et épigénétiques (via des modifications de la régulation de l'expression de certains gènes).

On parle alors de cellule transformée lorsqu'elle a acquis a minima au moins l'une des propriétés suivantes :

- La capacité de se multiplier à l'infini de manière clonale via des mécanismes de défense contre l'apoptose,
- La perte de nécessité de support pour se diviser,
- La sécrétion aberrante de facteurs de croissance,
- La perte d'inhibition de contact : les cellules sont normalement adhérentes les unes par rapport aux autres grâce aux jonctions cellulaires. Ces jonctions permettent donc d'orienter les divisions cellulaires et donc d'assurer la perpétuité d'un épithélium en forme de monocouche. Dans le cas où les jonctions cellulaires n'assurent plus leur rôle correctement, les cellules forment des amas contribuant ainsi à la formation de masses.
- Une altération de la surface cellulaire.

Cette transformation cellulaire est un premier pas indispensable vers la cancérogenèse. La cellule une fois transformée prolifère ensuite de manière incontrôlée pour donner une nouvelle entité : la tumeur.

Les mutations impliquées dans l'acquisition de ces propriétés et donc potentiellement dans l'apparition de tumeur(s) peuvent l'être en provoquant soit un excès d'activité génétique ou au contraire une suppression d'activité génétique. On retrouve au sein du matériel génétique des cellules tumorales des proto-oncogènes (c'est-à-dire des gènes qui favorisent la formation et la pérennité de tumeur(s)) surexprimés et des gènes suppresseurs de tumeur(s) à l'inverse inhibés.

Il existe plusieurs gènes de prédisposition impliqués dans le développement du cancer mammaire canin. Il s'agira donc ici d'énumérer et de comprendre le rôle des principales protéines utilisées en immunohistochimie dont la modulation de l'activité semble être associée au développement de tumeurs mammaires canines notamment de tumeurs mammaires canines malignes.

□ Prolifération cellulaire clonale, élément clé de la croissance tumorale

i. Marqueurs de prolifération utilisés en histologie et cytologie

▪ Ki-67

Ki-67 est une protéine nucléaire exprimée majoritairement au cours de la phase M de la division cellulaire. C'est le marqueur le plus utilisé pour évaluer l'index mitotique sur échantillons histologiques mais aussi cytologiques ce qui en fait un bon outil de détection tumorale précoce (Brassart, 2008 ; Kaszak *et al.*, 2018).

Il a été montré que Ki-67 était plus fortement exprimée en immunohistochimie sur des tumeurs mammaires canines malignes que sur des tumeurs mammaires canines bénignes. Dans l'étude de Choi, une valeur seuil du pourcentage de cellules en mitose (c'est-à-dire positives au marqueur Ki-67) à 4,85 % a permis de distinguer tumeurs mammaires canines malignes et bénignes avec une sensibilité de 90,9 % et une spécificité de 92,3 % (Choi et Kim, 2011).

Cette protéine est également plus fortement exprimée sur des cellules de tumeurs mammaires de grande taille, inflammatoires, ulcérées, associées à une infiltration lymphatique et/ou métastasées (Choi et Kim, 2011 ; Peña *et al.*, 1998).

▪ PNCA *Proliferating Nuclear Cell Antigen* : Antigène nucléaire de prolifération cellulaire

PNCA est une protéine auxiliaire à l'ADN polymérase δ (enzyme intervenant dans les processus de réplication et de réparation de l'ADN) exprimée majoritairement au cours de la division cellulaire dans le noyau. Elle joue donc un rôle dans le contrôle du bon déroulement du cycle cellulaire (Klopfleisch *et al.*, 2011).

PNCA est globalement plus exprimée en cas de malignité (Klopfleisch *et al.*, 2011 ; Peña *et al.*, 2014). Une haute concentration cellulaire en PNCA est par ailleurs corrélée positivement à la taille de la tumeur, au stade et grade histologique, à l'index mitotique et à la dissémination métastatique (Carvalho *et al.*, 2016).

On utilise cependant plus volontiers le marqueur nucléaire Ki-67 pour sa facilité d'utilisation, ses avantages financiers, le fait qu'il soit plus communément utilisé en laboratoire ; mais surtout pour sa meilleure valeur pronostique (Peña *et al.*, 1998).

- Rôle des hormones stéroïdes et facteurs de croissance dans le développement tumoral
 - i. Sur-expression des récepteurs aux facteurs de croissance

Les protéines EGF-R (*Epidermal Growth Factor Receptor*) et HER-2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) sont toutes deux des récepteurs à activité tyrosine kinase aux facteurs de croissance appartenant à la famille des ErbB. Ces récepteurs stimulent la prolifération, la différenciation, la migration et l'adhésion cellulaire lorsqu'ils sont activés. Ils favorisent ainsi la croissance épithéliale (Figure 16).

Dans le cas du cancer du sein et des carcinomes mammaires, une surexpression des récepteurs EGF-R est notée en immunohistochimie. Une activité aberrante des voies de signalisation associées en découle ce qui favoriserait ainsi la tumorigenèse. Cette surexpression de EGF-R est retrouvée dans 6 % à 56 % des tumeurs mammaires canines malignes selon les études (Araújo *et al.*, 2016 ; Carvalho *et al.*, 2013 ; Gama *et al.*, 2009 ; Kaszak *et al.*, 2018 ; Masuda *et al.*, 2012 ; Pala *et al.*, 2015).

D'autres études trouvent cependant des résultats controversés avec une perte d'expression de ces récepteurs sur des tumeurs mammaires canines agressives (Silva *et al.*, 2014).

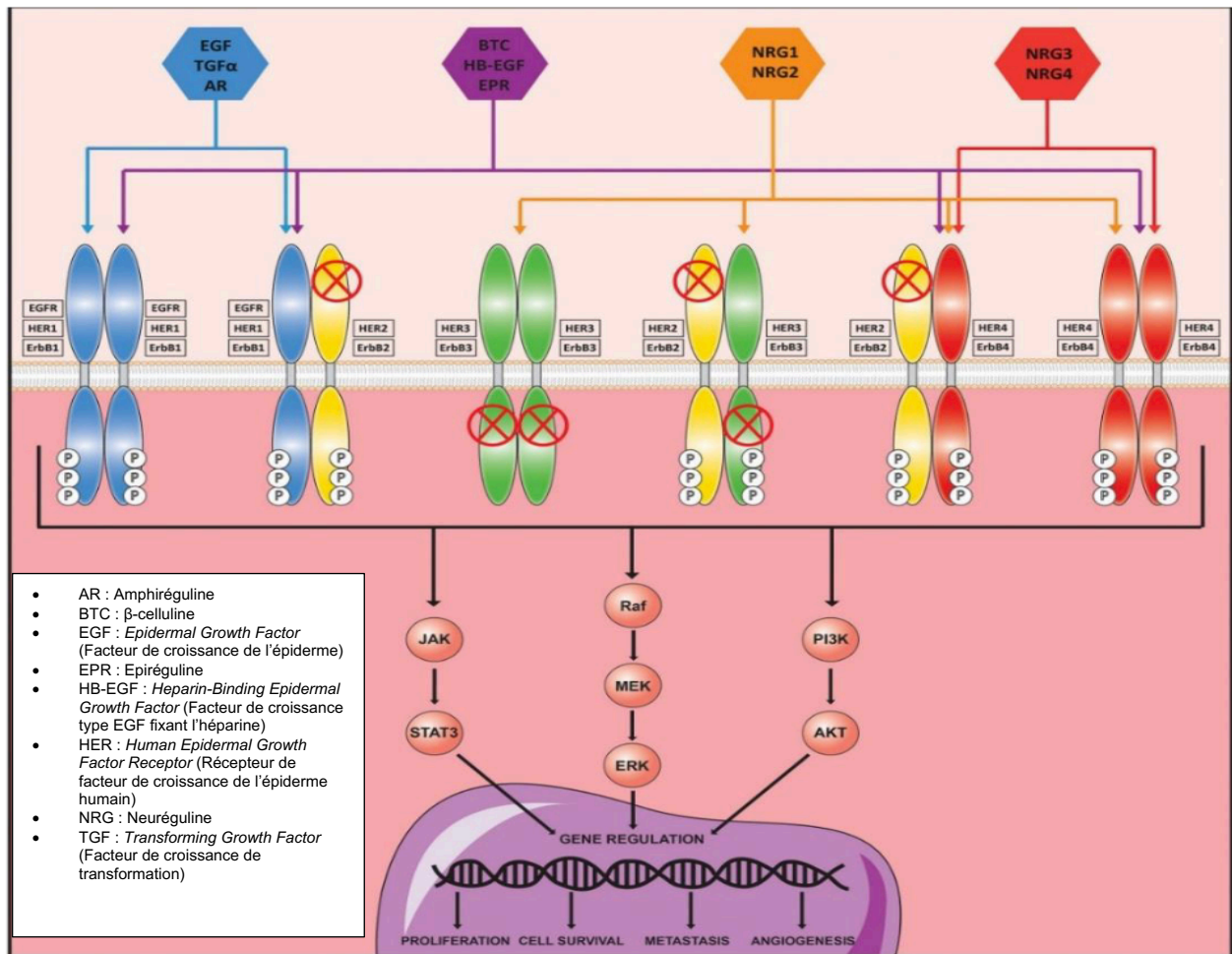


Figure 16 : Famille ErbB des récepteurs à activité tyrosine kinase (Pellat *et al.*, 2018).

La famille des récepteurs ErbB comporte 4 membres : EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 et ErbB4. Tous ces récepteurs se composent d'un domaine extracellulaire de fixation du ligand et un domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase. Cependant, le récepteur ErbB2 ne possède aucun ligand et existe naturellement sous formes d'hétérodimère. Quant au récepteur ErbB3, il n'a pas d'activité tyrosine kinase. Ces derniers sont marqués d'une croix rouge sur l'illustration.

On retrouve dans la littérature une surexpression de HER2 dans environ 30 % des tumeurs mammaires canines malignes (Campos *et al.*, 2015 ; Dutra *et al.*, 2004 ; Muhammadnejad *et al.*, 2012 ; Ressel *et al.*, 2013). Une amplification du gène *HER2* (plus précisément de l'exon 14 et 18) semble être la principale cause de cette surexpression (Hsu *et al.*, 2009).

Il existe par ailleurs une association positive entre surexpression de HER2 et pléomorphisme nucléaire, index mitotique, stade tumoral et grade histologique (et taille de la tumeur dans certaines études). Cependant, aucune association avec la présence de métastases aux nœuds lymphatiques régionaux n'a été démontrée (Campos *et al.*, 2015 ; Dutra *et al.*, 2004 ; Kaszak *et al.*, 2018 ; Muhammadnejad *et al.*, 2012).

Enfin, il existerait une association entre niveau d'expression d'HER2 dans la tumeur mammaire et dans le sang. Ces découvertes pourraient permettre d'envisager le développement d'un test sérologique ELISA pour HER2 pour tumeurs mammaires. Il serait alors possible d'orienter le diagnostic vers un profil malin et d'éviter la réalisation d'analyse histologique par biopsies (Campos *et al.*, 2015 ; Dutra *et al.*, 2004 ; Kaszak *et al.*, 2018 ; Muhammadnejad *et al.*, 2012).

ii. Influence hormonale dans le développement des tumeurs mammaires canines et expression des récepteurs aux hormones stéroïdes

La stérilisation étant un facteur protecteur dans l'apparition de tumeurs mammaires canines, les hormones stéroïdes sexuelles joueraient donc un rôle primordial dans le développement de ces dernières. Mais leurs effets et mécanismes d'action dans le processus de cancérogenèse restent encore peu clair chez la chienne et sont la cible de multiples hypothèses à l'heure actuelle.

Les récepteurs aux hormones stéroïdes sont des récepteurs nucléaires dont les plus communément étudiés dans le cas des tumeurs mammaires canines sont les récepteurs aux œstrogènes ou ER (*Estrogen Receptors*) notamment le récepteur ER α et à la progestérone ou PR (*Progesteron Receptor*).

▪ Les œstrogènes

Les œstrogènes semblent pouvoir intervenir dans la cancérogenèse via deux voies d'induction : (1) la fixation à des récepteurs d'activation (2) la formation de métabolites cancérogènes (Calaf et Garrido, 2011).

√ Voie ER-dépendante

Mécanismes d'action

Plusieurs polymorphismes nucléotidiques ou *SNP* (*Single Nucleotide Polymorphisms* ou « variations mineures du génome ») ont été mis en évidence sur le gène *ESR1* qui code les ERs et modifieraient le risque de développer des tumeurs mammaires canines. Certains *SNP* ont été décrits entre différentes races de chiennes et semblent être des facteurs de prédisposition raciale aux tumeurs mammaires canines. Une étude de cohorte de chiennes de race English Springer Spaniel prédisposée aux carcinomes mammaires, a permis de mettre en évidence une association entre la présence de ces *SNP* et la susceptibilité de développer une tumeur mammaire (Borge *et al.*, 2013). L'étude de Canadas-Sousa menée en 2019 met en évidence une association entre plusieurs *SNP* et l'âge d'apparition des tumeurs mammaires canines, la taille de la tumeur et la différenciation. Cependant ils montrent également que les chiennes présentant certains *SNP* sur *ESR1* développaient des tumeurs mammaires canines moins agressives (plus petite et mieux différenciées) plus tardivement que les chiennes présentant les allèles sauvages sur *ESR1* (Canadas-Sousa *et al.*, 2019). L'identification de ces divers *SNP* pourrait constituer un bon outil d'indication à la réalisation ou non d'une stérilisation préventive pour les chiennes en médecine vétérinaire.

Au sujet du mécanisme d'action des récepteurs ER α , la fixation de l'œstradiol (que l'on écrira E2 par la suite) à ces récepteurs induit une translocation de ces derniers du cytoplasme au noyau (Ikeda *et al.*, 2015). Le complexe E2-ER α se fixe ensuite sur les régions promotrices de gènes cibles nommés gènes de réponse aux œstrogènes ou *ERG* (*Estrogen Responsive Genes*) générant un enchaînement d'évènements (recrutement de l'ARN polymérase et de facteurs co-activateurs de transcription) à l'origine d'une hausse de la transcription de ces derniers (Torres *et al.*, 2021). La plupart des *ERG* sont des gènes activateurs de prolifération et anti-apoptotiques. La prolifération cellulaire est alors fortement accentuée et les voies apoptotiques inhibées. Les mutations spontanées peuvent ainsi s'accumuler facilitant ainsi la cancérogenèse (Sorenmo *et al.*, 2019).

En dehors de sa fonction nucléaire classique de facteur de transcription, certaines études ont montré que ER α se trouvait également sur la membrane plasmique de la cellule. Il activerait ainsi lorsqu'il est lié à E2 d'autres voies de signalisation plus rapides (voies calcium-dépendantes ; modifications post-transcriptionnelles sur plusieurs protéines ; activation de kinases, ...) sans régulation directe de la transcription du génome. On parle d'effets stéroïdes membranaires ou MISS (*Membrane Initiated Steroid Signaling*) (Figure 17).

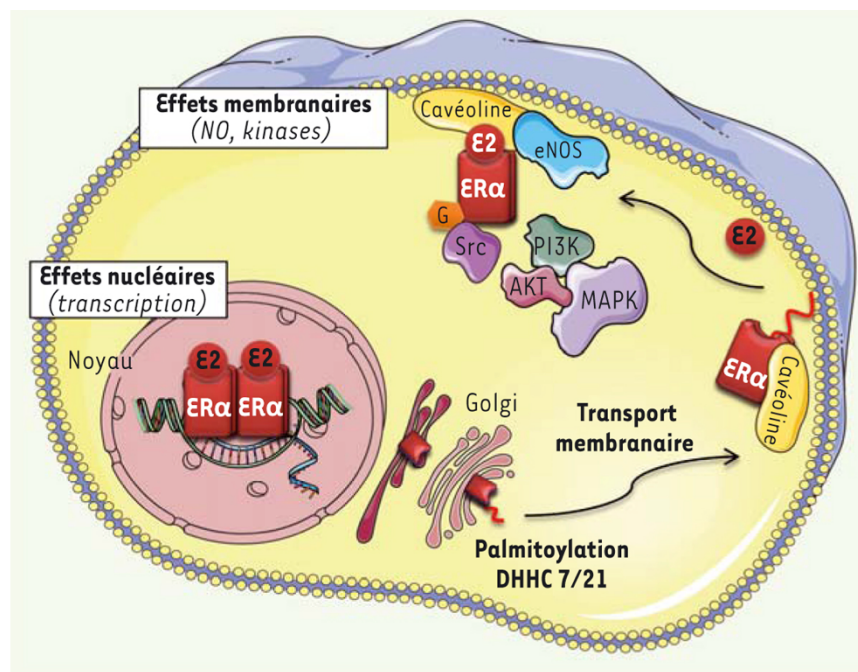


Figure 17 : Représentation schématique de l'adressage membranaire d'ER α (D'après Adlanmerini *et al.*, 2015).

En parallèle de l'activité nucléaire d'ER α , ER α peut être palmitoylé et, ainsi, transporté à la membrane cytoplasmique, où il interagit avec la cavéoline. En présence d'E2, ER α va former une véritable plateforme de signalisation membranaire conduisant notamment à l'activation de l'eNOS (production de monoxyde d'azote [NO]) et à l'activation de nombreuses kinases impliquées dans des voies de prolifération et/ou de migration cellulaire. DHHC 7/21 : palmitoylacyltransférases 7/21.

Un des principaux mécanismes induits par la voie MISS chez des chiennes à tumeurs mammaires ER-positives est celui des métalloprotéases matricielles ou MMP (*Matrix Metalloproteinases* ou Métalloprotéinases matricielles) 2 et 9. Il s'agit de protéases caractérisées par la présence d'un ion Zn^{2+} au niveau de leur site catalytique.

Différentes études ont montré une corrélation positive entre activité des formes actives des MMP 2 et 9 et malignité des tumeurs mammaires canines (Hirayama *et al.*, 2002 ; Kawai *et al.*, 2006)

Les MMP ont pour rôle de dégrader les composants de la MEC (matrice extracellulaire) (comme le collagène par exemple). Une activité augmentée de ces protéines serait donc témoin d'une dégradation accentuée de la MEC et donc d'une invasion stromale. D'autre part, les MMP 2 et 9, une fois activées par la voie MISS, clivent et relarguent HB-EGF (*Heparin-Binding EGF*), un facteur activateur du récepteur EGF-R-2. Une fois activé, le récepteur se dimérise et active la transcription de gènes de la prolifération cellulaire via deux voies : (1) la voie PI3K/AKT (2) la voie Src/ERK (Figure 18) (Levin, 2003).

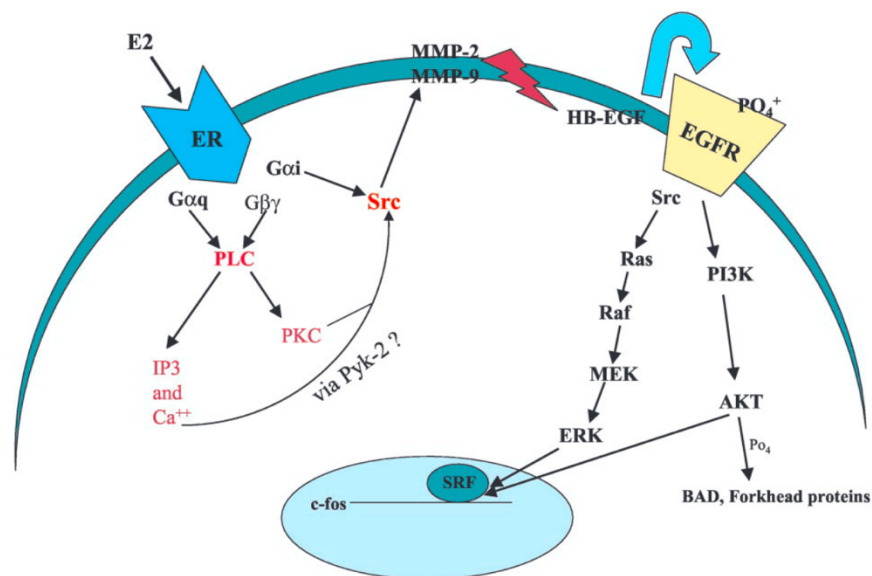


Figure 18 : Impact de l'activation des métalloprotéases matricielles (MMP) 2 et 9 par la voie MISS (D'après Levin, 2003).

AKT : Protéine-kinase B ; ERK : Extracellular signal-regulated kinase ; G : Protéine G ; iP_3 : inositol 1,4,5-triphosphatidyl inositol 4,5-biphosphonate ; JNK : C-Jun N-terminal kinase ; MEK : Mitogen-activated protein kinase ; MISS (*Membrane Initiated Steroid Signaling*) ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; PKC : Protéine-kinase C ; PLC : Phospholipase C ; Src : tyrosine kinase Src.

Les éléments exposés ci-dessus seraient donc plutôt en faveur d'une sur-expression des récepteurs ER dans le processus de cancérogenèse mammaire. Certaines études l'ont d'ailleurs mis en évidence (Kumaraguruparan *et al.*, 2006a).

Pourtant, une sous-expression de ces récepteurs dans les cellules des tumeurs mammaires canines malignes en comparaison à celles des tumeurs mammaires canines bénignes et du tissu mammaire normal a été reportée ces dernières années. En effet, il a été mis en évidence que globalement, les tumeurs mammaires bénignes et malignes de bas grade sont ER α -positives et les tumeurs mammaires malignes ER α -négatives (Canadas-Sousa *et al.*, 2019 ; Kaszak *et al.*, 2018 ; Peña *et al.*, 2014 ; Felisbina Luisa Queiroga *et al.*, 2011 ; Rutteman *et al.*, 1988 ; Sorenmo *et al.*, 2019 ; Spoerri *et al.*, 2015).

L'étude de Sorenmo *et al.* menée en 2019 a permis de renforcer l'idée que E2 aurait bien un effet pro-cancérigène sur des tumeurs mammaires ER α -positives mais favoriserait plutôt l'apparition de formes bénignes (Sorenmo *et al.*, 2019).

D'autres ligands des récepteurs ER α nommés SERM (*Selective Estradiol Receptor Modulators*) ou modulateurs sélectifs des récepteurs à l'œstradiol ont été découverts en médecine humaine. Leur fixation implique une stimulation ou un blocage du fonctionnement de ER α . Ils permettent de moduler la réponse générée selon le type tissulaire et cellulaire dans lequel le récepteur se trouve.

Le tamoxifène et le raloxifène sont des SERM à action inhibitrice dans le tissu mammaire et sont utilisées en thérapie ciblée pour leur effet antagoniste sur ER. Mais les résultats obtenus sur chiennes restent encore peu probants. L'hypothèse serait que le tamoxifène aurait une moindre affinité pour les ER du tissu mammaire chez la chienne (Torres *et al.*, 2021). Il a par ailleurs été montré que le tamoxifène avait un effet agoniste puissant sur les récepteurs hormonaux (aux œstrogènes et à la progestérone) de l'endomètre chez la chienne exposant ainsi en cas de traitement au risque de développement d'une hyperplasie glandulo-kystique de l'endomètre et par conséquent d'un pyomètre (Tavares *et al.*, 2010).

Le développement d'une tumeur mammaire est parfois œstradiol-dépendant chez la chienne (Abdelmegeed et Mohammed, 2018 ; Sorenmo *et al.*, 2019). D'après les divers éléments rapportés, l'œstradiol favorise le développement de tumeurs mammaires via la voie récepteur-dépendante à la simple condition que ces dernières présentent bien les récepteurs ER et soits donc ER-positives. Cependant, il a été constaté que les tumeurs ER-positives étaient majoritairement bénignes.

Certaines études ont malgré tout montrer que des taux sériques et intra-tissulaires élevés en œstrogènes favoriserait plutôt l'apparition de formes malignes (Spoerri *et al.*, 2015) alors qu'une sous-expression des récepteurs ER α est fréquemment constatée sur les tumeurs mammaires malignes.

Ces éléments sont donc potentiellement en faveur d'une voie « ER-indépendante » des hormones sexuelles sur les tumeurs mammaires canines malignes. Plusieurs explications possibles à cela : (1) L'intervention d'autres récepteurs encore inconnus ayant comme ligands les œstrogènes stéroïdes ; (2) L'existence d'une voie « récepteur-indépendante ».

✓ Voie ER-indépendante

Les œstrogènes (l'œstrone (E1) et le 17-β-œstradiol (E2)) sont des précurseurs d'hydrocarbures polycycliques à noyaux aromatiques responsables de mutations cancérigènes par dépurination de l'ADN (c'est-à-dire par clivage entre la liaison désoxyribose de purines et la base de l'ADN) (Figure 19) (Calaf et Echiburu-Chau, 2012 ; Calaf *et al.*, 2007 ; Cavalieri *et al.*, 1997 ; Liehr, 1997).

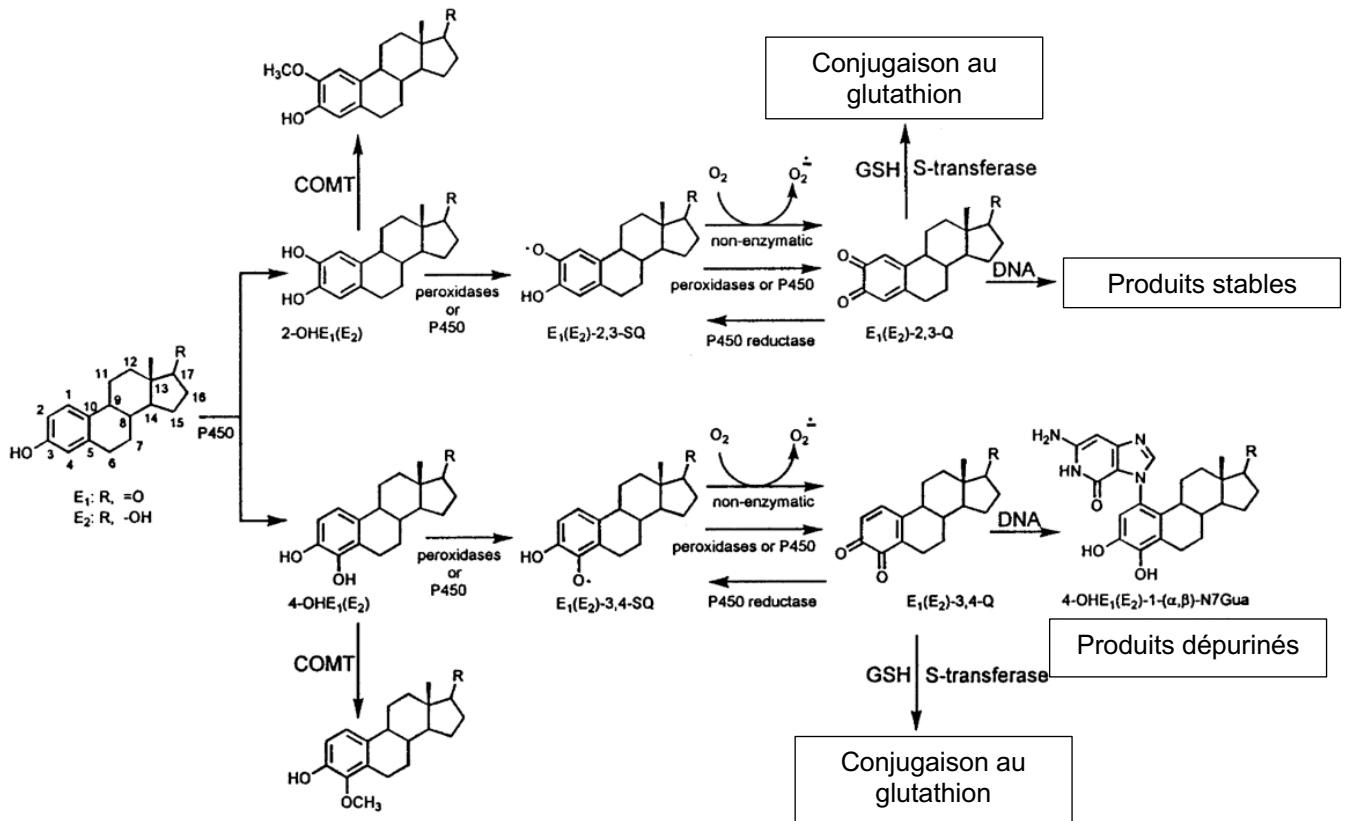


Figure 19 : Métabolisme des œstrogènes dans la production de cathécol-œstrogènes cancérigènes (D'après Cavalieri et al., 1997).

DNA : ADN

COMT : Cathécol-O-Méthyltransférase

GSH : Forme réduite du glutathion

Les œstrogènes E1 et E2 sont métabolisés par deux voies majoritaires dont l'une productrice de cathécol-œstrogènes (CE) : le 2-OH-CE et le 4-OH-CE. Les 4-OH-CE sont les métabolites cancérigènes.

En effet, les CE sont généralement inactivées par méthylation grâce aux cathecol-O-méthyltransférases ou COMT. Dans le cas contraire, elles s'oxydent alors en CE-semi-quinones (CE-SQ) puis en CE-quinones (CE-Q) notamment la CE-3,4-Q. Normalement, la CE-3,4-Q produite est ensuite inactivée soit par conjugaison avec le glutathion, soit par réduction. Dans le cas contraire, la CE-3,4-Q à l'état de radical libre se fixe sur certaines purines de l'ADN (la guanine) et clive le pont glycosidique qui la rattache à l'ADN, laissant ainsi des sites apuriniques sur l'ADN. Ce sont des générateurs de mutations par délétion (Cavalieri *et al.*, 1997 ; Liehr, 1997) (Figure 19).

Il a été montré chez l'être humain qu'une enzyme à activité 4-hydroxylase spécifique serait présente dans le tissu mammaire : le cytochrome P450 1B1. Des études menées *in vitro* sur des cellules de cancer du sein montrent une corrélation positive entre présence de cette enzyme et augmentation de la formation de 4-OH-CE. Par ailleurs, une quantité abondante de dépurinations ont bien été détectées sur l'ADN de cellules issues de cancer du sein (Malins *et al.*, 1993 ; Spink *et al.*, 1994).

Plusieurs études ont été menées sur l'impact du gène codant pour l'enzyme COMT sur l'apparition de tumeurs mammaires. En résumé, lorsque le *SNP* interfère négativement avec la production de COMT (par exemple un génotype codant pour une forme moins efficace de la COMT), la formation de carcinomes mammaires canins agressifs (de plus haut grade notamment) est alors favorisée par accumulation de métabolites fortement génotoxiques. D'autres génotypes peuvent jouer un rôle protecteur et favoriser la formation de types de tumeurs mammaires bien différenciées et peu agressives chez la chienne.

Par exemple, un *SNP* nommé G482A consistant en la substitution d'une guanosine en une adénosine sur le 482^e nucléotide a été mis en évidence sur le gène *COMT* sur des tumeurs mammaires canines. Les chiennes porteuses de cet allèle auraient trois fois plus de chance de développer des tumeurs mammaires après l'âge de 9 ans en comparaison à des chiennes non porteuses de cet *SNP*. Il jouerait donc un rôle dans l'apparition de tumeurs mammaires chez la chienne (Dias Pereira *et al.*, 2008). L'étude de Canadas de 2019 menée sur des chiennes non stérilisées à tumeurs mammaires a montré par ailleurs une association entre ce génotype du gène *COMT* et l'apparition de tumeurs de haut grade histologique, à forte invasion vasculaire et à fort impact clinique (Canadas-Sousa *et al.*, 2019).

- La progestérone

Le rôle de la progestérone dans la cancérogenèse mammaire est encore mal compris que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire. Des études réalisées chez des femmes hystérectomisées ont cependant montré que le risque de développer des tumeurs mammaires était plus élevé lors de l'administration d'œstrogènes et de progestérone que lors d'administration d'œstrogènes seul en comparaison avec des femmes hystérectomisées ne subissant pas de traitement hormonal substitutif (Beral et Million Women Study Collaborators, 2003 ; Rochefort, 2008 ; Rossouw *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'utilisation d'antagoniste de la progestérone comme le RU486 inhibe la croissance des cancers du sein et des carcinomes mammaires canins (Guil-Luna *et al.*, 2011 ; Rochefort, 1987). Ces éléments sont donc en faveur de l'intervention de la progestérone dans le processus de tumorigenèse mammaire.

La majorité des études réalisées chez la chienne affirment qu'un immunophénotype PR-positif (soit une expression marquée des récepteurs à la progestérone dans les tissus tumoraux) serait plutôt en faveur d'un processus tumoral peu agressif bénin qu'un immunophénotype PR-négatif. Millanta *et al.* montrent en 2005 que l'expression de PR est significativement plus faible sur des carcinomes invasifs que sur du tissu mammaire normal, des tumeurs mammaires bénignes ou des lésions dysplasiques chez la chienne (Millanta *et al.*, 2005). L'étude de Chang *et al.* de 2009 montre que PR est plus fréquemment exprimé sur des tumeurs bénignes (100 %) que sur des tumeurs malignes (71,9 %) (Chang *et al.*, 2009). Enfin, 75 % des tumeurs mammaires canines malignes étudiées sont PR-négatives dans l'étude de Toniti *et al.* (Toniti *et al.*, 2009).

Par ailleurs, les tumeurs mammaires canines PR-positives sont significativement plus petites en diamètre, moins métastasées et de stade clinique plus faible (Chang *et al.*, 2009). Les tumeurs mammaires malignes PR-négatives présentent des taux en Ki-67 supérieurs aux tumeurs mammaires PR-positives et donc une activité proliférative plus importante (Geraldès *et al.*, 2000).

Ces observations corroborent bien l'hypothèse d'une perte de dépendance hormonale sur les formes malignes des tumeurs mammaires canines.

Les mécanismes d'action des hormones sexuelles dans la cancérogenèse des tumeurs mammaires canines restent encore mal élucidés. Mais plusieurs conclusions peuvent être tirées des études menées jusqu'ici :

- La détection d'une expression marquée en récepteurs hormonaux à l'immunohistochimie est plutôt en faveur d'un profil bénin. Les profils malins sont essentiellement ER α et PR-négatifs notamment pour les plus agressifs d'entre eux.
- Il y aurait une perte de dépendance hormonale progressive dans le cas des tumeurs mammaires malignes. La tumeur acquiert alors la capacité d'une croissance accélérée autonome et incontrôlée.
- La détection précoce de mutations associées au développement de tumeurs mammaires malignes sur les gènes d'intérêt (*ESR1*, *COMT*...) serait un outil de dépistage précoce du risque d'apparition de ces dernières au cours de la vie du patient.

- Détournement des systèmes de réparation de l'ADN : Assurer la perpétuité des mutations ayant permis l'acquisition des propriétés tumorales

Lors de stades avancés de cancer mammaire, le matériel génétique des cellules est sujet à de multiples dommages notamment par des mécanismes de destruction des télomères chromosomiques, de fusion chromosomique et/ou par l'accumulation de mutations. Les phénomènes d'hypoxie qui accompagnent le processus de croissance tumorale contribue à cette instabilité génomique et donc à la mise en place de ces diverses modifications (Klopfeisch *et al.*, 2011).

En temps normal, ces dommages sont détectés et réparés par de bons systèmes de surveillance et des enzymes de réparation. Les cellules tumorales à progression maligne parviennent à contourner ces systèmes en inactivant les gènes de réparation de l'ADN (par conservation de mutations ou par épigénétique).

Les principaux gènes étudiés dans le cas du cancer du sein chez la femme et impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN sont les gènes *BRCA1* et *BRCA2*. Ils sont à l'origine de la synthèse de protéines activatrices des systèmes de réparation et détectrices de dommages génétiques, plus particulièrement des cassures de l'ADN double brin ou CDB (Cassure Double-Brin) ou DSB (*Double-Strand Breaks*) lors de la recombinaison homologue au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire. Ce sont donc des gènes suppresseurs de tumeurs (Kaszak *et al.*, 2018 ; Klopfeisch *et al.*, 2011 ; Thumser-Henner *et al.*, 2020).

En effet, plusieurs évènements se produisent lors de CDB : (1) la fixation des protéines de réplication A ou RPA (*Replication Protein A*) sur l'ADN simple-brin issu de la cassure (elles servent d'outils de protection contre les nucléases) (2) Le lancement d'une voie de signalisation activatrice (par phosphorylation) de *BRCA1*. *BRCA1* joue donc le rôle de protéine détectrice de dommages de l'ADN. Une fois phosphorylée, *BRCA1* se fixe sur *BRCA2* déjà associée à deux protéines : *PALB2* (*Partner and Localizer of BRCA2*) et l'enzyme recombinase *RAD51*. Le complexe *BRCA1-PALB2-BRCA2* transporte alors *RAD51* vers le noyau et permet la fixation de cette dernière au niveau des RPA sur le site de cassure. *BRCA2* et *PALB2* stimulent ensuite la formation de la *D-loop*, la conformation de *RAD51* permettant l'introduction de l'ADN double-brin complémentaire de la chromatide sœur. Une ADN polymérase permettra ensuite de recopier l'information manquante sur l'ADN simple-brin à partir de l'ADN complémentaire et donc de réparer la CDB (Buisson et Masson, 2013 ; Thumser-Henner *et al.*, 2020) (Figure 20).

Des mutations sur les gènes *BRCA1* ou *BRCA2* génèrent des modifications de conformation sur les protéines *BRCA1* ou *BRCA2* empêchant ainsi la formation du complexe *BRCA1-PALB2-BRCA2* et en particulier la fixation de *RAD51* sur la *BRCA2*. *RAD51* n'est alors plus transloqué du cytoplasme au noyau et les CDB s'accumulent créant une forte instabilité génomique potentiellement cancérogène.

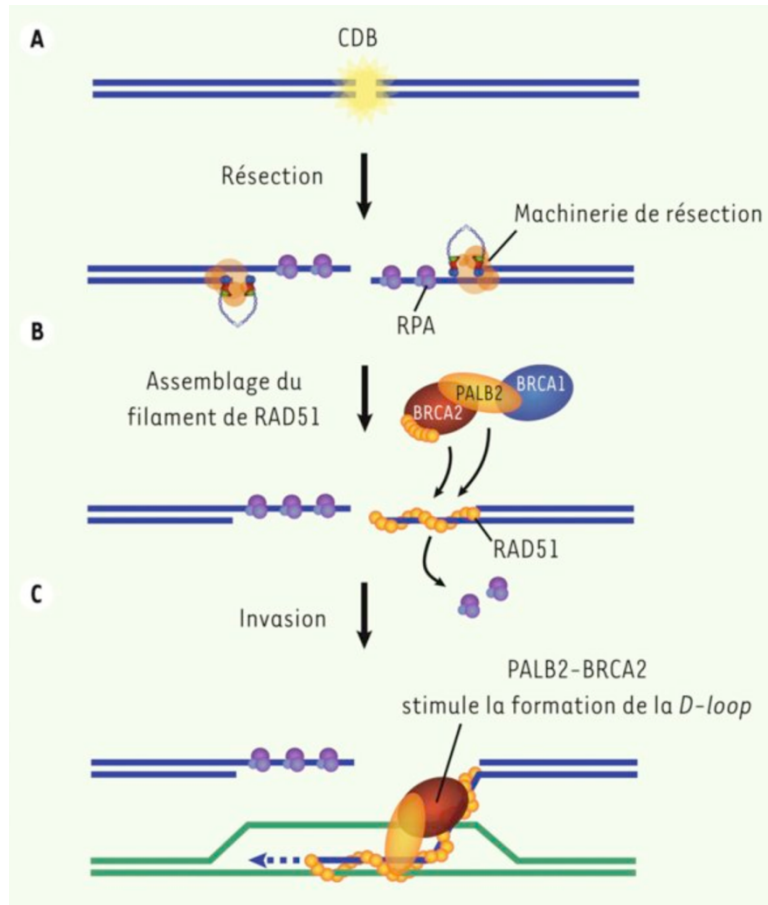


Figure 20 : Fonction des médiateurs BRCA1, PALB2, BRCA2 et RAD51 dans la recombinaison homologue (D'après Buisson et Masson, 2013).

CDB : Cassure Double-Brin

A l'heure actuelle dans le cas des tumeurs mammaires chez la chienne, la présence de mutations sur ces gènes semble être un facteur héréditaire prédisposant aux tumeurs mammaires et est statistiquement associée au développement de ces dernières. On note par ailleurs que la présence de mutations sur *BRCA1* et *BRCA2* est souvent associée à la présence de mutations somatiques sur le gène *p53* (Rivera *et al.*, 2009).

Cette association a surtout été démontrée pour le gène *BRCA1*. La réduction de l'expression de la protéine BRCA1 à l'immunohistochimie est caractéristique des tumeurs mammaires canines malignes. Elle est en effet associée avec un grade histologique élevé, des taux élevés en Ki-67, un fort pléomorphisme nucléaire ainsi qu'une faible différenciation tissulaire d'où la suspicion d'un potentiel rôle de la perte de BRCA1 dans l'apparition de tumeurs mammaires malignes chez la chienne (Nieto *et al.*, 2003 ; Rivera *et al.*, 2009).

Concernant BRCA2, une des études de Yoshikawa *et al.* portant sur les altérations génétiques de *BRCA2* dans le cas des tumeurs mammaires canines a montré que l'expression de l'ARNm et de la protéine issus du gène *BRCA2* était réduite en cas de tumeurs mammaires canines comparés au tissu mammaire normal. Yoshikawa et son équipe se sont également penchés sur l'identification des altérations génétiques de *BRCA2* à l'origine de la formation de tumeur(s) mammaire(s) chez la chienne. Les recherches effectuées ont permis d'identifier des *SNP*, insertions et délétions associés au développement des tumeurs mammaires canines notamment sur l'exon 27 du gène (Yoshikawa *et al.*, 2005 ; Yoshikawa *et al.*, 2008 ; Yoshikawa *et al.*, 2012 ; Yoshikawa *et al.*, 2015). D'autres études ont permis de mettre en évidence une corrélation entre polymorphisme sur l'exon 24 et l'exon 11 et la genèse des tumeurs mammaires chez la chienne (Enginler *et al.*, 2014 ; Maués *et al.*, 2018).

L'étude de Rivera *et al.* de 2009 ne montre cependant aucune différence significative entre l'expression de la protéine BRCA2 et caractère bénin ou malin.

BRCA2 serait donc bien impliqué dans le développement de tumeurs mammaires canines mais la détection d'une sous-expression de BRCA2 à l'immunohistochimie ne serait donc pas un bon indicateur de malignité.

- Angiogenèse : Entre nutrition des néo-tissus tumoraux et porte de sortie stratégique des cellules cancéreuses

La formation de tumeurs nécessite la formation de nouveaux vaisseaux intratissulaires et périphériques pour approvisionner les tissus néoformés en nutriments et oxygène, évacuer correctement leurs déchets métaboliques et assurer leur dissémination via la circulation de métastases (Sleeckx *et al.*, 2014).

L'angiogenèse se trouve donc être un pilier fondamental de la tumorigenèse dans l'espace (formation de masses de plus ou moins grande taille, apparition d'ulcérations sur les zones moins desservies...) et dans son extension péri-tumorale et généralisée. Elle résulte de l'activation de facteurs pro-angiogéniques ou de l'inhibition de facteurs anti-angiogéniques sur les cellules endothéliales et stromales.

L'immunohistochimie permet non seulement de distinguer les cellules de type endothélial issues de l'angiogenèse tumorale des cellules endothéliales normales mais aussi d'orienter le diagnostic et le pronostic en évaluant le degré d'expression de certains facteurs pro-angiogéniques (Klopfleisch *et al.*, 2011).

- i. Évaluation quantitative des cellules endothéliales-like néoformées par évaluation de la densité en micro-vaisseaux

Les cellules endothéliales néoformées sont détectables par de nombreux marqueurs notamment les cytokératines AE1, AE3 et AE14. Elles sont positives pour ces protéines tandis que les cellules endothéliales normales sont négatives pour ces dernières.

On quantifie l'angiogenèse à l'aide de la densité en micro-vaisseaux. Selon de multiples études, la densité en micro-vaisseaux est associée significativement au type histologique et au grade tumoral. On retrouve une densité en micro-vaisseaux plus élevée sur des tumeurs mammaires canines mal différenciées de grade élevé (Millanta *et al.*, 2006).

- ii. Détection de la présence de facteurs pro-angiogéniques et orientation diagnostique : Utilisation de marqueurs du facteur VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

Le facteur VEGF est responsable d'angiogenèse et de lymphoangiogenèse. Il est synthétisé et localisé dans des granulations des cellules épithéliales tumorales, endothéliales et stromales. Différentes études montrent une plus forte expression de VEGF dans les tumeurs mammaires canines malignes notamment chez les phénotypes les plus indifférenciées d'entre elles (de grade 3) en comparaison aux tumeurs mammaires bénignes (Felisbina L. Queiroga *et al.*, 2011 ; Restucci *et al.*, 2002). Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre densité intratumorale en micro-vaisseaux et intensité de positivité pour VEGF (Restucci *et al.*, 2002).

L'étude de Queiroga de 2011 montre également une association significative entre expression de VEGF et stade clinique. Le taux en VEGF augmente en cas de tumeurs malignes invasives notamment en cas de présence de zones nécrotiques (Kaszak *et al.*, 2018 ; Felisbina L. Queiroga *et al.*, 2011).

D'autres études dont la plus récente de Santos *et al.* n'obtiennent aucune différence significative d'expression de VEGF entre tumeurs mammaires bénignes et tumeurs mammaires malignes ou entre surexpression de VEGF et paramètres cliniques ou histologiques chez la chienne (Millanta *et al.*, 2006 ; A. a. F. Santos *et al.*, 2010).

iii. Intérêt global dans le cas des tumeurs mammaires canines

Il a été montré que les tumeurs mammaires malignes développaient significativement plus de néo-vaisseaux que les tumeurs mammaires bénignes chez la chienne. La détection d'une grande quantité de néo-vaisseaux pourrait ainsi être en faveur d'une tumeur mammaire canine maligne plutôt que bénigne (Sleeckx *et al.*, 2014).

Par ailleurs, parmi les tumeurs mammaires canines malignes, la densité en microvaisseaux intratumoraux et péri-tumoraux est plus importante sur des histotypes anaplasiques (carcinomes solides et squameux) que sur des histotypes moins différenciés (Restucci *et al.*, 2000).

L'étude de Jakab *et al.* de 2008 a également montré une corrélation entre grade histologique et densité microvasculaire. Un plus haut grade est associé à une plus grande densité microvasculaire (Jakab *et al.*, 2008).

La détection d'une grande quantité de néo-vaisseaux pourrait ainsi être plutôt en faveur d'un processus malin et agressif.

- *Marqueurs utilisés comme outil de classification histologique*

La glande mammaire normale est composée de deux types de cellules reposant sur une MEC composée de cellules mésenchymateuses (les fibroblastes composants du stroma) : les cellules épithéliales luminales et les cellules basales myoépithéliales. Ces types cellulaires diffèrent par leurs marqueurs de surface et donc leur profil immunohistochimique. On peut également retrouver des éléments métaplasiques comme du tissu osseux ou cartilagineux (notamment dans le cas des tumeurs mammaires canines mixtes).

Les cellules épithéliales luminales expriment les cytokératines acides de type I K-18 et K-19, basiques de type II CK-7 et CK-8 et principalement des facteurs de transcription dont les récepteurs hormonaux ER et PR. Les cellules basales myoépithéliales expriment quant à elles les cytokératines acides de type I CK-14 et CK-17 et basiques de type II CK-5 et CK-6 mais également p63 (une protéine homologue de p53), EGF-R ou encore des protéines spécifiques du muscle lisse comme la calponine ou la SMA (*Smooth Muscle Actin*).

Concernant les cytokératines, sont utilisés en immunohistochimie les anticorps anti-cytokératine AE1 et AE3. Les anticorps AE1 reconnaissent les kératines acides de type I 10, 14, 15, 16, 19 ; les anticorps AE3 les kératines basiques de type II 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8.

On peut ainsi distinguer les différents types de tumeurs mammaires canines : les carcinomes simples (où il y a prolifération de cellules épithéliales ou de cellules myoépithéliales) ; les carcinomes complexes (où les deux types cellulaires prolifèrent) etc. (Figure 21).

p63 est le marqueur nucléaire le plus sensible et spécifique des cellules myoépithéliales. Contrairement aux kératines basales CK-5 et CK-14 également exprimées par certaines cellules épithéliales ou aux protéines spécifiques du muscle lisse également exprimées sur les vaisseaux.

Dans le cas du cancer du sein chez la femme, la perte de l'intégrité de la couche de cellules basales myoépithéliales visualisables par immunohistochimie permet de différencier les carcinomes invasifs des carcinomes in situ. Ce n'est pas le cas chez la chienne chez qui cette perte d'intégrité n'est pas si fréquemment retrouvée (en particulier en cas de carcinomes complexes avec prolifération de cellules myoépithéliales) (Peña *et al.*, 2014).

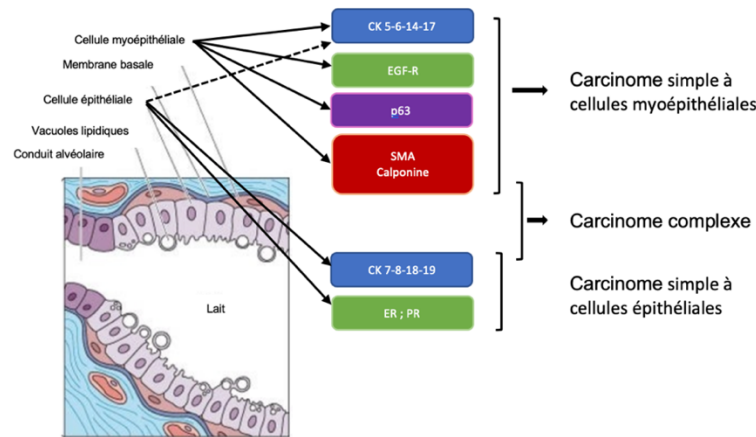


Figure 21 : Marqueurs utilisables en immunohistochimie pour différencier les différents types cellulaires de la glande mammaire.

CK : Cytokératine

EGF-R : Epidermal Growth Factor Receptor

SMA : Smooth Muscle Actin

ER : Estrogen Receptor

PR : Progesterone Receptor

- *Classifications moléculaires*

Des classifications moléculaires du carcinome invasif canin ont été créées à partir de l'immunohistochimie et donc de l'analyse des profils d'expression de certains gènes. Les sous-types moléculaires qui en ressortent diffèrent par leur expression pathologique et leur valeur pronostique. (Adelina Gama *et al.*, 2008)

Les gènes choisis pour la classification moléculaire sont ceux dont l'expression varie significativement d'une tumeur à l'autre et dont l'expression varie peu pour un même type tumoral (Perou *et al.*, 2000).

- Classification de Nielsen modifiée

Nielsen a créé divers phénotypes à partir de l'immunohistochimie pour le cancer du sein chez la femme (Nielsen *et al.*, 2004). Les marqueurs utilisés pour cela sont HER2, les récepteurs hormonaux ER et PR, le récepteur au facteur épidermique EGF-R, les cytokératines basales 5 et 6 et luminales 7 et 8 ainsi que l'index de prolifération Ki-67. Il distingue alors 4 immunophénotypes : le « Triple-negative *non-basal-like* », le « Triple-negative *basal-like* », le « Luminal A » et enfin le « Luminal B ». Une modification a été apportée à cette classification pour l'adapter au carcinome invasif du chien. La différence repose sur une répartition des carcinomes luminaux A et B avec un seuil posé à 33 % pour l'index de prolifération Ki-67 au lieu de 20 % chez la femme (Nielsen *et al.*, 2004 ; Mouneyrac, 2018) (Figure 22).

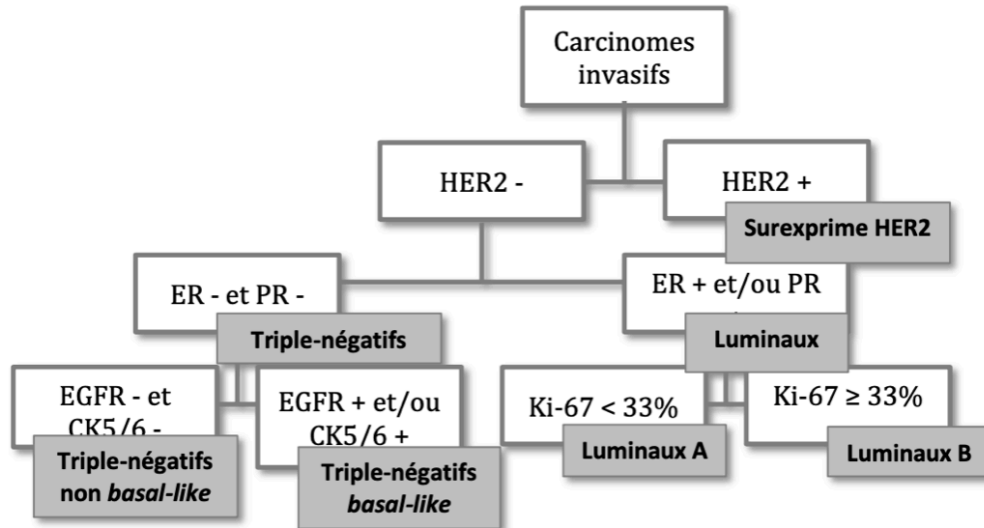


Figure 22 : Classification immunophénotypique du carcinome mammaire invasif de la chienne selon Nielsen *et al.* (2004) (D'après Mouneyrac, 2018).

HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2

ER : Estrogen Receptor

PR : Progesterone Receptor

CK : Cytokératine

EGF-R : Epidermal Growth Factor Receptor

□ Classification de Blows modifiée

La classification des carcinomes mammaires invasifs de Blows *et al.* repose sur les mêmes marqueurs que celle de Nielsen *et al.*. La seule différence est qu'elle n'a pas recours à l'utilisation de l'index de prolifération Ki-67 (Blows *et al.*, 2010).

Une modification a été utilisée pour les chiennes où le phénotype « Basal + » n'est obtenu qu'en cas de positivité pour EGF-R et CK-5 ou CK-6 (au lieu de la positivité de l'un des deux seulement) et le phénotype « Non Basal » ou « Basal - » est donc obtenu en cas de négativité pour EGF-R et/ou CK-5 et CK-6 (au lieu de la négativité des deux).

Certains phénotypes sont identiques entre les deux classifications : le phénotype « core basal » correspond au phénotype « Triple-négatif *basal like* » de Nielsen *et al.* et le phénotype « 5 négatif » au phénotype « Triple-négatif *non basal-like* » de Nielsen *et al.* (Blows *et al.*, 2010 ; Mouneyrac, 2018).

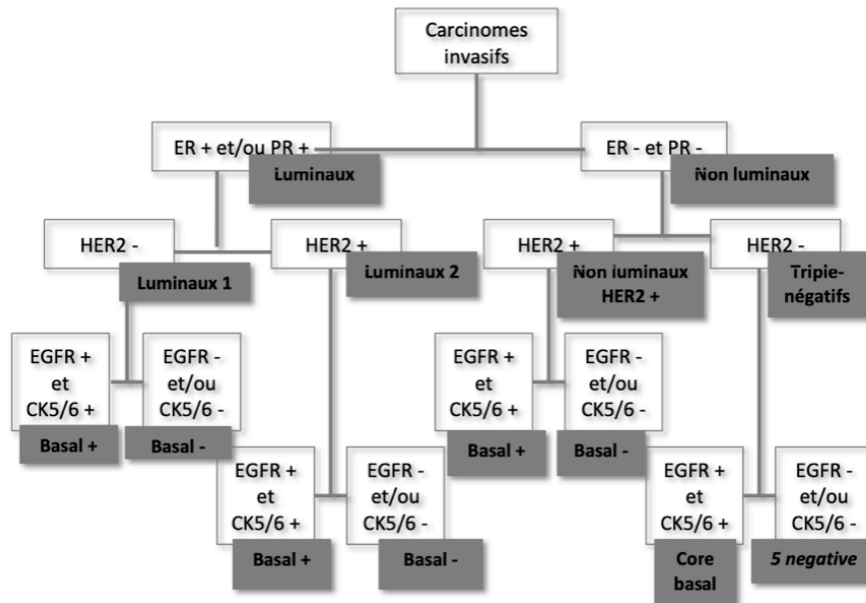


Figure 23 : Classification immunophénotypique du carcinome mammaire invasif du chien selon Blows *et al.* (D'après Mouneyrac, 2018).

ER : Estrogen Receptor

PR : Progesterone Receptor

HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

CK : Cytokératine

Cette classification est plus adaptée à la médecine vétérinaire car on distingue en général les carcinomes invasifs mammaires de la chienne dans un premier temps à son expression de ER.

d. Quelques données épidémiologiques

Dans la large étude épidémiologique menée sur l'incidence du cancer canin en 2002 par Dobson, 30 % des tumeurs mammaires prélevées étaient des carcinomes et des adénocarcinomes ; 5 % étaient des tumeurs mixtes (Dobson *et al.*, 2002).

Le type simple représente entre 46 et 65% des carcinomes mammaires selon les études (Ežerskytė *et al.*, 2010 ; Karayannopoulou *et al.*, 2005 ; Pérez Alenza *et al.*, 1997 ; Ressel *et al.*, 2013 ; Rezaie *et al.*, 2009 ; Tavasoly *et al.*, 2013).

On retrouve par ailleurs une prédominance du sous-type tubulo-papillaire parmi les carcinomes mammaires. Par exemple, l'étude menée par Beauvais en 2012 ainsi que celle menée par Hanzenne en 2010 recensent 53 % de sous-type tubulo-papillaire parmi les carcinomes diagnostiqués (Beauvais *et al.*, 2012 ; Hanzenne *et al.*, 2010).

Mouneyrac trouve quant à lui 50% de carcinomes tubulo-papillaires devant les carcinomes solides (29%) dans sa cohorte de chiennes à carcinomes mammaires (Mouneyrac, 2018).

Concernant le grade des carcinomes mammaires, les chiffres se contredisent. Le grade le plus représenté au sein des adénocarcinomes est le grade I selon l'étude de Fromentin de 2002 tandis que le grade I est presque quatre fois moins représenté chez les chiennes à tumeur(s) mammaire(s) dans l'étude d'Hanzenne de 2010 (Fromentin, 2002 ; Hanzenne *et al.*, 2010). Mouneyrac obtient 64 % de carcinomes de grade III dans la cohorte étudiée ; Rezaie 45,5% ; Karayannopoulou 35,3 % (Karayannopoulou *et al.*, 2005 ; Mouneyrac, 2018 ; Rezaie *et al.*, 2009).

Par conséquent, aucune prédominance d'un grade particulier n'a été pu être établie à l'aide des différentes études citées.

L'étude de Im *et al.* de 2014 portant sur l'analyse immunohistologique de 159 carcinomes mammaires canins montre cependant que l'intégralité des carcinomes anaplasiques (faiblement différenciés) sont de grade III et que la majorité des carcinomes tubulaires ou évoluant à partir d'un adénome ou d'une tumeur mixte sont de grade I (respectivement 83,3 % et 85,2 %) (Im *et al.*, 2014).

De la même façon, les prévalences des immunophénotypes varient selon les études. Rossi *et al.*, Im *et al.* ou encore Gama *et al.* obtiennent majoritairement des tumeurs mammaires canines de phénotype « luminal A » (respectivement 38,2 % ; 44 % et 44.8 %) ; tandis que Hanzenne et Kim *et al.* obtiennent majoritairement le sous-type « triple négatif *basal-like* » (66 % pour Hanzenne) (Gama *et al.*, 2010 ; Hanzenne *et al.*, 2010 ; Im *et al.*, 2014 ; Kim *et al.*, 2013 ; Rossi *et al.*, 2018).

E. Pronostic

Les animaux atteints de tumeurs mammaires sont généralement traités par exérèse chirurgicale de première intention (*cf. partie F*) permettant par la suite de réaliser un diagnostic histologique. On retiendra que les chances de survie sont globalement plus faibles au cours de la première année qui suit l'exérèse de la tumeur mammaire. Pour les animaux dont la tumeur est cause de décès, la durée moyenne de survie est de 8 à 10 mois : pour ceux dont la cause de la mort n'est pas associée à la tumeur, cette durée s'élève à 20 mois (Bostock, 1975b ; Schneider *et al.*, 1969).

Ces chiffres ne sont que des moyennes. Il est en réalité possible d'estimer de manière plus précise le devenir de l'animal en relevant certaines caractéristiques cliniques, pathologiques et biologiques propres à chaque individu et à sa tumeur dénommées « facteurs pronostiques ».

Ces facteurs permettent de prédire l'évolution clinique et d'estimer le temps de survie du patient. L'évaluation du pronostic est un élément fondamental dans le choix et la modulation du traitement à mettre en place par la suite.

La progression clinique du cancer se décrit principalement à l'aide d'analyses de survie au cours desquelles sont relevées l'apparition de récives, de récurrences, de métastases ganglionnaires ou à distance et l'intervalle sans progression (ou *DFI* pour *Disease-free interval*) à la suite du retrait de la tumeur mammaire pour analyse histologique (et donc établissement du diagnostic).

Le devenir du patient se caractérise par la survie globale (ou *OS* pour *Overall Survival*) ou spécifique (ou *SS* pour *cancer-Specific Survival*) ; qui correspond au délai (exprimé en jours) entre diagnostic et décès de l'animal de toutes causes confondues dans le cas du *OS* ou de causes liées à l'évolution du cancer pour le *SS*.

Les principaux facteurs pronostiques étudiés jusqu'ici dans le cas des tumeurs mammaires canines sont : la taille de la tumeur, la présence de métastases dans les nœuds lymphatiques et le stade clinique (Sorenmo *et al.*, 2019).

Nous aborderons également l'intérêt du grade histologique et de certains marqueurs (ER/PR, Ki-67, Cox-2 etc.) utilisés en immunohistochimie dans l'évaluation pronostique de chiennes atteintes de tumeur(s) mammaire(s).

a. Paramètres cliniques

- *Age de l'animal*

L'âge de l'animal est l'un des premiers facteurs pronostiques étudiés dans le cas de cancer mammaire canin. La plupart des analyses de survie menées mettent en évidence qu'un âge « élevé » (on considère généralement un animal âgé à partir de 10 ans) est associé à de plus faibles DFS et OS après mammectomie (Bostock, 1975a ; Cassali *et al.*, 2020 ; Gama *et al.*, 2010 ; Hellmén *et al.*, 1993 ; Perez Alenza *et al.*, 2000a).

Cependant certaines études ne mettent pas en évidence cette association (Philibert *et al.*, 2003 ; Ressel *et al.*, 2013).

Un an d'âge supplémentaire augmenterait de 15 % le risque de décès sur des chiennes à tumeur(s) mammaire(s) ayant subi une exérèse chirurgicale (Mouneyrac, 2018).

- *Taille de la tumeur*

De nombreuses études ont mis en évidence une corrélation négative entre taille de la tumeur mammaire et devenir de l'animal (survie, récurrence, récurrence, dégradation de l'état général ...) : plus la tumeur est grande, plus le pronostic de l'animal s'assombrit (c'est-à-dire plus les DFS et OS sont courts) (Carvalho *et al.*, 2016 ; Hsu *et al.*, 2009 ; Misdorp et Hart, 1976 ; Perez Alenza *et al.*, 2000a ; Philibert *et al.*, 2003 ; Santos *et al.*, 2015 ; Yamagami *et al.*, 1996).

Carvalho *et al.* obtiennent par exemple en 2016 un OS significativement différent entre des chiennes à tumeur(s) mammaire(s) maligne(s) de taille inférieure à 3 cm et des chiennes à tumeur(s) mammaire(s) maligne(s) de taille supérieure à 5 cm (respectivement de 21,93 mois et 11,50 mois). L'étude de Santos *et al.* menée en 2015 montre que des chiennes à tumeur(s) mammaire(s) maligne(s) de taille > 2,9 cm ont un DFI et un OS significativement plus faibles que les chiennes à tumeur(s) mammaire(s) maligne(s) de taille < 2,9 cm (respectivement 21 et 22 mois ; et 15 et 18 mois) (Santos *et al.*, 2015 ; Carvalho *et al.*, 2016).

- *Signes de dissémination tumorale : infiltration lymphovasculaire et/ou présence de métastases des nœuds lymphatiques périphériques ou dans d'autres organes*

Il a également été montré que la mise en évidence d'une infiltration lymphovasculaire, de la présence de métastases dans les nœuds lymphatiques (donc d'une extension locale) ou de métastases à distance (donc d'une extension généralisée) est associée à un mauvais pronostic en cas de tumeurs mammaires canines malignes (Tableau 8) (Hellmén *et al.*, 1993 ; Hsu *et al.*, 2009 ; Misdorp et Hart, 1976 ; Perez Alenza *et al.*, 2000a ; Santos *et al.*, 2015).

Taux de survie (%)	Présence de métastases dans les nœuds lymphatiques	Absence de signes de dissémination lymphatique	Statistiques
Yamagami <i>et al.</i> (1996) : <i>Étude d'une cohorte de 175 chiennes à tumeur(s) mammaire(s) maligne(s) au cours des 2 années suivant leur exérèse chirurgicale (et donc la pose du diagnostic)</i>	35,7 % (en cas d'infiltration des nœuds lymphatiques régionaux bilatéraux)	94,4 %	<i>p-value</i> < 0,01 : différence significative
Karayannopoulou <i>et al.</i> (2005) : <i>Étude d'une cohorte de 85 chiennes à carcinomes mammaires invasifs au cours des 2 années suivant leur mastectomie</i>	14,3%	78,9 %	<i>p-value</i> < 0,001 : différence significative
Ressel <i>et al.</i> (2012) : <i>Étude d'une cohorte de 29 chiennes à carcinomes mammaires invasifs au cours des 2 années suivant leur mastectomie et extraction des nœuds lymphatiques régionaux</i>	0 %	84 %	<i>p-value</i> = 0,001 : différence significative

Tableau 8 : Extraits de données chiffrées relatives à la dissémination lymphatique (taux de survie) obtenues sur des études de cohorte de chiennes à tumeur(s) mammaire(s) maligne(s) (D'après Yamagami *et al.*, 1996 ; Karayannopoulou *et al.*, 2005).

L'étude de cohorte menée par Szczubial *et al.* en 2011 sur le devenir de 51 chiennes à carcinomes mammaires en M4 et M5 au cours des 2 années suivant leur mammectomie régionale et le retrait des nœuds lymphatiques inguinaux montre également un *DFS* et *OS* significativement plus faible chez les femelles présentant des métastases de plus de 2 mm dans les nœuds lymphatiques inguinaux. Aucune différence significative des temps de survie n'est observée en cas de « micrométastases » dans les nœuds lymphatiques périphériques (Szczubiał et Łopuszynski, 2011).

Concernant la mise en évidence de métastases à distance, Yamagami *et al.* obtiennent un taux de survie 24 mois après diagnostic significativement plus bas (13,6 %) chez les femelles atteintes de tumeur(s) mammaire(s) maligne(s) avec métastases (poumons, foie...) (contre 92,4 % chez les femelles ne présentant pas de métastases à distance) (Yamagami *et al.*, 1996).

- *Le stade clinique : outil pronostique de synthèse*

La taille de la tumeur et la mise en évidence d'une extension régionale et/ou généralisée sont donc indépendamment toutes trois associées au pronostic de l'animal. Le système de classification TNM utilise cependant conjointement ces divers paramètres pour permettre au vétérinaire d'établir un pronostic à partir d'une vue d'ensemble de ces données cliniques.

Plusieurs études ont par la suite permis de montrer que la classification TNM est de bonne valeur pronostique.

Une corrélation entre stade clinique et décès (causé par le cancer) est par ailleurs régulièrement mise en évidence dans les diverses études de cohorte (Hsu *et al.*, 2009 ; Peña *et al.*, 2013 ; Philibert *et al.*, 2003 ; Yamagami *et al.*, 1996).

Hsu *et al.* obtiennent également en 2009 des temps de survie significativement plus faibles chez des femelles de stade clinique IV à V (en comparaison avec des femelles de stade I à III) (Tableaux 9 et 10) (Hsu *et al.*, 2009).

Stade TNM	Stade I	Stade III	Stade IV
1 an après chirurgie	97,9 %	75,8 %	13,6 %
2 ans après chirurgie	97,9 %	66,4 %	13,6 %

Tableau 9 : Taux de survie en fonction du stade clinique TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*) au cours des deux années suivant la mammectomie (Yamagami *et al.*, 1996).

(*) Les animaux de stade II n'ont pas été inclus dans l'analyse de survie en raison de leur trop faible effectif.

Stade TNM	Stade I	Stade II	Stade III	Stade IV
Temps de survie médian	24 mois	19 mois	15 mois	12 mois

Tableau 10 : Temps de survie médian (mois) en fonction du stade clinique TNM au cours des deux années suivant la mammectomie (Issu de Philibert *et al.*, 2003).

b. Paramètres histopathologiques

- *Caractéristiques cellulaires : pléomorphisme nucléaire, index mitotique et taux de cellules en phase S*

Le pléomorphisme nucléaire s'est montré être un bon élément prédictif du devenir des chiennes à cancer mammaire après mammectomie (Cassali *et al.*, 2020).

Par ailleurs, comme évoqué au préalable, l'index mitotique (ou taux de cellules en mitose dans un tissu) peut être évalué à l'aide du marqueur Ki-67 ou PNCA. La malignité de la tumeur s'accompagne d'une augmentation de l'index de prolifération Ki-67 mais aussi PNCA (Kumaraguruparan *et al.*, 2006b ; Peña *et al.*, 1998 ; Pérez Alenza *et al.*, 1997 ; Preziosi *et al.*, 1995).

Les divers résultats obtenus sur le sujet sont présentés ci-dessous (Tableau 11) :

Caractéristiques cellulaires	Facteur pronostic négatif
Pléomorphisme nucléaire	Score de Nottingham > 3 (Santos <i>et al.</i> , 2015 ; Cassali <i>et al.</i> , 2020)
Index mitotique Ki-67	<ul style="list-style-type: none">• Augmentation de l'index notamment sur les tumeurs peu différenciées (Peña <i>et al.</i>, 1998).• Résultats plus précis qu'avec PNCA (Perez Alenza <i>et al.</i>, 2000b)• Ki67 > 33,3 % (Carvalho <i>et al.</i>, 2016).• Augmentation de 3% du risque de décès toutes causes confondues et de décès lié au cancer quand Ki67 augmente d'un point de valeur chiffrée (Mouneyrac, 2018).• Ki67 > 22 % (Brunetti <i>et al.</i>, 2021).
Index mitotique PNCA	<ul style="list-style-type: none">• Aucune mise en évidence d'une corrélation entre l'index PNCA et OS, DFI ou apparition de métastases dans le temps• PNCA > 39 % (Carvalho <i>et al.</i>, 2016)

Tableau 11 : Orientation pronostique en fonction de la valeur des critères cellulaires

Ki-67 semble cependant donner des résultats plus précis en termes de pronostic que PNCA. Il est ainsi utilisé de manière empirique et courante dans l'établissement du pronostic en cas de tumeur mammaire maligne. On notera d'autre part que le taux de cellules en phase S du cycle cellulaire (ou *SPR* pour *S-phase rate*) (c'est-à-dire les cellules en phase de réplification de l'ADN) peut également être utilisé dans ce but. En effet, Hellmén *et al.* montre que le *SPR* est un facteur de risque de décès en cas de tumeur(s) mammaire(s) et donc un facteur pronostique négatif. Les analyses statistiques univariées et multivariées réalisées sur une cohorte de 223 chiennes à tumeur(s) mammaire(s) montrent que les chiennes à tumeur(s) mammaire(s) présentant un *SPR* supérieur à 10 % (considéré « élevé ») avaient 15,78 fois plus de chances de décéder (toutes causes confondues) dans les années suivant leur mammectomie que des chiennes à tumeur(s) au *SPR* inférieur à 5 % dit « faible » (Hellmén *et al.*, 1993).

- *Type histologique*

Certains types histologiques semblent être de nature plus agressive et donc de moins bon augure pour l'animal. D'après les différentes études menées sur le sujet, il ressort que les tumeurs peu ou non différenciées (en particulier les carcinomes anaplasiques) et le sarcome sont les deux types histologiques de plus mauvais pronostic (Carvalho *et al.*, 2016 ; Hellmén *et al.*, 1993 ; Hsu *et al.*, 2009 ; Misdorp et Hart, 1976 ; Peña *et al.*, 1998 ; Yamagami *et al.*, 1996).

Le carcinosarcome est le type histologique au temps de survie médian le plus faible (9,20 mois) dans l'étude de Carvalho *et al.* (Carvalho *et al.*, 2016). Hellmén *et al.* montrent que des chiennes à sarcomes ont 2,62 fois plus de chances de décéder dans les deux années suivant la chirurgie que celles à carcinomes papillaires ou tubulaires (Hellmén *et al.*, 1993).

Yamagami *et al.* obtiennent quant à eux un taux de survie significativement plus faible chez les chiennes à tumeur(s) « non tubulaire(s) » indifférenciée(s) (carcinome anaplasique, carcinome complexe ou carcinome à cellules squameuses) (60,8 %) que chez les chiennes à adénocarcinome(s) (60,8 %) ou à tumeur(s) mixte(s) (83,3 %) (Yamagami *et al.*, 1996). Enfin, l'étude de cohorte de Gilbertson *et al.* montre que les chiennes atteintes de carcinome anaplasique vivent en moyenne 11,4 mois de moins que les chiennes atteintes d'autres types de carcinomes (Gilbertson *et al.*, 1983). Cette différence pronostique observée sur certains types histologiques s'expliquerait notamment par leur nature plus agressive (c'est-à-dire par le fait qu'ils soient plus sujets à l'extension locale ou généralisée). En effet, le type histologique semble être associé à l'apparition de métastases ou d'infiltration des vaisseaux lymphatiques (Gilbertson *et al.*, 1983).

Si aucune association entre type histologique et apparition de métastases n'est mise en évidence par Perez Alenza *et al.* (Perez Alenza *et al.*, 2000a), Peña *et al.* obtiennent 40 % de récurrence et de survenue de métastases au cours des deux années suivant l'exérèse de carcinomes solides sur leurs chiennes (Peña *et al.*, 2013). L'équipe de Im *et al.* menée en 2010 montre quant à elle qu'une invasion des vaisseaux lymphatiques est plus fréquemment rencontrée en cas de comédocarcinome, de carcinome anaplasique et de carcinome mammaire inflammatoire (Im *et al.*, 2014).

- *Grade histologique*

Le grading se présente comme un outil pronostique de synthèse d'utilité. Il facilite l'interprétation histologique et permet d'uniformiser les critères histopathologiques en médecine vétérinaire.

Il est cependant à noter que des méthodologies différentes ont été utilisées dans l'établissement de ces systèmes de grading. Elston et Ellis ont établi la valeur de leur grading en observant le taux de survie de leurs animaux de cohorte dans les 2 années suivants l'exérèse de la tumeur, Gilbertson en évaluant le pourcentage de récidives et récurrences dans les 2 années suivantes, Peña au cours des 3 années suivantes. Il est ainsi difficile de comparer la valeur prédictive des différents gradings utilisables en médecine vétérinaire.

□ Grading de Elston & Ellis

Plusieurs études de cohorte ont permis d'évaluer la validité du système de grading de Elston et Ellis comme outil pronostique (Brunetti *et al.*, 2021 ; Karayannopoulou *et al.*, 2005 ; Perez Alenza *et al.*, 2000a ; Santos *et al.*, 2015).

Karayannopoulou *et al.* montrent en 2005 que des femelles présentant des carcinomes mammaires de grade III (non différenciés) avaient 21 fois plus de chances de décéder dans leurs deux années post-opératoires que les chiennes à carcinomes de grade I ou II (différenciés), 10 fois plus de chances dans le cas du carcinome simple, qui est le type histologique majoritairement rencontré chez le chien. Ils montrent également que des chiennes à tumeur(s) mammaire(s) maligne(s) de grade III ont 7 fois plus de chances de décéder qu'en cas de tumeur(s) mammaire(s) maligne(s) de grade II (Karayannopoulou *et al.*, 2005).

Concernant les analyses de survie réalisées dans cette étude, le taux de survie était significativement plus bas chez les femelles à carcinomes de grade III que celui des femelles à tumeur(s) de grade I ou II. Dans le cas du carcinome simple, aucune différence significative du taux de survie n'a été mise en évidence entre les chiennes à tumeur(s) mammaire(s) de grade II et celles à tumeur(s) mammaire(s) de grade III. On obtient cependant bien un taux de survie significativement plus bas en cas de tumeur(s) de grade III qu'en cas de tumeur(s) de grade I et II confondue(s) (Tableau 12) (Karayannopoulou *et al.*, 2005).

	Grade I	Grade II	Grade III
Taux de survie (%)	0 %	46,4 %	86,7 %

Tableau 12 : Taux de survie obtenus par Karayannopoulou *et al.* dans leur cohorte de 85 chiennes à carcinomes mammaires (Karayannopoulou *et al.*, 2005).

D'autres études montrent également une corrélation négative entre temps de survie et grade histologique (Tableau 13).

Temps de survie (OS)	Grade I	Grade II	Grade III	Conclusion
Santos <i>et al.</i> (2015)	24 mois	21 mois	17 mois	OS significativement plus long (p=0,008) entre les chiennes à tumeur(s) de grade III et celles à tumeur(s) de grade I ou II.

Brunetti <i>et al</i> (2021)	44 +/- 3 mois	33 +/- 6 mois	28 +/- 5 mois	Différences significatives entre les OS médians.
---------------------------------	---------------	---------------	---------------	--

Tableau 13 : Temps de survie obtenus dans les études de cohorte de Santos *et al.* et Brunetti *et al.* en utilisant le système de grading de Elston & Ellis (ou méthode de Nottingham ou grade de Scarff-Bloom-Richardson découlant de ce dernier).

□ Grading de Gilbertson

Gilbertson *et al.* ont mis au point un système de classification inspiré du grading de Elston et Ellis qu'ils ont adapté aux tumeurs mammaires canines épithéliales. Ce système permet de standardiser l'évaluation pronostique en utilisant des critères histologiques morphologiques quantitatifs. Leur étude de cohorte constituée de 214 chiennes à tumeur(s) mammaire(s) se penche sur l'évaluation de la *DFI* spécifique (ou *CFI* pour *Cancer-Free Interval* c'est-à-dire l'intervalle de temps sans apparition de récurrences ou de récurrences invasives (c'est-à-dire l'apparition d'un nouveau cancer invasif) au cours des deux années qui suivent le retrait de la tumeur). Ce système repose d'abord sur la catégorisation des tumeurs mammaires canines en stades établis à partir du degré de prolifération des canaux épithéliaux, de la réaction cellulaire lymphoïde et du degré d'extension de la maladie.

Leur étude de cohorte menée sur 214 chiennes (dont 98 à tumeur(s) mammaire(s) maligne(s)) montre qu'il existe une corrélation directe entre stade tumoral (0, I, II ou III) et risque de récurrences et/ou de récurrences invasives après chirurgie. Les chiennes à tumeur(s) mammaire(s) maligne(s) de stade I ou II présentent ainsi 13 fois plus de chances de récidiver ou de déclarer une ou plusieurs récurrences dans leurs deux années post-opératoires que les chiennes à tumeur(s) mammaire(s) maligne(s) de stade 0 (c'est-à-dire non invasives ou *in situ*). Une différence significative du taux de récurrence est également observée entre des chiennes à tumeur(s) maligne(s) de stade I et des chiennes à tumeur(s) mammaire(s) de stade 0 (ou *in situ*), ce qui montre l'importance d'identifier une tumeur mammaire maligne avant son stade invasif.

Les tumeurs mammaires canines malignes de type invasif sont ensuite subdivisées en grades par évaluation du degré de différenciation nucléaire.

Concernant la différenciation nucléaire, cette étude montre que des chiennes à carcinomes invasifs de « grade nucléaire » 1 (considérés comme indifférenciés) présentent un risque 22 fois plus élevé de développer une récurrence en période post-chirurgicale qu'en cas de carcinomes invasifs de grade nucléaire 2 ou 3 (considérés comme différenciés) (Tableau 14).

Stade	Grade	% de récidives ou de récurrences invasives
Stade 0 (<i>in situ</i>)		25 %
Stade I		72 %
	Grade 1	94 %
	Grade 2-3	58 %
Stade II		95 %
	Grade 1	100 %
	Grade 2	86 %

Tableau 14 : Pourcentages de récidives et récurrences invasives obtenus dans l'étude de Gilbertson *et al.* dans la création de leur système de grading des tumeurs mammaires canines.

D'autres investigations devront par la suite être réalisées pour déterminer l'intérêt pronostique de l'évaluation de la différenciation nucléaire en cas de carcinomes *in situ* (de stade 0).

La tentative de création d'un système de grading en termes de reproductibilité s'est révélée difficile étant donné l'hétérogénéité histologique des tumeurs mammaires canines. Malgré tout, ce grading semble être bien être un outil pronostique de valeur aux vues des résultats statistiques exposés.

□ Grading de Peña & Clemente

L'étude de cohorte menée par Peña *et al.* montre que le grade histologique (tiré de leur propre système de grading) est bien un facteur pronostique à valeur prédictive indépendante en analyse multivariée lorsque l'on utilise la *DFI*. En utilisant l'*OS*, le stade clinique et le grade histologique sont alors sélectionnés comme co-variables indépendantes (Peña *et al.*, 2013).

Peña *et al.* observent également que des femelles à tumeur(s) mammaire(s) de grade III sont plus souvent sujettes à l'apparition de métastases ou de récurrences (71,42 %) qu'en cas de tumeur(s) mammaire(s) de grade I ou II (Peña *et al.*, 2013).

Carvalho et son équipe ont validé ce système de grading par la suite en montrant que le grade histologique est bien un facteur prédictif de *OS* en analyse multivariée (Tableau 15) (Carvalho *et al.*, 2016).

Temps de survie (OS)	Grade I	Grade II	Grade III	Interprétation
Peña <i>et al.</i> (2012)	Toutes vivantes à l'issue des deux ans post-opératoires	Moyenne : 32,84 mois	Moyenne : 20,36 mois	Résultats significatifs (p < 0,001)
Carvalho <i>et al.</i> (2016)	25,47 mois	15,72 mois	5,03 mois	Résultats significativement différents (p < 0,001)

Tableau 15 : Temps de survie obtenus dans les études de cohorte de Peña *et al.* et Carvalho *et al.* en utilisant le système de grading de Peña & Clemente.

- *Index pronostique*

Un index pronostique correspond à un système de scoring découlant de la combinaison de plusieurs facteurs pronostiques et visant à prédire l'évolution d'une maladie et à déterminer la meilleure thérapie à entreprendre.

Un index a été créé et est actuellement fréquemment utilisé dans le cas du cancer du sein chez la femme. Il s'agit de l'index pronostique de Nottingham ou NPI pour *Nottingham Prognostic Index*.

Marta Santos a proposé en 2015 un index dérivé du NPI pour les carcinomes mammaires invasifs canins. Cet index repose sur le grade histologique et la taille tumorale tout comme le NPI ; il utilise en revanche comme troisième facteur pronostique l'invasion lymphovasculaire et/ou la présence de métastases au sein des nœuds lymphatiques périphériques (à la place du « stade ganglionnaire » utilisé dans le NPI).

Le score final est obtenu en utilisant la formule suivante :

$$NPI = 0,2 \cdot T + NHG + LVI_N$$

Avec :

- *T* : Taille tumorale (cm)
- *NHG* (Nottingham Histological Grade) : grade histologique avec respectivement 1, 2, 3 points accordés pour les grades I, II et III.
- *LVI_N* : Invasion lymphovasculaire et/ou métastase au sein des nœuds lymphatiques périphériques avec 1 point en cas d'absence ; 2 points en cas de présence.

Santos *et al.* sont par ailleurs parvenus à déterminer la valeur-seuil du score la plus sensible et la plus spécifique, c'est-à-dire la valeur-seuil à partir de laquelle le devenir des animaux divergeait le plus. En effet, le groupe d'individus ayant un score inférieur à 4,25 points est associé à un OS et un *DFI* plus élevés que le groupe d'individus présentant un score supérieur à 4,25 points. Ce seuil est significativement pronostique dans la cohorte totale et la cohorte de chiennes à tumeur mammaire « triple négatif » ; ce qui n'est pas le cas de la cohorte à tumeur mammaire de type « luminal » (Figure 24).

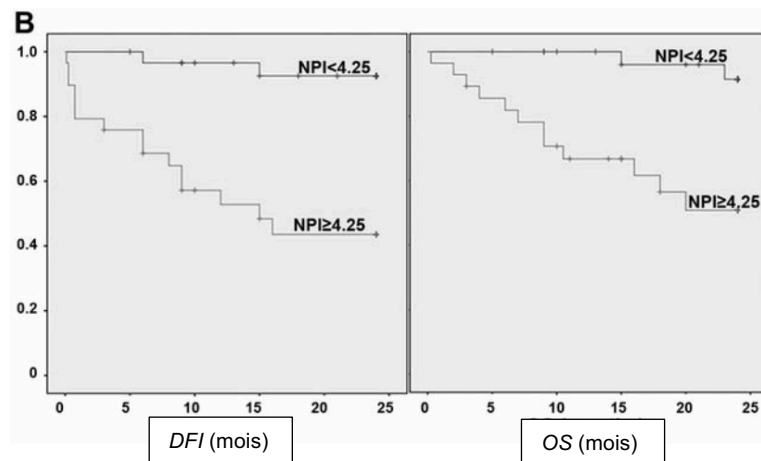


Figure 24 : Survie globale (OS) et intervalle sans progression (DFI) des chiennes de la cohorte totale (en mois) selon l'index de Santos.

En utilisant ce seuil de 4,25 points, on obtient ainsi une sensibilité de 88 % et une spécificité de 67 %. D'autres études ont également été menées par la suite pour intégrer à cet index des composantes immunohistochimiques (Santos *et al.*, 2015).

Cet index a par ailleurs été validé par l'étude de cohorte de Mouneyrac en 2018 (Mouneyrac, 2018).

c. Paramètres immunohistochimiques

- *Valeur pronostique de certains biomarqueurs*

Les principaux marqueurs de valeur pronostique utilisés sont ER, HER2 et COX-2.

Au sujet d'ER, une surexpression de ER est généralement associée à un pronostic favorable en cas de tumeur mammaire maligne (Cassali *et al.*, 2020). A l'inverse, une faible expression de ces récepteurs est associée à un mauvais pronostic (Im *et al.*, 2014).

Mouneyrac montre dans son étude de cohorte que le risque de décès toutes causes confondues (OS) ou de décès lié au cancer (SS) diminue respectivement de 30 % et 25 % en cas de tumeur mammaire ER α + (en utilisant une valeur-seuil de positivité de 10 %). (Mouneyrac, 2018)

Pour Chocteau *et al.*, le risque de décès toutes causes confondues est diminué de 41 % en cas de tumeurs mammaires canines ER α + (en comparaison avec les tumeurs mammaires canines ER α -) et le risque de décès lié au cancer de 58 % (Chocteau *et al.*, 2019).

Concernant HER-2, les études se contredisent. Dans l'étude de Varallo *et al.* de 2019, 80 % des chiennes à tumeur(s) HER2+ développent des métastases cutanées ou pulmonaires au cours de leur suivi post-opératoire. Ces dernières présentent un temps de survie (OS) de 167 jours. Parmi les animaux décédés, 70 % d'entre eux sont morts de leurs métastases (Varallo *et al.*, 2019). A l'inverse, dans l'étude de Hsu *et al.* de 2009 sur 91 femelles à tumeur(s) mammaire(s) maligne(s), les chiennes à tumeur(s) mammaire(s) HER2+ présentaient un temps de survie plus long ainsi qu'un taux de survie plus élevé que celles à tumeur(s) mammaire(s) HER2- (Hsu *et al.*, 2009). Ressel *et al.* n'observent quant à eux aucune corrélation entre statut HER2 de la tumeur et type histologique, grade histologique ou encore intensité d'invasion lymphatique. Les temps de survie des chiennes à tumeur mammaire HER2+ ne sont par ailleurs pas significativement différents de ceux rencontrés chez les chiennes à tumeur(s) mammaire(s) HER2-. Les mêmes résultats sont également constatés par Campos *et al.* en 2015 (Campos *et al.*, 2015 ; Ressel *et al.*, 2013).

- *Valeur pronostique des immunophénotypes*

Les tumeurs lumineales (HER2- ; ER/PR+) semblent être de meilleur pronostic (avec en moyenne 3,5 mois de survie de plus qu'en cas de tumeurs d'autres immunophénotypes) (Hanzenne *et al.*, 2010). A l'inverse, les tumeurs mammaires « triple négatives » (HER2- ; ER-/PR-) sont associées à un pronostic faible (A. Gama *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2013), pronostic d'autant plus faible en cas de sous-type « basal-like » ou « basal » (HER2- ; ER-/PR- ; un marqueur basal positif).

Les diverses données obtenues au cours des différentes études menées sur le sujet sont présentées ci-dessous dans le tableau 16 :

Immunophénotype	Temps de survie moyen ; taux de mortalité	Index Ki-67 médian (A. Gama <i>et al.</i> , 2008)	Grade (A. Gama <i>et al.</i> , 2008)	Pourcentage d'apparition de métastases (pulmonaires, hépatiques et/ou cutanées) ou de récurrences (Varallo <i>et al.</i> , 2019)
Type « Luminal » (HER2- ; ER/PR + ou -)	<ul style="list-style-type: none"> • Temps de survie médian 3,5 fois supérieur à celui des autres immunophénotypes (A. Gama <i>et al.</i>, 2008 ; Kim <i>et al.</i>, 2013). • Taux de mortalité plus élevé en cas de type « luminal B » qu'en cas de type « luminal A » (Varallo <i>et al.</i>, 2019). 	22 %	Pour le sous-type « luminal A » : 33 % grade I 53 % grade II	18,4 %
Type « Triple négative » (HER2- ; ER/PR-)	<ul style="list-style-type: none"> • Temps de survie moyen : 274 jours (Varallo <i>et al.</i>, 2019) • Chiennes à tumeur(s) mammaire(s) de sous-type « basal » présentent un temps de survie OS plus bas que les chiennes à tumeur(s) mammaire(s) de tout autre immunophénotype (A. Gama <i>et al.</i>, 2008). 	28,14 %	Pour le sous-type « basal » : 55,6 % de grade III	76,4 %

Tableau 16 : Relevé chiffré des études menées sur la valeur pronostique de l'immunophénotypage des tumeurs mammaires canines.

d. Conclusion

Il est ainsi possible d'évaluer le devenir d'un animal atteint d'une ou plusieurs tumeurs mammaires en relevant diverses informations relatives au patient (âge, caractéristiques cliniques...) mais également à la nature de la tumeur (caractéristiques histologiques, immunohistochimiques...). L'évolution clinique des chiennes à tumeur(s) mammaire(s) peut être ainsi estimée et communiquée en clinique par le vétérinaire aux propriétaires de l'animal. Certains des facteurs pronostiques évoqués sont par ailleurs des facteurs prédictifs d'efficacité de traitement et donc d'une utilité certaine dans le choix du traitement à mettre en place (chimiothérapie, thérapie ciblée...).

2. Les organoïdes

Les organoïdes sont des structures cellulaires tridimensionnelles mimant l'architecture et le fonctionnement d'un organe cible (intestin, pancréas, foie, glande mammaire, cerveau etc.). Ils sont cultivés à partir de cellules souches prélevées de l'organe en question et générés *in vitro* dans des milieux spécifiques enrichis en facteurs de croissance et de différenciation spécifiques. Il s'agit à l'heure actuelle d'un modèle *ex vivo* intermédiaire entre étude *in vivo* sur animal et étude *in vitro* sur lignées cellulaires.

Leur champ d'application est multiple : étude du développement tissulaire, des mécanismes cellulaires, de la pathologie, analyse du génome, recherche pharmaceutique (cinétique, toxicité...) etc.

Leur représentativité biologique est encore à affiner ; cependant le développement de nouveaux milieux de culture (hormones, cellules immunitaires etc.) et de biomatériaux (exemple : Matrigel, une MEC soluble extraite des tissus à étudier etc.) continue de les rendre de plus en plus performants. D'autre part, ces outils permettraient de diminuer l'utilisation d'animaux en recherche expérimentale.

Il s'agira dans cette seconde partie d'évaluer la qualité de modélisation et d'expliquer l'utilité de ces outils émergeant en biologie cellulaire dans le domaine de la cancérologie en s'appuyant principalement sur l'exemple du cancer mammaire (chez la femme principalement).

A. Des structures tridimensionnelles cultivées *in vitro* comme modèles tumoraux

a. Définitions, généralités et comparaison avec les autres modèles expérimentaux couramment utilisés

Il existe en biologie cellulaire plusieurs supports d'étude utilisés en cancérologie : les lignées cellulaires, les xénogreffes dérivées de patients (ou *PDX* : *Patient-Derived Xenografts*) et enfin les organoïdes aussi appelés « tumoroïdes » (ou *PDTOs* : *Patient-Derived Tumor Organoids*).

Une lignée cellulaire correspond à une population de cellules cultivée à partir d'une unique cellule issue de tissus d'organismes vivants et partageant le même patrimoine génétique.

Les *PDX* sont des modèles tumoraux qui consistent quant à eux à greffer des extraits de tumeurs sur des souris immunodéficientes. Ces derniers sont généralement utilisés après analyse sur lignée cellulaire et permettent notamment d'évaluer la croissance tumorale sur modèle vivant. Il est possible de générer des *PDX* dans l'optique de créer par la suite des organoïdes : on parle de *PDX organoids* ou *PDXOs*. Les xénogreffes sont alors utilisées comme outil d'amplification en étude expérimentale.

Enfin, les organoïdes sont quant à eux des structures tridimensionnelles capables d'auto-organisation obtenues à partir de cellules primaires (issues de prélèvements de tissus tumoraux dans le domaine de la cancérologie), ou de cellules progénitrices aussi appelées cellules souches pluripotentes induites (*iPSC* pour *induced-Pluripotent Stem Cells*) de divers types cultivées dans des milieux enrichis en facteurs de croissance (EGF (*Epidermal Growth Factor*), Noggin, neuréguline mitogène 1, inhibiteurs de ROCK (*Rho-associated coiled-coil Containing protein Kinase*), FGF-10 etc.) et spécifiques en nature et en quantité à un organe lorsqu'elles se différencient. Ils tendent à se rapprocher au maximum de l'architecture et de la fonctionnalité des tissus dont ils dérivent.

Pour résumer, les organoïdes se distinguent principalement des autres modèles expérimentaux par la présence concomitante de types cellulaires multiples appartenant à un tissu cible spécifique et surtout par leur architecture tridimensionnelle (Figure 25) (Qu *et al.*, 2017 ; Simian et Bissell, 2017 ; Yang *et al.*, 2020).

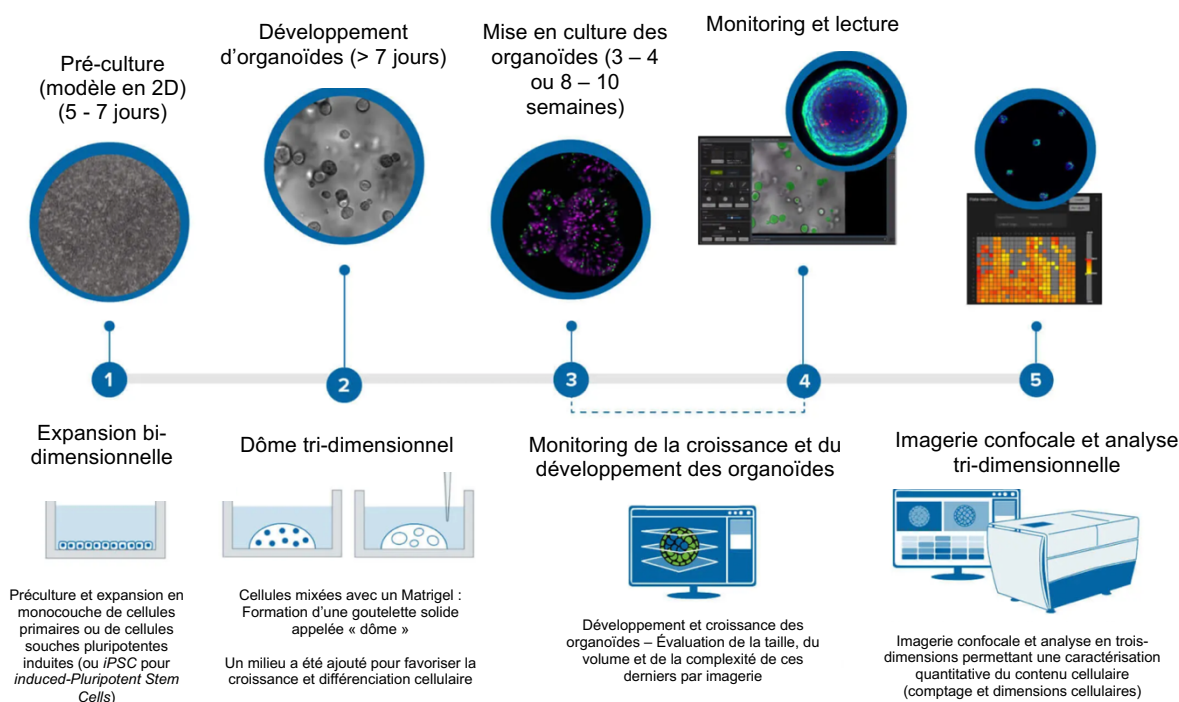


Figure 25 : Chronologie de la construction d'organoïdes (Issue de 2023, « Optimize your technology », Molecular Devices, *The essential guide to organoids in drug discovery*).

Les principaux avantages à l'utilisation des organoïdes en cancérologie sont les suivants :

- Le maintien du génotype original et des caractéristiques biologiques de la tumeur.
- La stabilité, simplicité et rapidité de mise en culture.
- Leur utilité dans l'étude de la cancérogenèse, de l'hétérogénéité et la dissémination des tumeurs, mais aussi dans l'évaluation pré- et post-clinique de l'efficacité d'un traitement (sensibilité ou résistance, sélection d'une certaine combinaison de molécules de chimiothérapie, thérapie ciblée selon les mutations génétiques mises en évidence ...).
- Leur potentielle utilisation en immunothérapie par amplification et activation de lymphocytes mis en contact avec les organoïdes qui seront ensuite utilisés pour traiter le patient.

Les lignées cellulaires et les xénogreffes sont des modèles moins efficaces et par ailleurs moins représentatifs de la réalité car souvent dérivés de tumeurs de stade avancé. Ils sont ainsi moins représentatifs de l'hétérogénéité cellulaire rencontrée *in vivo* sur les tumeurs mammaires.

Les lignées cellulaires subissent généralement de multiples mutations au cours de leur mise en culture ; elles ne reflètent ainsi plus les caractéristiques génétiques de la tumeur initiale. Par ailleurs, la culture cellulaire ne permet pas de simuler les interactions existantes *in vivo* entre cellules tumorales et micro-environnement tumoral (les cellules se développent de manière autonome indépendamment les unes des autres).

Quant aux xénogreffes, elles ne permettent pas de simuler pleinement les caractéristiques et l'hétérogénéité des tumeurs, ni d'étudier la tumorigenèse et sont difficilement utilisables dans le criblage à haut débit de molécules thérapeutiques. Par ailleurs, la xénotransplantation est un processus laborieux, chronophage, plus coûteux et moins éthique que la culture d'organoïdes (Tableau 17) (Weeber *et al.*, 2017 ; Yang *et al.*, 2020).

Technologie	Lignée cellulaire	PDX (<i>Patient-Derived Xenografts</i>)	PDTOs (<i>Patient-Derived Tumor Organoids</i>)
Origine	Tumeur maligne de grade avancé	Tumeur maligne de grade avancé	Patient
Représentativité biologique	Limitée	Physiologique	Semi-physiologique
Architecture cellulaire	Peu ou pas	Peu ou pas	Proche du tissu d'origine
Vascularisation et système immunitaire	Non	Oui	Non sauf si mise en place d'une co-culture
Facilité de manipulation	Excellente	Limitée	Bonne mais variable
Création d'une biobanque	Oui	Oui	Oui
<i>Genome editing</i> (possibilité de modification localisée de la séquence génomique)	Oui	Oui mais peut nécessiter la génération de cellules souches embryonnaires	Oui
Modélisation de l'organe (capacité à récapituler les fonctions spécifiques du tissu)	Pauvre	Oui mais nécessité d'utiliser un environnement tissulaire particulier	Adapté pour l'étude de la communication intercellulaire et microenvironnementale et de la morphogénèse tissulaire
Représentativité de l'hétérogénéité cellulaire dans la tumeur	Nulle (Composition cellulaire monotypique)	Partielle	Forte (Coexistence de multiples types cellulaires)
Utilisation comme outil préclinique dans l'établissement d'un traitement personnalisé	Non	Non	Oui
Criblage moléculaire à haut débit	Non	Non	Oui

Tableau 17 : Comparatif entre les différents modèles expérimentaux utilisables en cancérologie (Issu de Yang *et al.*, 2020).

b. Les tumoroïdes, de bons modèles représentatifs

De multiples études ont été menées afin d'évaluer la capacité des tumoroïdes (issus de glandes salivaires, d'intestin, de pancréas, de côlon, de poumon etc.) à conserver les caractéristiques morphologiques, histologiques et génétiques de leur tumeur d'origine notamment dans le cas du cancer mammaire (Neal *et al.*, 2018).

- *Conservation des caractéristiques histologiques et phénotypiques*

Sachs *et al.* ont évalué les caractéristiques histopathologiques et phénotypiques sur 100 tumoroïdes mammaires (issus de tumeurs primaires et de métastases mammaires). La majorité des tumoroïdes conservaient les caractéristiques histologiques macroscopiques (organisation spatiale etc.) et microscopiques (atypies nucléaires, figures mitotiques, apoptose etc.) du tissu tumoral mammaire initial. En effet, les carcinomes canauxaux génèrent généralement des organoïdes solides à cellules jointives ; à l'inverse, les carcinomes lobulaires forment des organoïdes à cellules disjointes. Globalement, la majorité des tumoroïdes mammaires conservent par ailleurs les anomalies cellulaires (macronucléole, « cellules en bague à chevalière » ou *signet ring cells*...) retrouvées sur la tumeur d'origine. Les *signet ring cells* sont de cellules remplies de mucine qui repousse le noyau de la cellule sur le côté lui donnant ainsi cette forme de « chevalière ». On les observe en grande quantité en cas de cancer de l'estomac, des ovaires et du sein chez la femme.

Enfin, une conservation de l'expression des biomarqueurs (ER/PR, HER2) est observée. 75 % des tumoroïdes issus de tumeur mammaire ER/PR négatives conservaient ce même phénotype et plus de 90 % pour les tumoroïdes issus de tumeur mammaire ER/PR positives conservaient également le même phénotype. Cependant si la majorité des organoïdes conservent l'expression en ER (contrairement aux lignées cellulaires), leur capacité à répondre à l'introduction d'hormones est encore à démontrer (Figure 26) (Sachs *et al.*, 2018 ; Srivastava *et al.*, 2020).

- *Conservation des caractéristiques génétiques*

L'avantage des organoïdes est qu'il est ainsi possible d'extraire le matériel génétique sur des cellules uniquement tumorales. Il n'y a plus de cellules génétiquement normales « contaminantes » sur ces derniers, ce qui permet de dresser des profils génétiques plus épurés, sans « bruit de fond ».

La majorité des études montrent qu'il y a généralement bien conservation du profil génétique (mutations ponctuelles de substitution, réarrangements chromosomiques etc.) sur des organoïdes mammaires. Les quelques cas de divergence génétique observés entre tumeur mammaire et organoïde associé sont à relier à l'absence d'environnement tumoral lors de la culture *in vitro*. Des études comparatives plus précises du transcriptome de tumeurs mammaires et des tumoroïdes générés devront être menées par la suite (Aboukheyr Es *et al.*, 2018 ; Sachs *et al.*, 2018 ; Soysal *et al.*, 2015).

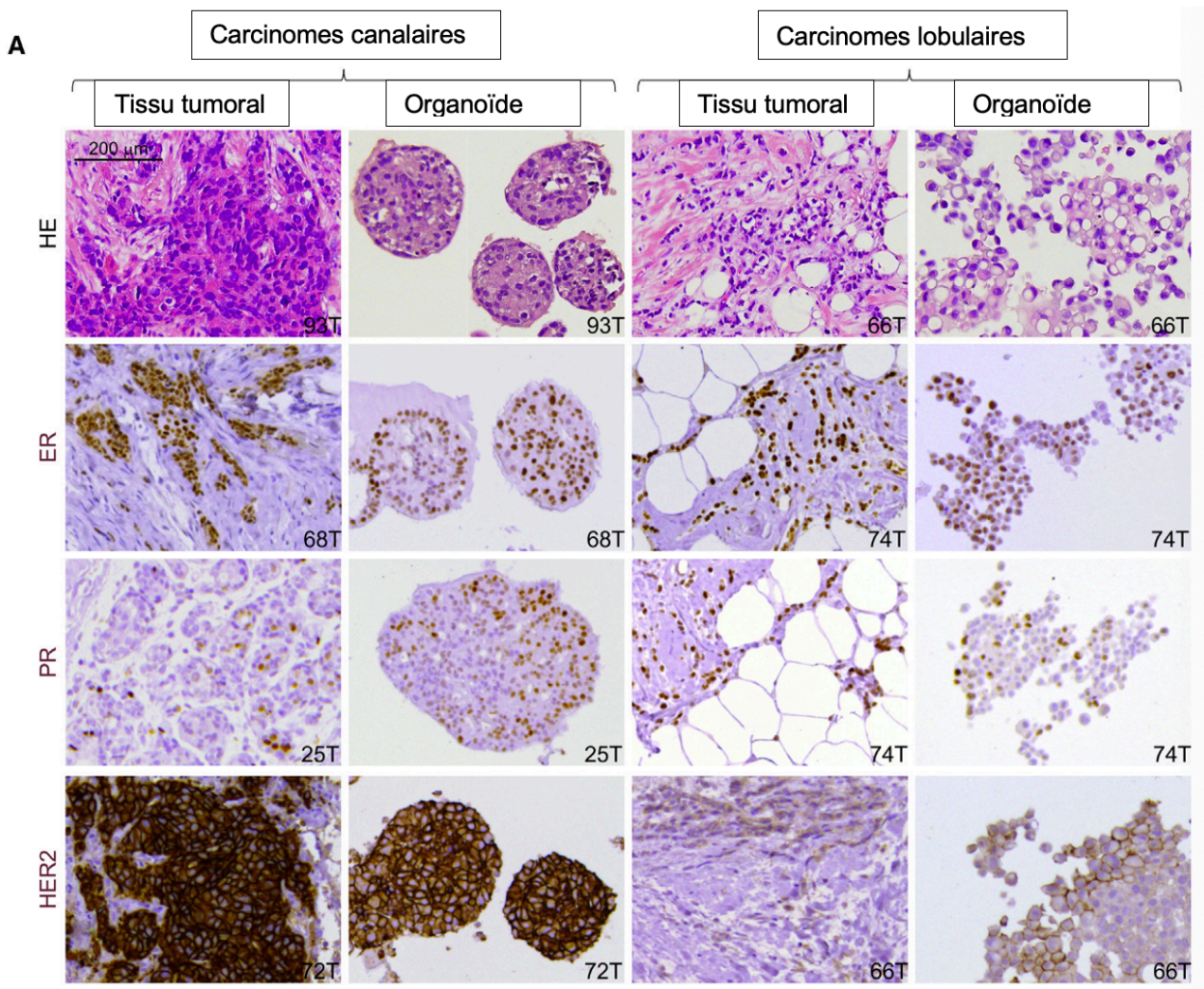


Figure 26 : Images histologiques et immunohistochimiques comparatives de tumeurs mammaires et de leur organoïde associé (Issues de Sachs et al., 2018).

Sont présentés à gauche des exemples de carcinomes canauxiaux et à droite des exemples de carcinomes lobulaires. On note que les tissus présentent généralement un épithélium tumoral entouré de cellules mésenchymateuses et inflammatoires, ce qui n'est pas retrouvé sur leurs organoïdes associés qui sont quant à eux exclusivement composés de cellules épithéliales. Les statuts ER, PR et HER2 des tumeurs mammaires d'origine sont bien conservés dans les organoïdes à l'immunohistochimie. Barre d'échelle 200 µm.

HE : Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine

ER : Estrogen Receptor

PR : Progesterone Receptor

HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2

- *Utilisation de milieux de culture récapitulant le microenvironnement tumoral*

On distingue parmi les méthodes de culture de cellules cancéreuses *in vitro* trois principaux types : la culture en conditions ALI (*Air-Liquid Interface*) utilisée pour la culture de lignées cellulaires tumorales, la culture sphéroïde correspondant à la combinaison d'un milieu ALI et d'une matrice (souvent à base d'acide hyaluronique et de collagène de type I) utilisée pour la culture de tumoroides et enfin les « organoïdes sur puce » (*organoïd-on-a-chip*). Toutes ces méthodes de culture peuvent être utilisées en cancérologie à partir de cellules primaires tumorales mais également de cellules souches pluripotentes.

Dans le cas du modèle ALI, les cellules sont placées sur un filtre perméable à la surface d'un milieu liquide enrichi. Une fois les cellules « prêtes » (c'est-à-dire possédant le matériel protéique nécessaire à leur multiplication), ce milieu est retiré. Les cellules commencent alors à proliférer voire à initier leur différenciation en cas d'utilisation de cellules souches. Il s'agit d'un système statique où les cellules s'organisent en structure plane et donc en deux dimensions.

Parmi les trois évoquées, cette méthode de culture est la moins coûteuse ; il est cependant difficile avec cette dernière d'étudier la dynamique spatio-temporelle des cellules ainsi que les interactions environnementales des tumeurs. En effet, la plupart des récepteurs de surface par lesquels l'épithélium interagit avec son environnement sont localisés au pôle basal des cellules (par exemple les récepteurs à la prolactine), pôle non accessible en cas de culture 2D. A l'inverse, en culture 3D, les pôles basaux ainsi que les récepteurs localisés sur ce pôle des cellules sont désormais accessibles. La fixation à leur ligand (et donc l'activation des voies de signalisation associées) étant alors possible, diverses protéines nécessaires au développement tumoral, à la mise en mouvement et à la communication cellule-MEC sont alors synthétisées (Figure 27).

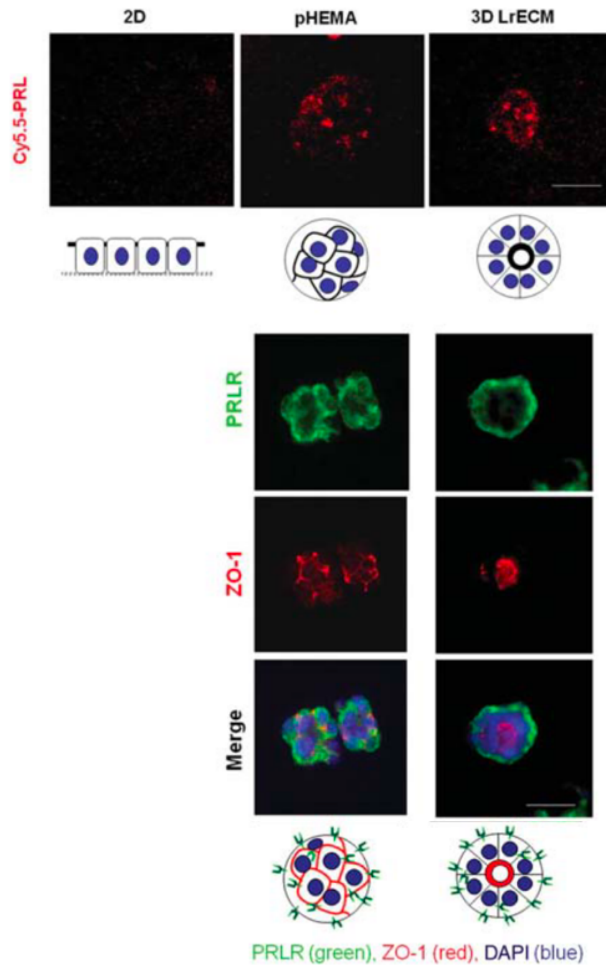


Figure 27 : Mise en évidence de la présence du récepteur à la prolactine selon le milieu de culture utilisé (Issue de Furata et Bissell, 2016).

Le récepteur à la prolactine (PRLR en vert) est exposé sur la surface basolatérale quand les cellules épithéliales forment des colonies polarisées tridimensionnelles en présence de LrECM (matrice extra-cellulaires enrichies en laminine).

Les cellules cultivées en 2D ne répondent pas à une mise en contact avec de la prolactine (Cy5.5-labeled prolactin) (absence de production lactée) contrairement aux cellules cultivées en 3D LrECM.

Les pôles apicaux des cellules sont marqués en rouge avec le marqueur ZO-1 et le matériel génétique en bleu avec du DAPI.

La technologie de culture tridimensionnelle (ou tumoroïde) constitue un outil représentatif des conditions physiologiques rencontrées dans l'organisme permettant ainsi de contrecarrer les difficultés rencontrées ci-dessus. En effet, il devient possible d'étudier les véritables interactions existant entre les cellules et avec le microenvironnement tumoral par restitution de la polarité cellulaire et la mise en place d'une co-culture. Pour cela, des cellules immunitaires (cellules dendritiques, lymphocytes T et B (LT et LB), macrophages (*TAM* : *Tumor-Associated Macrophages*), cellules NK...) généralement issues de prélèvements sanguins réalisés chez l'individu sont introduites dans le milieu de culture. L'objectif est de mimer au mieux le microenvironnement tumoral rencontré *in vivo*, mais également de pouvoir étudier la réponse immunitaire de l'hôte (recrutement cellulaire, production de cytokines, réponse inflammatoire, angiogenèse, cicatrisation...) (Neal *et al.*, 2018).

Neal *et al.* montrent que la co-culture de sphéroïdes issus de cellules primaires mammaires associées à leur microenvironnement tumoral immunitaire assure une conservation du matériel immunitaire spécifique à chaque individu. Les lymphocytes d'infiltration tumorale (*TIL*) sont les lymphocytes retrouvés dans le microenvironnement tumoral. Une fois prélevé puis introduit en co-culture avec l'organoïde, ils ont été montrés qu'ils récapitulaient fidèlement le répertoire des récepteurs des cellules T (*TCR*) (qui sont les récepteurs des lymphocytes permettant de reconnaître des éléments du non-soi au sein de l'organisme) retrouvés sur les *TIL* du microenvironnement de la tumeur initiale (Choi *et al.*, 2020 ; Neal *et al.*, 2018). A noter que les *TIL* ne peuvent survivre qu'approximativement 1 mois en conditions de culture normales. L'introduction d'IL-2 dans le milieu permettrait de prolonger cette durée d'une semaine pour les lymphocytes CD3+, CD4+ et CD8+ sans jamais pouvoir dépasser 60 jours de survie (Neal *et al.*, 2018).

Ainsi, chaque tumeur est en réalité associée à un microenvironnement tumoral qui lui est propre ; des améliorations sur ce terrain sont encore à développer pour se rapprocher au mieux des environnements spécifiques à chacune (Aboukheyr Es *et al.*, 2018).

La culture sur puce consiste quant à elle en l'utilisation d'une chambre de culture associée à un bio-réacteur permettant une mise en mouvement d'un milieu enrichi imitant étroitement la force mécanique ainsi que les gradients biochimiques rencontrés dans le microenvironnement tumoral *in vivo*. Elle constitue ainsi une technologie de pointe dans l'analyse des interactions environnementales possibles en cas de cancer.

- *Représentativité en criblage moléculaire*

Les organoïdes représentent également de manière plus fidèle la réponse thérapeutique aux molécules *in vivo* et sont donc des outils d'intérêt majeur en recherche pharmaceutique, dans l'identification de gènes de résistance à certaines molécules et à la mise en place d'un traitement personnalisé chez le patient. Le fait que l'on puisse générer un grand nombre d'organoïdes présente également un avantage majeur dans l'investigation thérapeutique. Une large étude menée par Weeber *et al.* sur divers types de tumeurs a notamment permis de montrer qu'il existe bien une corrélation positive entre réponse thérapeutique observée sur patient (*in vivo*) et réponse thérapeutique observée au préalable sur organoïdes (Aboukheyr Es *et al.*, 2018 ; Nagle *et al.*, 2018 ; Weeber *et al.*, 2017).

B. Intérêt des organoïdes en cancérologie – Application au carcinome mammaire

a. Utilité dans la compréhension de la cancérogenèse et des dynamiques tumorales

- *Cancérogenèse*

Le cancer se développe généralement par accumulation de plusieurs mutations et modifications épigénétiques au sein du tissu sain d'origine.

Les principales modifications génétiques identifiées dans le cas du cancer du sein sont : l'hyper- ou hypodiploïdie, les mutations (somatiques dans 80 % des cas), des modifications du nombre de copies chromosomiques ou CNA (*Copy Number Alterations*) (Morjaria, 2021 ; Sachs *et al.*, 2018).

On distingue parmi les mutations retrouvées en cas de cancer, les mutations « pilotes » ou *driver mutations* et les mutations « passagères ».

Les mutations pilotes déterminent le processus de croissance, de développement et de progression du cancer. Elles sont principalement retrouvées sur les parties codantes du génome mais peuvent également concerner les parties non codantes comme celles des promoteurs. Elles sont généralement spécifiques à un type de cancer. En réalité, il existe des mutations pilotes communes à plusieurs cancers (exemple : sein et prostate). Elles constitueraient des cibles d'intérêt dans l'établissement d'un traitement anti-cancéreux lorsqu'elles sont identifiées chez l'individu atteint.

Les mutations passagères correspondent quant à elles simplement à la multitude d'autres mutations retrouvées sur la cellule cancéreuse. Elles ne contribuent pas directement au développement du cancer. Elles sont cependant le reflet de l'hétérogénéité cellulaire au sein du tissu tumoral et du fort taux de mutations en cas de cancer (Morjaria, 2021 ; Wodarz *et al.*, 2018).

Les signatures mutationnelles sont des combinaisons de mutations caractéristiques (mutations pilotes et passagères) générées par des processus mutagènes spécifiques comme des défaillances des voies de réparation de l'ADN, une mauvaise réplication de l'ADN. Si certaines mutations pilotes sont généralement communes à un même type de cancer (exemple du déficit en BRCA1/2 sur le cancer du sein chez la femme), une signature mutationnelle est propre à chaque individu atteint d'un même cancer.

- *Étude de la morphogenèse et de la dynamique spatiale des tumeurs mammaires*

Une mise en mouvement ainsi qu'une modification morphologique et cellulaire des tumoroïdes ont été mis en évidence en cas d'introduction de facteurs de croissance ou de modification de la composition de la MEC. L'utilisation de l'immunohistochimie sur tumoroïdes permet de caractériser ces modifications spatio-temporelles et ainsi de mieux comprendre la dynamique structurelle des tumeurs mammaires *in vivo* (élongation canalaire, embranchement, dissémination cellulaire...).

Plusieurs phénomènes ont pu ainsi être observés à l'aide de tumoroïdes.

Par exemple, Petersen *et al.* ont montré en 1997 que des cellules mammaires normales répondaient différemment à la mise en contact avec une matrice enrichie en laminine 111 ou (LN)-1 en comparaison à des cellules mammaires malignes. Les cellules normales entraient en quiescence et formaient des sphéroïdes polarisés contrairement aux cellules issues de tumeurs mammaires malignes qui génèrent des masses désorganisées. Cela prouve ainsi que les voies de signalisation activées par (LN)-1 sont altérées chez les cellules malignes (Petersen *et al.*, 1992).

De même, Tanner *et al.* observent que les cellules mammaires normales sont capables d'effectuer un mouvement de rotation nommé *CAMo* ou *Coherent Angular Motion* pour former des sphéroïdes, capacité non retrouvée chez les cellules tumorales. La capacité à réaliser ce mouvement de rotation semble dépendante de la présence de jonctions intercellulaires c'est-à-dire serrées (constituées d'intégrines) et adhérentes (constituées de cadhérines) de qualité (Petersen *et al.*, 1992 ; Tanner *et al.*, 2012). Cette incapacité à se polariser serait également imputable à des anomalies du complexe protéique LINC chez les cellules de tumeurs mammaires. Le complexe LINC est composé de nesprines localisées dans la membrane externe de l'enveloppe nucléaire et de protéines à domaine SUN localisées dans la membrane interne du noyau. Ce dernier assure un lien mécanique entre le cytosquelette (constitutif des jonctions intercellulaires et des jonctions entre MEC-cellules) et le noyau et joue ainsi un rôle dans divers processus cellulaires comme la mécanotransduction (entre MEC et noyau) et le positionnement nucléaire. Un déficit ou des anomalies structurelles de cette protéine sont rencontrés en cas de cancer mammaire et entraînent ainsi une déformation nucléaire et une perte de polarité cellulaire (Chang *et al.*, 2015 ; Osmanagic-Myers *et al.*, 2015).

Le phénomène d'élongation du tissu mammaire a également pu être analysé. L'élongation résulterait de la migration de cellules épithéliales qui finissent par s'intercaler radialement pour former plusieurs couches. Cette stratification se réalise également au niveau du bouton terminal du tissu en mouvement, cela grâce à une perte de la polarité apico-basale et une orientation pré-déterminée des divisions cellulaires.

Enfin certaines modifications structurelles subies par le tissu mammaire en cas de perturbations génétiques ou microenvironnementales (plus ou moins mesurables quantitativement) ont pu être décrites. Le phénomène de transition cellulaire a notamment été observé sur des tumoroïdes mammaires. Les cellules épithéliales lumorales doivent en effet « se transformer » en cellules myoépithéliales pour passer la frontière mécanique formée par ces dernières et se disperser. Ce phénomène était environ 1,3 fois plus observé sur des carcinomes canaux invasifs que sur les carcinomes canaux *in situ* dans l'étude de Srivastava *et al.* Cela corrobore bien la récente idée que les cellules myoépithéliales constituent une frontière mécanique empêchant la dissémination des cellules tumorales de manière dose-dépendante et qu'une transition épithélio-mésenchymateuse ou une rupture de cette barrière semble nécessaire à leur dissémination (Soysal *et al.*, 2015 ; Srivastava *et al.*, 2020).

- *Évaluation des interactions micro-environnementales et du métabolisme tumoral*

Srivastava *et al.* a montré que le remodelage du collagène, l'orientation et la migration des cellules stromales des MEC, ainsi que les interactions de la tumeur avec les hormones et les cellules immunitaires environnantes ont un impact sur le développement et la dissémination tumorale.

On citera par exemple les interactions existantes entre fibroblastes et cellules mammaires. La production de FGF par les fibroblastes, facteur ayant un rôle dans l'embranchement et la prolifération épithéliale des cellules mammaires normales semble plus élevée en cas de cancer du sein. Il a par ailleurs été montré sur organoïdes qu'en cas de cancer du sein, les fibroblastes du microenvironnement tumoral subissent de multiples modifications génétiques (de type *SNP*) sous influence des modifications de la composition de la MEC. Ces fibroblastes sont appelés *CAF* pour *Cancer-Associated Fibroblasts* et jouent un rôle dans la tumorigenèse (par stimulation de signaux activateurs de la transcription d'une protéine activatrice du développement tissulaire nommée *NOTCH2* au sein des cellules mammaires), l'angiogenèse périphérique et la dissémination tumorale (notamment la dissémination de métastases au cerveau) (Soysal *et al.*, 2015 ; Srivastava *et al.*, 2020).

La co-culture de tumoroïdes et de son microenvironnement immunitaire associé permet une analyse relativement fidèle et représentative de ce dernier. Certains phénomènes de défense immunitaire anti-tumorale et modifications locales du système immunitaire rencontrés en cas de cancer du sein ont ainsi pu être identifiés.

Plusieurs études sur organoïdes ont par exemple montré que les cellules dendritiques immatures ont à l'origine une activité pro-angiogénique qu'elles perdent après maturation. Il a cependant été observé sur organoïdes qu'en cas de cancer du sein, le stroma tumoral est particulièrement plus riche en cellules dendritiques immatures. Cette inhibition du processus de maturation serait imputable à la production de certains facteurs en cas de tumeurs mammaires notamment VEGF, IL-10, TGF β , la prostaglandine E2 ou certaines chimiokines produites par les cellules cancéreuses et les *TAM* (Korkaya *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2009 ; Lotze, 1997). Molécules génératrices d'un micro-environnement immunosuppresseur favorable au développement tumoral via divers mécanismes (Figure 28).

Le rôle des protéines PD-1 et PD-L1 des LT cytotoxiques comme « checkpoint » immunitaire évoquées préalablement a également pu être exploré (Soysal *et al.*, 2015).

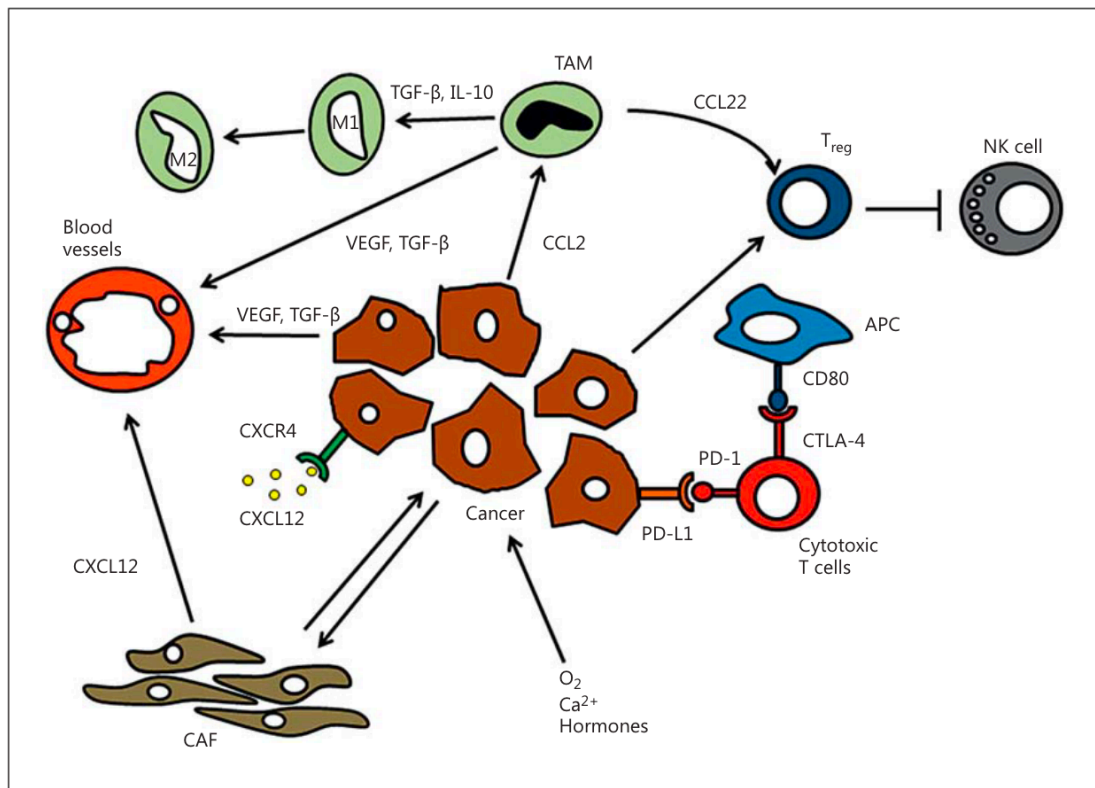


Figure 28 : Interactions entre composants du microenvironnement immunitaire et cellules tumorales mammaires chez l'humain (Issue de Soysal *et al.*, 2015).

- CTLA-4 ; Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 : Protéine 4 associée au LT cytotoxique
- NK cell ; Natural Killer cell : cellules NK
- APC Antigen-Presenting Cells : Cellules présentatrices d'Antigènes
- CAF Cancer-Associated Fibroblasts : Fibroblastes du microenvironnement tumoral
- TAM Tumor-Associated Macrophages : Macrophages du microenvironnement tumoral
- T reg : Lymphocytes T régulateurs
- CCL/CXCL Chemokine Ligands : Chémokines
- CXCR Chemokine Receptor : Récepteur aux chémokines

Le phénotype M1 représenté sur ce schéma en haut à gauche correspond à celui fréquemment rencontré chez les macrophages lors de stimulation du système immunitaire (par exemple en cas de contact avec un pathogène). Le phénotype M2 est rencontré lors de la sécrétion de cytokines issues de la voie Th2 plutôt impliquées dans la cicatrisation de plaie et le remodelage tissulaire. En cas de cancer, les TAMs stimulent l'activité des autres macrophages environnants sous leur phénotype 2, ce qui permettrait de faciliter la dissémination tumorale par interaction avec la barrière myoépithéliale de la tumeur. Ces derniers ont également un rôle immunosuppresseur en activant les LT régulateurs du microenvironnement tumoral.

Furuta *et al.* ont par ailleurs pu explorer en 2011 l'activité anti-tumorale de la cytokine IL-25 sur des cellules issues de cancer de sein exprimant les récepteurs à IL-25 (récepteurs permettant de fixer IL-25 mais aussi IL-17B ; ils sont uniquement présents sur les cellules mammaires cancéreuses). Cette cytokine active certaines voies de signalisation pro-apoptotiques. A l'inverse la fixation d'IL17B sur ces récepteurs induit une activation des cellules NK- κ B et des voies d'activation de prolifération cellulaire. Cette étude a permis de montrer que les MEC issues de tissu sain ne produisaient que l'IL-25 au cours de la formation d'acini, tandis que les cellules issues de tissus tumoraux mammaires ne produisaient que l'IL-17B (Furuta *et al.*, 2011).

Ainsi, IL-25 est une cytokine rencontrée dans les MEC de tissu mammaire sain et utilisée comme moyen de défense naturel contre la néo-formation d'une tumeur mammaire en ciblant les cellules pré-cancéreuses exprimant les récepteurs IL-25R. Certaines cellules tumorales parviendraient à échapper à ce mécanisme préliminaire de défense anti-tumoral et par la suite à inhiber sa production pour à l'inverse favoriser la production d'IL-17B à activité pro-oncogène (Furuta *et al.*, 2011).

Des améliorations doivent être apportées sur l'exploration du microenvironnement tumoral (cellules stromales, immunitaires et vasculaires) car en effet, les organoïdes ne le récapitulent que de manière artificielle et partielle. Il semblerait par ailleurs que l'utilisation de micro-puces à système fluïdo-dynamique soit plus indiquée pour reconstituer un milieu analogue à celui environnant *in vivo*.

b. Un nouvel outil préclinique thérapeutique et de criblage moléculaire haut débit

La principale application d'intérêt que l'on cherche à développer à l'heure actuelle est le potentiel prédictif des organoïdes dans l'établissement du traitement médical chez le patient. Les tumoroides semblent en effet être de bons candidats à l'évaluation préalable de la réponse de la tumeur mammaire d'origine à certaines molécules thérapeutiques (évaluation du taux d'inhibition de croissance, de la viabilité, de l' IC_{50} etc.).

D'une part, par le fait qu'ils permettent d'étudier le génome des tumeurs pour mieux appréhender les potentielles origines génétiques des mécanismes de résistance aux molécules. On parle de « signature pharmacotranscriptomique » constituant le reflet prédictif de la réponse tumorale aux molécules utilisables (Homicsko, 2020 ; Tiriac *et al.*, 2018). Lee *et al.* ont par exemple exploré le mécanisme de résistance aux inhibiteurs d'EGFR sur des tumeurs mammaires malignes exprimant EGFR. Le séquençage d'une large bio-banque de tumoroides mammaires humains a permis d'identifier des mutations du gène *FAM83A* comme étant à l'origine de cette résistance. Les mutations du gène *FAM* constitueraient ainsi une potentielle nouvelle cible thérapeutique en thérapie génique en cas de cancer du sein chez la femme (Lee *et al.*, 2012).

L'étude génomique des tumeur mammaire sur organoïdes permet donc d'envisager ou non l'introduction d'une chimiothérapie ou d'autres thérapies adjuvantes (par exemple, une tumeur mammaire ER positive sera favorable à l'introduction d'une hormonothérapie, une tumeur mammaire Cox-2 positive à celle d'un AINS, thérapie ciblée etc.) et ainsi de composer un traitement personnalisé à chaque patient (Sachs *et al.*, 2018 ; Srivastava *et al.*, 2020).

D'autre part, l'analyse du micro-environnement tumoral stromal et immunitaire sur organoïdes permet quant à elle d'évaluer la réponse thérapeutique à certaines molécules utilisables en immunothérapie (notamment les effets des anticorps monoclonaux anti-PD1 sur les TAMs, l'activation des cellules dendritiques en ciblant les récepteurs TLR etc.) contrairement aux autres méthodes de culture (Homicsko, 2020 ; Weeber *et al.*, 2017). En effet, chaque tumeur a son propre microenvironnement, ce qui explique la variabilité des réponses thérapeutiques d'un individu à un autre (Aboukheyr Es *et al.*, 2018).

Enfin, les tumoroïdes constitueraient un modèle pré-clinique d'intérêt majeur dans l'analyse des effets thérapeutiques de certaines molécules et dans la caractérisation de leur toxicité. Contrairement aux xénogreffes, ces derniers permettent en effet de générer une large bio-banque et ainsi d'effectuer un criblage moléculaire à haut débit.

Par exemple, des tumoroïdes mammaires ont été utilisés pour tester la sensibilité de tumeurs mammaires BRCA1/2 négatives aux inhibiteurs de polyADP-ribose polymérase ou PARPis (niraparib et olaparib). Sachs *et al.* ont ainsi montré en 2018 que des tumoroïdes mammaires ayant une signature mutationnelle associée à un fort taux de mutations sur *BRCA 1* et *2* (les gènes *Breast Cancer 1* et *2*) sont plus sensibles aux PARPis que ceux ayant une signature à faible taux de mutations sur *BRCA*. L'établissement du profil génomique d'organoïde a ainsi permis d'évaluer la réponse thérapeutique avant toute utilisation à l'échelle de l'individu (Sachs *et al.*, 2018) (Figure 29).

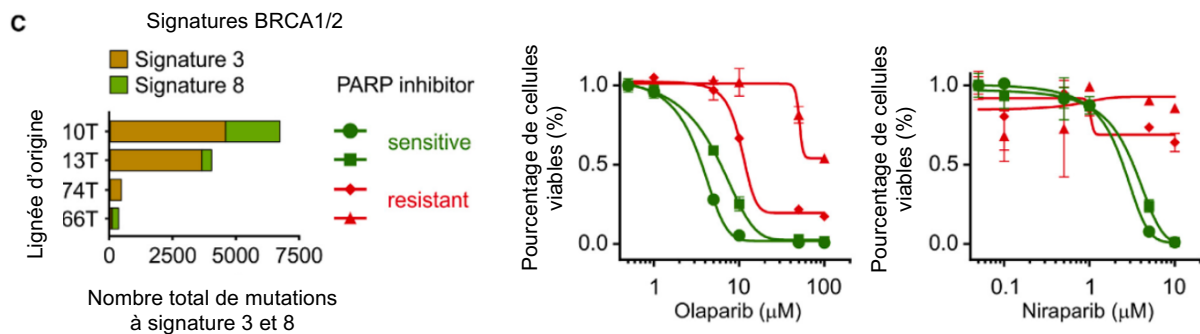


Figure 29 : Utilisation de tumeurs mammaires en criblage thérapeutique (Sachs et al., 2018).

Ici, deux principaux sous-types de signatures mutationnelles identifiables sur BRCA1 et BRCA2 sont présentées : la signature 3 et la signature 8.

Le graphique à barres à gauche représente le nombre total de mutations sur quatre organoïdes issus de tumeurs mammaires : les organoïdes 10T et 13T ont des signatures mutationnelles associées à BRCA 1 et 2 les plus marquées ; 74T et 66T les plus faibles.

Leur réponse au PARPi est indiquée en vert en cas de sensibilité, en rouge en cas de résistance.

À droite, des courbes de réponse thérapeutique ont été établies en évaluant le nombre de cellules viables au sein des organoïdes après 2 semaines de mise en contact avec différentes concentrations d'olaparib et de niraparib.

La réponse thérapeutique aux deux PARPi correspond dans cette étude bien à celle prédite par l'étude génomique préalable : les organoïdes 10T et 13T sont sensibles à l'utilisation des deux molécules (plus de 50% des cellules ne sont plus viables au bout de deux semaines d'utilisation d'olaparib ou de niraparib à une concentration supérieure à 10 μM). À l'inverse, les organoïdes 74T et 66T présentent un taux supérieur à 50% de cellules viables pour des concentrations en olaparib supérieures à 10 μM et une très faible réponse au niraparib.

Il a également été montré qu'il était possible d'évaluer quantitativement la réponse métabolique des tumeurs aux molécules anti-cancéreuses. L'imagerie métabolique au microscope optique ou *OMI* (*Optical Metabolic Imaging*) basée sur l'immunofluorescence permet de quantifier précocement les modifications métaboliques de la cellule en estimant le ratio redox (c'est-à-dire le rapport « intensité de fluorescence du NADH » sur « intensité de fluorescence du FAD ») et la durée de vie du NADH (à l'état libre ou lié) et du FAD, deux co-enzymes majeures des réactions métaboliques de la cellule. Les 3 valeurs obtenues permettent par la suite d'établir « l'index *OMI* » par régression linéaire. Plus la molécule est efficace, plus l'activité enzymatique des cellules tumorales diminue et donc plus l'index *OMI* diminue. Cette méthode peut être utilisée sur organoïdes pour évaluer l'efficacité d'un traitement avant sa mise en place chez le patient.

L'étude de Walsh *et al.* de 2014 montre que l'index *OMI* initial différait d'une tumeur mammaire à une autre selon son immunophénotype (Figure 30).

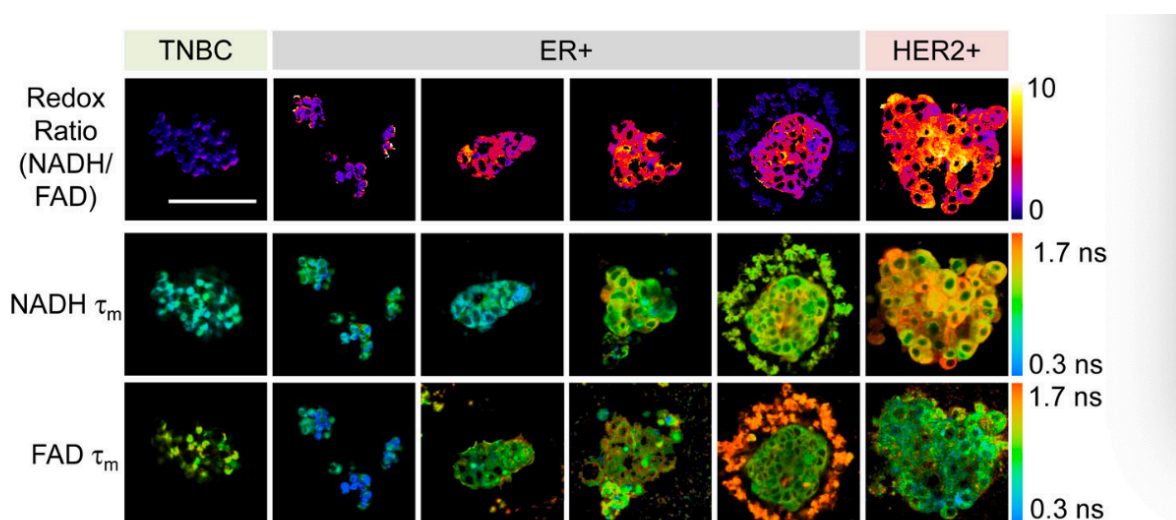


Figure 30 : Ratio redox, NADH τ_m , et FAD τ_m d'organoïdes dérivés de tumeurs mammaires primaires humaines obtenues par retrait chirurgical (D'après Walsh *et al.*, 2014).

*Ratio redox NADH/FAD (première rangée d'images) et les durées de vie de NADH (deuxième rangée) et FAD (troisième rangée) sur des cancers mammaires de type triple-négatif ER-/HER2- ; ER+/HER2- et HER2+/ER- (Échelle = 100 μ m). Ces images mettent en évidence l'hétérogénéité du *OMI* initial selon l'immunophénotype tumoral.*

TNBC : Triple negative Breast Cancer

Ils ont ensuite analysé grâce à cette méthode la réponse thérapeutique à certaines molécules sur des tumeurs mammaires issues de souris xéno greffées puis des tumeurs mammaires humaines issues d'exérèse chirurgicale. L'introduction de paclitaxel (molécule de chimiothérapie) ou de trastuzumab (inhibiteur de HER2), de tamoxifène, de fulvestrant (deux inhibiteurs sélectifs de ER) ou de XL147 (un inhibiteur de PI3K) ou d'une combinaison de ces molécules réduisait plus ou moins significativement l'*OMI* index selon l'immunophénotype tumoral du tumeur après 24 à 72h d'incubation. Dans le cas où l'index *OMI* diminuait sur organoïde, cette diminution était associée à une réduction de la croissance tumorale *in vivo* sur les souris

xénogreffées au bout de 7 à 11 jours, ainsi qu'à une augmentation du processus de mort cellulaire et à une diminution de la prolifération cellulaire au sein de l'organoïde.

Prenons l'exemple de l'analyse de l'effet d'un inhibiteur de HER2 et d'un inhibiteur de ER sur des organoïdes dérivés de tumeurs mammaires HER2+/ER- et de type triple-négatif (ER-/HER2-). L'index *OMI* des tumeurs mammaires HER2+/ER- diminue significativement après 24h de traitement à base de trastuzumab. A l'inverse aucune diminution significative de l'*OMI* n'est constatée après 24h de traitement par fulvestrant. Ces molécules n'ont aucun effet significatif sur le métabolisme cellulaire de tumeurs mammaires de type triple-négatif après 48h d'incubation.

De manière générale, Walsh *et al.* montrent également qu'un traitement basé sur l'association de plusieurs molécules présente des effets anti-tumoraux plus marqués (c'est-à-dire une diminution de l'index *OMI* significativement plus élevée) qu'en cas d'utilisation d'une seule molécule que ce soit sur organoïdes ou *in vivo* et permet notamment de contrer certains mécanismes de résistance qui ont pu être observés sur des tumeurs mammaires HER2+ traitées avec du trastuzumab.

L'avantage du monitoring de la réponse thérapeutique via utilisation de l'index *OMI* sur organoïdes est d'illustrer la réponse thérapeutique en 72h en comparaison au monitoring réalisé conventionnellement par mesure de l'évolution de la taille de la tumeur *in vivo* ; évolution qui s'évalue généralement sur 3 semaines. Il est cependant à noter que la réponse thérapeutique à ces molécules (utilisées seules ou conjointes) est en réalité plus hétérogène *in vivo* que sur tumoroides (Walsh *et al.*, 2014).

Les tumoroides mammaires semblent donc être un modèle pré-clinique d'intérêt majeur dans l'établissement d'un traitement personnalisé et en recherche pharmaceutique notamment dans le cas du cancer du sein chez la femme et par extension des tumeurs mammaires chez la chienne (Figure 31).

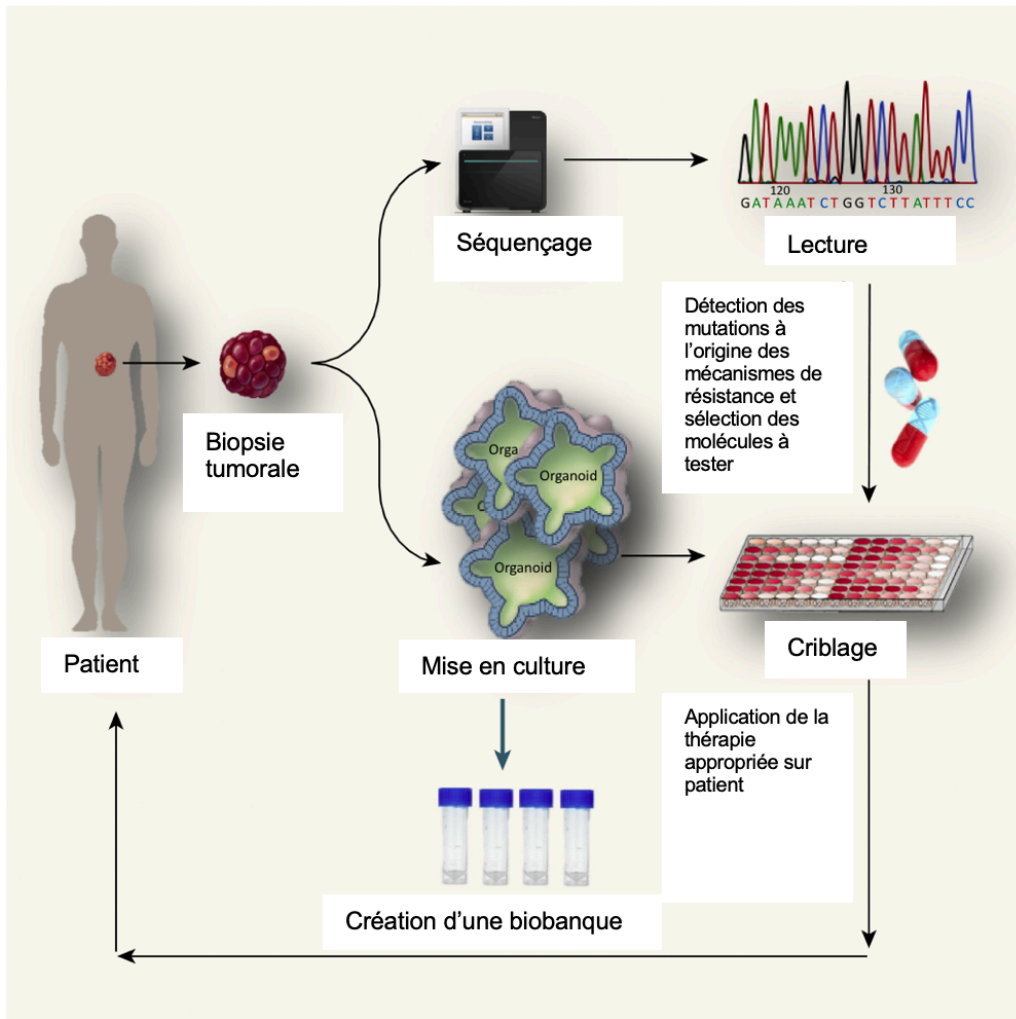


Figure 31 : Illustration de l'intérêt préclinique des organoïdes en cas de cancer chez l'humain (Aboukheyr Es et al., 2018).

Deuxième partie : étude expérimentale – Projet de recherche 3R-INCA d'OCR et PRISM

1. Introduction

Les organoïdes issus de tumeurs mammaires émergent comme de nouveaux modèles d'intérêt pour tester l'efficacité thérapeutique et la toxicité médicamenteuse en étude préclinique. Ils pourraient être utiles dans le développement de nouveau protocole thérapeutique et dans l'établissement d'une médecine personnalisée que ce soit en médecine vétérinaire ou humaine.

Les carcinomes mammaires invasifs de chiens se sont présentés comme de bons modèles de comparaison et de transition en médecine humaine étant données les similitudes anatomiques, morphologiques, génomiques et moléculaires mais également cliniques (incidence, impact hormonal, ...) observées entre cancer mammaire canin et cancer du sein au cours de ces dernières années. Ces tumeurs sont généralement de grande taille et donc une source accessible de matériel par biopsies ou résection chirurgicale pour la recherche (Guigon, 2006).

L'objectif de l'étude réalisée était de montrer que les organoïdes conservent bien les caractéristiques morphologiques, histologiques et immunophénotypiques des tumeurs mammaires dont ils sont issus.

2. Matériels et méthodes

A. Objectifs

L'étude dirigée par le laboratoire OCR de Lille (59041) reposait sur la collecte d'échantillons de tumeurs mammaires malignes après retrait chirurgical chez des chiennes. Des organoïdes ont été développés à partir de ces tumeurs au laboratoire PRISM de l'Université de Lille (59655 Villeneuve d'Ascq) et ont été caractérisés par histologie et immunohistochimie par le Dr Ingrid Bemelmans de Cerbavet (91300 Massy). Le but était de comparer le profil morphologique et moléculaire des organoïdes développés à celui des tumeurs dont ils étaient issus pour en prouver leur qualité de modèle expérimental ex vivo.

B. Population et design de l'étude

L'étude incluait toute chienne de compagnie présentée pour retrait chirurgical de tumeur mammaire chez un vétérinaire.

S'agissant de recherches exploratoires, aucune évaluation statistique de la taille d'échantillon n'a été réalisée.

C. Recrutement, sites d'investigation et de développement des organoïdes

Le recrutement de ces chiennes a été réalisé de mai 2021 à mars 2023 dans diverses cliniques réparties principalement dans les départements Nord (59) et Pas-de-Calais (62) en France mais également en Belgique : Oncovet (Villeneuve d'Ascq 59650, France) ; Clinique des Domaines (Bondues 59910, France) ; Clinique du Molinel (Marcq-en-Baroeul 59700, France) ; Clinique Les Cigognes (Courrières 62710, France) ; Clinique du Dr Dewulf (Lens 62300, France) ; Clinique des Erables (Liévin 62800, France) ; Clinique Vetecom (Comines-Warneton 7780, Belgium) ; Clinique des Bruyères (Bernissart 7320, Belgium).

Les cliniques étaient contactées par moi-même chaque semaine à toutes les deux semaines pour se tenir informer de leur planning de chirurgie.

Les analyses histologiques et le développement des organoïdes ont été réalisés au sein du laboratoire PRISM de l'unité INSERM 1192 à la Faculté de Sciences et des Technologies au Département de biologie cellulaire à l'Université de Lille (5900).

D. Critères d'inclusion et de non-inclusion

Le diamètre de la tumeur mammaire devait être de minimum 2 cm. Le but étant qu'il y ait assez de matériel tumoral pour non seulement envoyer un échantillon tumoral pour analyse histologique à un laboratoire spécialisé (pour déterminer qu'il s'agissait d'une tumeur maligne ou non au préalable) ; mais également collecter les échantillons nécessaires aux analyses histologiques et au développement d'organoïdes associés à cette étude clinique. Pour être inclus dans cette étude clinique, il devait s'agir d'une tumeur mammaire maligne. Cette information était généralement obtenue environ 1 semaine après la chirurgie après analyse histologique en laboratoire vétérinaire spécialisé.

E. Collecte des échantillons

La tumeur mammaire était prélevée au cours de la procédure chirurgicale.

Deux échantillons tumoraux étaient collectés après résection de la tumeur : un premier morceau d'environ 1-2 cm³ était placé dans un tube à milieu spécifique et stocké à 4°C pour le développement des organoïdes ; un second morceau d'environ 0,5-1 cm³ était placé dans un tube avec formol et stocké à température ambiante pour la réalisation d'une analyse histologique. Cette analyse a été réalisée par la suite par le Dr Ingrid Bemelmans à Cerbavet (Massy 91377, France).

Les échantillons étaient collectés principalement par Emmanuel Bouchaert d'OCR au maximum dans les 2h suivant la chirurgie.

F. Traitement des tissus mammaires prélevés

Chaque échantillon de tumeur a été divisé en deux morceaux comme expliqué au préalable : un morceau était fixé dans du formol pendant 24h, déshydraté dans du saccharose à 20 % pendant 24h, enrobé dans de la gélatine, et enfin stocké à -80°C pour analyse histologique et coloration à l'Hémalun-Eosine-Safran. L'autre morceau prélevé était utilisé pour la culture des organoïdes. Pour

cela, il a été haché en plus fins morceaux d'environ 1 mm³ avant de subir une digestion enzymatique ((Raffo-Romero *et al.*, 2023).

G. Protocole de développement des organoïdes

Le morceau destiné à la culture d'organoïdes était placé dans 2 ml de solution HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) associée à des antibiotiques et antifongiques (Pénicilline-Streptomycine, Amphotéricine) ; 1 mg / ml de collagénase de type IV (Sigma) et 5 UI / ml de hyaluronidase (Sigma) à 37°C pendant 2h pour digestion enzymatique. Le tout était mixé toutes les 15 minutes pour aider cette digestion.

A la suite de cela, 10 ml de solution d'HBSS avec antibiotiques étaient ajoutés ; puis la suspension cellulaire était filtrée (Filtre Dutcher 100 µm). Le filtrat obtenu était centrifugé à 300 g pour 5 min. En cas d'apparition d'un culot rouge, les érythrocytes étaient lysés dans 1 ml de tampon de lyse des globules rouges (RBC, Invitrogen) pendant 5 min à température ambiante. 10 ml de solution d'HBSS avec antibiotiques étaient de nouveau ajoutés. Le nombre de cellules viables dans la suspension cellulaire était compté et 150 000 cellules sélectionnées pour le développement des tumoroïdes.

Les cellules sélectionnées étaient par la suite de nouveau mises en suspension dans une matrice composée de matrice extracellulaire et de facteurs de croissance spécifiques au développement d'organoïdes (Matrigel) où elles étaient réparties dans 24 puits préformés. Cette matrice gélosée était placée 30 min dans un incubateur pour solidification. 500 µL de milieu de culture étaient ensuite ajoutés dans chaque puits. Le milieu de culture était composé d'« Advanced DMEM » (Gibco) supplémenté de Glutamax, 10 mM d'Hepes, Pénicilline-Streptomycine, Amphotéricine, 50 µL / ml de primocine, du supplément B-27 (un mélange d'enzymes oxydantes, de protéines, de vitamines, d'acides gras favorisant la croissance cellulaire en culture *in vitro* en particulier en culture neuronale), 5 mM de nicotamide, 1,25 mM d'N-acétylcystéine, 250 ng / ml de la protéine *R-spondin 1*, 5 nM de *Heregulin β-1*, 100 ng / ml de la protéine *Noggin*, 20 ng / ml du facteur de croissance FGF-10, 5 ng / ml du facteur FGF-7, 5 ng / ml du facteur EGF, 500 nM d'A83-01 (inhibiteur des récepteurs à TGFβ), 500 nM de SB202190 (inhibiteur sélectif de la protéine kinase inductrice de mitose p38 qui joue un rôle dans la régulation des mitoses cellulaires et de l'apoptose) et 5 µM de Y-27632 (inhibiteur de la protéine ROCK (*Rho-associated coiled-coil Containing protein Kinase*) régulatrice de la migration cellulaire).

La récolte des tumoroïdes était ensuite réalisée après 42 jours de culture à l'aide d'un tampon phosphate salin ou PBS (*Phosphate-Buffered Saline*). Ils étaient alors recueillis dans un flacon de 15 ml pré-rempli avec du PBS contenant une solution d'albumine sérique bovine ou BSA à 1 % pour empêcher les cellules d'adhérer au tube. Ils étaient ensuite centrifugés à 300 g pour 5 min puis digérés dans une solution TrypLE (Gibco) pendant 5 min à 37°C. Après neutralisation enzymatique et lavage, les fragments de tumoroïdes étaient de nouveau mis en suspension dans du Matrigel et réensemencés comme expliqué ci-dessus pour permettre la formation de nouveaux tumoroïdes (Figure 32).

Après digestion initiale du tissu tumoral, 2 millions de cellules ont été cryoconservées pour le développement ultérieur de tumoroïdes. Dans ce cas, pour recréer des tumoroïdes à partir de cellules congelées, le flacon était décongelé lentement et les cellules centrifugées dans 10 ml de

HBSS avec antibiotiques à 300 g pour 5 min. Les cellules étaient ensuite dénombrées et ensemencées de la même façon qu'avec des cellules fraîches (Raffo-Romero *et al.*, 2023).

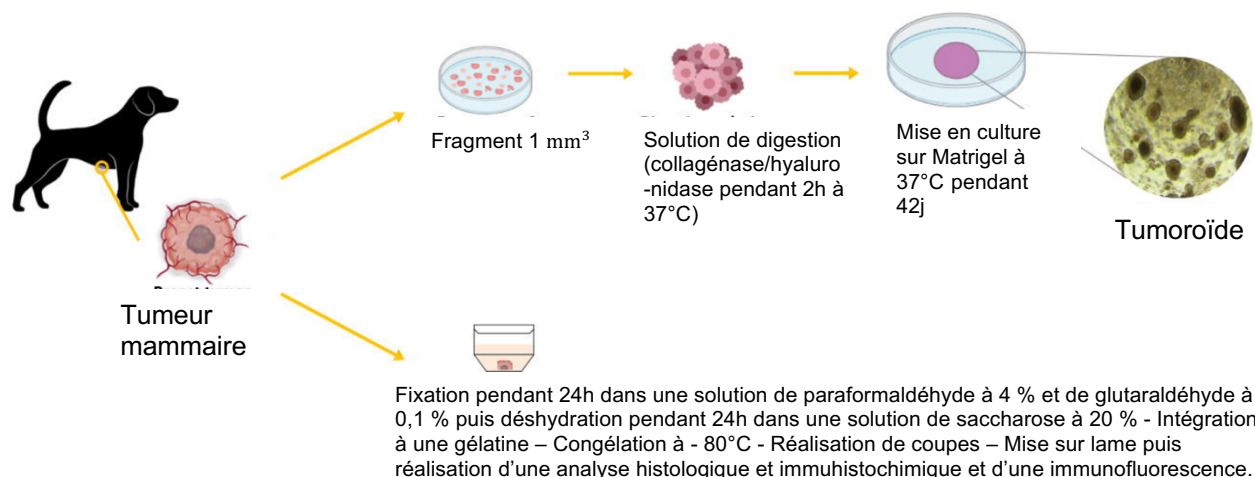


Figure 32 : Stratégie de culture de tumoroïdes à partir de tumeurs mammaires canines (Raffo-Romero *et al.*, 2022).

H. Histologie, immunohistochimie, immunofluorescence

Les tumoroïdes ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 2 % et de glutaraldéhyde à 0,1 % pendant 24h. Ils ont ensuite été déshydratés dans une solution de saccharose à 20% pendant 24h pour enfin être intégrés dans une gélatine et congelés à -80°C (Figure 32).

Une coloration à l'Hémalun-Éosine-Safran standard a été réalisée à l'aide de l'automate Tissue-Tek Prisma (colorateur sur lames) sur des coupes tumorales et de tumoroïdes de 5 µm d'épaisseur pour apprécier les détails de la structure cellulaire et tissulaire. Les images ont été acquises à l'aide du logiciel *Nikon Elements BR 4.50.00.151*.

La coloration pour immunohistochimie se réalisait ensuite sur coupes de tumeurs (5 µm d'épaisseur) et des tumoroïdes à l'aide d'un protocole spécifique à l'automate *Discovery XT* (Ventana Medical Systems, Inc). Les anticorps primaires utilisés au cours de cette étude étaient les suivants : ER (SC-8005, Santa Cruz), PR (790-4296, Roche) et HER-2 (790-4493, Roche). Les tumeurs ont été incubées 40 minutes avec l'anticorps primaire choisi puis avec un anticorps secondaire (*anti-rabbit* ou *anti-mouse HRP (Horseradish peroxidase)*). Une contre-coloration à l'hématoxyline et au réactif de bleuissement a ensuite été réalisée.

La coloration pour immunofluorescence était quant à elle réalisée sur coupes de tumeurs (12 µm d'épaisseur) et de tumoroïdes. Ces derniers étaient lavés 3 fois dans du PBS, pré-incubés avec une solution tampon de blocage (contenant du triton 0,3 %, du sérum de singe (*Normal Donkey Serum*) à 5 % et de l'ovalbumine à 2 % dans du PBS) pendant 1h à température ambiante. Puis les échantillons étaient incubés une nuit entière à 4°C avec un anticorps anti-Ki67 (790-4286, Roche). Après 3 lavages avec du PBS, les échantillons étaient incubés 1h à 37°C dans une solution contenant des anticorps d'âne secondaires *anti-rabbit* conjugués à du Fluor 488 (1 : 200, Invitrogen, Carlsbad CA, USA). Ils étaient ensuite rincés avec du PBS et les noyaux cellulaires étaient contre-colorés au colorant fluorescent Hoechst 33342 pendant 20 min à 4°C. Enfin, les coupes tumorales

et de tumoroïdes étaient recouvertes d'une lamelle avec milieu de montage pour immunofluorescence Dako (Agilent, Santa Clara CA, USA). Les échantillons sur lesquels aucun anticorps primaire n'avait été ajouté ont été utilisés comme contrôles négatifs.

3. Résultats

A. Données épidémiologiques.

Trente-unes tumeurs ont été collectées. Parmi elles, 6 ont été incluses dans l'étude et ont été utilisées pour générer des tumoroïdes. Seules 3 de ces tumeurs ont été utilisées pour comparer le statut histologique et immunophénotypique entre tumeur et organoïde. Ces analyses ont été faites par le Dr Ingrid Bemelmans d'un laboratoire extérieur spécialisé en histologie (Cerbavet) qui a estimé avoir le temps d'analyse les lames de trois tumeurs et de leurs tumoroïdes en l'espace de quelques semaines.

Les 6 tumeurs provenaient de chiens femelles non stérilisées d'âge compris entre 5 et 14 ans (avec une médiane d'âge à 11 ans) atteintes d'une tumeur mammaire primaire (non récidiviste) (Tableau 18).

Tumeur	Date de récolte de la tumeur	Age	Race	Sexe
TM-01	13/01/20	14 ans	Yorkshire	Femelle
TM-02	17/06/20	11 ans	Cocker	Femelle
TM-03	23/06/20	11 ans	Lhasa Apso	Femelle
TM-04	19/01/21	5 ans	French Bulldog	Femelle
TM-05	07/09/21	10 ans	Beauceron	Femelle
TM-06	21/09/21	11 ans	Croisé Border Collie	Femelle

Tableau 18 : Résumé des caractéristiques épidémiologiques des animaux prélevés.

Seules les tumeurs TM-03 ; TM-04 et TM-05 ont été analysées.

B. Histologie, immunohistochimie et immunofluorescence des tumeurs

L'immunophénotypage a été réalisé sur les 3 tumeurs étudiées en se basant sur l'expression de PR, ER et HER-2 en immunohistochimie. Deux tumeurs ont été évaluées de type « luminal » ; l'expression en ER de la tumeur TM-04 n'a pas pu être interprétée car la zone d'intérêt (où se localisait le carcinome) n'était pas présente sur la lame (Annexe n°1 et 3).

Les tumeurs TM-03 et TM-05 étaient revenues positives au marquage Ki-67. La tumeur TM-04 n'était pas interprétable pour Ki-67 (pour les mêmes raisons citées ci-dessus) (Annexe n°2 et 3).

Tumeur	Statut histologique	ER	PR	HER2	Immunophénotype	Ki67
TM-03	Carcinome tubulo-papillaire	Négatif	Positif (70% des cellules à une intensité modérée 2+ à forte 3+)	Positif ++	Luminal	3,5% (comptage réalisé sur 537 cellules)
TM-04	Carcinome	Non interprétable	Négatif	Négatif	Non interprétable	Non interprétable
TM-05	Carcinome micro-infiltrant	Négatif	Positif (60% des cellules à une intensité modérée 2+ à forte 3+)	Positif ++	Luminal	1,9% (comptage réalisé sur 370 cellules)

Tableau 19 : Statut histologique - immunophénotype des tumeurs prélevées.

ER : Estrogen Receptor

PR : Progesterone Receptor

HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2

C. Histologie, immunohistochimie et immunofluorescence des organoïdes

Les 3 lames d'organoïdes issus des tumeurs TM-03, TM-04 et TM-05 ont été analysées (Annexe n°4). Ces derniers ont conservé le même aspect histologique que leurs tumeurs d'origine (Tableau 20).

Concernant les profils d'expression à l'immunohistochimie ; les organoïdes des tumeurs sont de type triple-négatif. L'organoïde de la tumeur TM-05 a été interprété comme négatif à l'immunohistochimie pour ER et PR malgré un bruit de fond observé. Ce bruit de fond correspondait à un marquage non spécifique.

Ces résultats ne correspondent pas aux profils interprétés sur les tumeurs d'origine.

Au sujet de l'expression du marqueur Ki-67, l'expression était difficilement interprétable car très faible sur les organoïdes.

Tumeur	ER	PR	HER2	Immunophénotypage
TM-03	Négatif	Négatif	Négatif	Triple-négatif
TM-04	Négatif	Négatif	Négatif	Triple-négatif
TM-05	Noyaux négatifs (bruit de fond)	Noyaux négatifs (bruit de fond)	Négatif	Triple-négatif

Tableau 20 : Interprétation des lames histologiques et immunohistochimiques des organoïdes.

4. Discussion

Une certaine difficulté a été rencontrée dans le recrutement de chiennes à tumeurs mammaires (31 tumeurs récoltées en environ 2 ans dans 8 cliniques différentes réparties dans le Nord de la France et dans certaines cliniques frontalières de Belgique). Cela peut être dû au fait que la stérilisation devient désormais une pratique courante en médecine préventive vétérinaire.

Les tumoroïdes développés et analysés dans cette étude avaient conservé les aspects histologiques sans conserver les aspects immunohistochimiques des tumeurs d'origine contrairement à l'équipe de Sachs *et al.* (Sachs *et al.*, 2018).

Les lames utilisées étaient tirées de tumoroïdes frais, la question d'une potentielle modification du profil de ces derniers par un traitement comme une congélation n'est donc pas en vigueur dans ce cas.

Plusieurs difficultés ont été rencontrées lors de cette étude.

De grandes difficultés ont été rencontrées quant à la réalisation de l'immunohistochimie et l'immunofluorescence sur les organoïdes. Étant données la quantité limitée et une plus petite taille

des cellules sur organoïde que sur tissu, un possible défaut de fixation des anticorps peut être envisagé.

L'expression pour Ki-67 était très faible à nulle sur les organoïdes. Ces derniers n'ayant qu'une quinzaine de jour au moment de leur mise sur lame, la principale hypothèse était que le développement des organoïdes (limité à 42 jours) aurait été insuffisant à l'expression du gène type initial.

La lame utilisée pour la lecture de l'immunohistochimie pour ER ne présentait pas la zone d'intérêt (carcinome) pour la tumeur TM-04. L'immunophénotype n'a donc pas pu être interprété.

Un bruit de fond a par ailleurs été observé sur l'organoïde de la tumeur TM-05 en immunohistochimie. Ces réactions parasites pourraient provenir d'interactions non spécifiques développées entre l'une des protéines du marquage (anticorps primaire ou secondaire, peroxydase) et des constituants de la coupe (Montagne, 2005).

Enfin, si certaines études ont déjà été réalisées sur l'analyse histopathologique d'organoides (Sachs *et al.*, 2018), il s'est avéré difficile de trouver un laboratoire apte à analyser des lames d'organoides. Étant donné leur récente apparition, les spécialistes en histopathologie ne se sentaient pas encore très compétents sur le sujet et préféraient décliner la demande. C'est l'une des raisons (parmi le budget et le temps restreint donné pour la réalisation de ces analyses) pour lesquelles le nombre de lames à interpréter s'est limité à ce nombre.

Certaines études ont montré l'importance de la simulation d'un microenvironnement tumoral dans le développement des organoides (Neal *et al.*, 2018). D'autres essais pourront donc être réalisés en introduisant au milieu de culture certains éléments du microenvironnement tumoral (cellules dendritiques, lymphocytes, etc.) tirés de prélèvements sanguins de l'individu.

Conclusion

Le carcinome mammaire canin est un cancer sur lequel de nombreuses données bibliographiques sont disponibles. Les connaissances développées notamment sur ses aspects histopathologiques se sont principalement basées sur celles développées sur le cancer du sein en médecine humaine (classification histologique d'Elston et Ellis, immunophénotypage de Nielsen, ...). De nombreuses similitudes sont observées entre les deux.

Le carcinome mammaire canin s'est donc présenté comme bon modèle expérimental dans l'évaluation de l'intérêt préclinique des organoïdes. L'objectif principal de cette étude était de montrer qu'un organoïde conservait bien les aspects histopathologiques de sa tumeur d'origine.

De multiples biobanques de tumoroïdes issus de différents types cancers ont émergé et montré une conservation des caractéristiques histologiques et moléculaires entre tumeur et tumoroïde (Lo *et al.*, 2020). Cependant dans cette étude, les tumoroïdes mammaires conservaient globalement les aspects histologiques des tumeurs d'origine sans conserver leurs aspects moléculaires.

Une potentielle optimisation des conditions de culture et de traitement immunohistochimique (taille réduite, nombre limité de cellules, anticorps utilisés...) est à étudier. Certaines études ont montré notamment l'importance du micro-environnement tumoral constitués principalement de cellules immunitaires dans le développement de la tumeur. Il s'agira donc par la suite de mener des essais cliniques en introduisant dans les milieux de culture des organoïdes des cellules dendritiques, des lymphocytes, etc. tirés de prélèvements sanguins du patient.

Liste des références bibliographiques

- ABDELMEGEED, S.M., MOHAMMED, S. (2018) Canine mammary tumors as a model for human disease. *Oncology Letters* vol. 15, n° 6, p. 8195-8205. [<https://doi.org/10.3892/ol.2018.8411>]
- ABOULKHEYR ES, H., MONTAZERI, L., AREF, A.R., *et al.* (2018) Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach. *Trends in Biotechnology* vol. 36, n° 4, p. 358-371. [<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.12.005>]
- AMERICAN CANCER SOCIETY (2023) Breast Cancer Statistics | How Common Is Breast Cancer?. [<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/how-common-is-breast-cancer.html>] (consulté le 17/02/2022).
- ARAÚJO, M.R., CAMPOS, L.C., DAMASCENO, K.A., *et al.* (2016) HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. *Research in Veterinary Science* vol. 106, p. 121-130. [<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.03.020>]
- BEAUVAIS, W., CARDWELL, J.M., BRODBELT, D.C. (2012) The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs--a systematic review. *The Journal of Small Animal Practice* vol. 53, n° 6, p. 314-322. [<https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2011.01220.x>]
- BERAL, V., MILLION WOMEN STUDY COLLABORATORS (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* vol. 362, n° 9382, p. 419-427. [[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14065-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14065-2)]
- BLOWS, F.M., DRIVER, K.E., SCHMIDT, M.K., *et al.* (2010) Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Medicine* vol. 7, n° 5, p. e1000279. [<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000279>]
- BOBILLIER, A. (2018) Expression et signification pronostique des marqueurs de cellules souches cancéreuses CD44/CD24 dans les tumeurs mammaires canines : étude rétrospective de 96 cas. Thèse de médecine vétérinaire, École nationale vétérinaire de Lyon VetAgroSup.
- BORGE, K.S., MELIN, M., RIVERA, P., *et al.* (2013) The ESR1 gene is associated with risk for canine mammary tumours. *BMC Veterinary Research* vol. 9, n° 1, p. 69. [<https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-69>]
- BOSTOCK, D.E. (1975a) Proceedings: The prognosis following surgical excision of canine mammary carcinomata. *British Journal of Cancer* vol. 32, n° 2, p. 247-247. [<https://doi.org/10.1038/bjc.1975.179>]
- BOSTOCK, D.E. (1975b) Proceedings: The prognosis following surgical excision of canine mammary carcinomata. *British Journal of Cancer* vol. 32, n° 2, p. 247-247. [<https://doi.org/10.1038/bjc.1975.179>]
- BRASSART, G. (2008) Les tumeurs mammaires chez la chienne : données bibliographiques récentes concernant l'approche diagnostique et la proposition d'un pronostic fiable. Thèse de médecine vétérinaire, École nationale vétérinaire de Lyon VetAgroSup.
- BRUNETTI, B., BACCI, B., ANGELI, C., *et al.* (2021) p53, ER, and Ki67 Expression in Canine Mammary Carcinomas and Correlation With Pathological Variables and Prognosis. *Veterinary Pathology* vol. 58, n° 2, p. 325-331. [<https://doi.org/10.1177/0300985820973462>]
- BUISSON, R., MASSON, J.-Y. (2013) Fonction des suppresseurs de tumeur PALB2 et BRCA2 dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN. *Médecine/Sciences* vol. 29, n° 3, p. 301-307. [<https://doi.org/10.1051/medsci/2013293017>]
- CALAF, G., ECHIBURU-CHAU, C. (2012) Synergistic effect of malathion and estrogen on mammary gland carcinogenesis. *Oncology Reports* vol. 28, p. 640-6. [<https://doi.org/10.3892/or.2012.1817>]
- CALAF, G.M., GARRIDO, F. (2011) Catechol estrogens as biomarkers for mammary gland cancer. *International Journal of Oncology* vol. 39, n° 1, p. 177-183. [<https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1008>]
- CALAF, G.M., PARRA, E., GARRIDO, F. (2007) Cell proliferation and tumor formation induced by eserine, an acetylcholinesterase inhibitor, in rat mammary gland. *Oncology Reports* vol. 17, n° 1, p. 25-33. [<https://doi.org/10.3892/or.17.1.25>]
- CAMPOS, L.C., SILVA, J.O., SANTOS, F.S., *et al.* (2015) Prognostic significance of tissue and serum HER2 and MUC1 in canine mammary cancer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* vol. 27, n° 4, p. 531-535. [<https://doi.org/10.1177/1040638715592445>]
- CANADAS-SOUSA, A., SANTOS, M., LEAL, B., *et al.* (2019) Estrogen receptors genotypes and canine mammary neoplasia. *BMC Veterinary Research* vol. 15, n° 1, p. 325. [<https://doi.org/10.1186/s12917-019-2062-y>]

- CARVALHO, M.I., GUIMARÃES, M.J., PIRES, I., *et al.* (2013) EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumours. *Research in Veterinary Science* vol. 95, n° 3, p. 1094-1099. [https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.09.003]
- CARVALHO, M.I., PIRES, I., PRADA, J., *et al.* (2016) Ki-67 and PCNA Expression in Canine Mammary Tumors and Adjacent Nonneoplastic Mammary Glands: Prognostic Impact by a Multivariate Survival Analysis. *Veterinary Pathology* vol. 53, n° 6, p. 1138-1146. [https://doi.org/10.1177/0300985816646429]
- CASSALI, G., JARK, P., GAMBA, C., *et al.* (2020) Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors -2019. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* vol. 13, p. 555-574. [https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v13i3p555-574]
- CASSALI, G.D., GOBBI, H., MALM, C., *et al.* (2007) Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology* vol. 18, n° 3, p. 191-196. [https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2007.00412.x]
- CATOIO, C. (2014) Tumeurs Mammaires de la chienne: nouveau grading de Peña & Clemente. *Lapvso - Laboratoire d'Anatomie Pathologique Vétérinaire du Sud-Ouest*. [https://www.lapvso.com/le-nouveau-grading-des-tumeurs-mammaires-de-la-chienne-le-grading-de-pena-clemente/] (consulté le 26/02/2022).
- CAVALIERI, E.L., STACK, D., DEVANESAN, P.D., *et al.* (1997) Molecular origin of cancer: Catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 94, p. 10937-42. [https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10937]
- CHANG, C.-C., TSAI, M.-H., LIAO, J.-W., *et al.* (2009) Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 235, n° 4, p. 391-396. [https://doi.org/10.2460/javma.235.4.391]
- CHANG, W., WORMAN, H.J., GUNDERSEN, G.G. (2015) Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *Journal of Cell Biology* vol. 208, n° 1, p. 11-22. [https://doi.org/10.1083/jcb.201409047]
- CHOCTEAU, F., ABADIE, J., LOUSSOUARN, D., *et al.* (2019) Proposal for a Histological Staging System of Mammary Carcinomas in Dogs and Cats. Part 1: Canine Mammary Carcinomas. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 6, p. 388. [https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00388]
- CHOI, K.-Y.G., WU, B.C., LEE, A.H.-Y., *et al.* (2020) Utilizing Organoid and Air-Liquid Interface Models as a Screening Method in the Development of New Host Defense Peptides. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 10. [https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00228]
- CHOI, U.S., KIM, D.Y. (2011) Immunocytochemical detection of Ki-67 in Diff-Quik-stained cytological smears of canine mammary gland tumours. *Cytopathology: Official Journal of the British Society for Clinical Cytology* vol. 22, n° 2, p. 115-120. [https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2010.00756.x]
- DESSIMOULIE, A.S. (2008) Epidémiologie descriptive des tumeurs dans l'espèce canine: étude rétrospective dans trois laboratoires d'anatomie pathologique vétérinaire (2000-2005). Thèse de médecine vétérinaire, École nationale vétérinaire de Nantes Oniris.
- DIAS PEREIRA, P., LOPES, C.C., MATOS, A.J.F., *et al.* (2008) Estrogens metabolism associated with polymorphisms: influence of COMT G482a genotype on age at onset of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* vol. 45, n° 2, p. 124-130. [https://doi.org/10.1354/vp.45-2-124]
- DOBSON, J.M., SAMUEL, S., MILSTEIN, H., *et al.* (2002) Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice* vol. 43, n° 6, p. 240-246. [https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2002.tb00066.x]
- DUTRA, A.P., GRANJA, N.V.M., SCHMITT, F.C., *et al.* (2004) c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* vol. 37, n° 11, p. 1673-1681. [https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004001100013]
- ELSTON, C.W., ELLIS, I.O. (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* vol. 19, n° 5, p. 403-410. [https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x]
- ENGINLER, S.O., AKIŞ, I., TOYDEMİR, T.S.F., *et al.* (2014) Genetic variations of BRCA1 and BRCA2 genes in dogs with mammary tumours. *Veterinary Research Communications* vol. 38, n° 1, p. 21-27. [https://doi.org/10.1007/s11259-013-9577-7]
- EŽERSKYTĖ, A., ZAMOKAS, G., GRIGONIS, A., *et al.* (2010) The retrospective analysis of mammary tumors in dogs. *Veternarija ir Zootechnika* vol. 34, n° 75, p. 3-8
- FROMENTIN, E. (2002) Étude de la survie post-opératoire des chiennes opérées de tumeurs mammaires au service de pathologie de la reproduction de l'École vétérinaire de Nantes entre 1996 et 1999. Thèse de médecine vétérinaire, École nationale vétérinaire de Nantes Oniris.

- FURUTA, S., JENG, Y.-M., ZHOU, L., *et al.* (2011) IL-25 Causes Apoptosis of IL-25R-Expressing Breast Cancer Cells Without Toxicity to Nonmalignant Cells. *Science Translational Medicine* vol. 3, n° 78, p. 78ra31-78ra31. [<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001374>]
- GAMA, A., ALVES, A., SCHMITT, F. (2010) Expression and prognostic significance of CK19 in canine malignant mammary tumours. *Veterinary Journal* vol. 184, n° 1, p. 45-51. [<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.02.001>]
- GAMA, A., ALVES, A., SCHMITT, F. (2008) Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archiv* vol. 453, n° 2, p. 123-132. [<https://doi.org/10.1007/s00428-008-0644-3>]
- GAMA, A., GÄRTNER, F., ALVES, A., *et al.* (2009) Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science* vol. 87, n° 3, p. 432-437. [<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.04.016>]
- GAMA, A., PAREDES, J., GÄRTNER, F., *et al.* (2008) Expression of E-cadherin, P-cadherin and beta-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *Veterinary Journal* vol. 177, n° 1, p. 45-53. [<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.024>]
- GERALDES, M., GÄRTNER, F., SCHMITT, F. (2000) Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *The Veterinary Record* vol. 146, n° 14, p. 403-406. [<https://doi.org/10.1136/vr.146.14.403>]
- GILBERTSON, S.R., KURZMAN, I.D., ZACHRAU, R.E., *et al.* (1983) Canine Mammary Epithelial Neoplasms: Biologic Implications of Morphologic Characteristics Assessed in 232 Dogs. *Veterinary Pathology* vol. 20, n° 2, p. 127-142. [<https://doi.org/10.1177/030098588302000201>]
- GOLDSCHMIDT, M., PEÑA, L., RASOTTO, R., *et al.* (2011) Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* vol. 48, n° 1, p. 117-131. [<https://doi.org/10.1177/0300985810393258>]
- GUIGON, A.-L. (2006) Etude bibliographique comparée entre le cancer du sein et le cancer mammaire chez la chienne. Thèse de médecine vétérinaire, École nationale vétérinaire d'Alfort, n°13
- GUIL-LUNA, S., SÁNCHEZ-CÉSPEDES, R., MILLÁN, Y., *et al.* (2011) Aglepristone decreases proliferation in progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 25, n° 3, p. 518-523. [<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0723.x>]
- HANZENNE, C., IBISCH, C., ABADIE, J., *et al.* (2010) Enquête épidémiologique sur une série de cas d'adénocarcinomes mammaires chez la chienne: contribution à l'identification de facteurs pronostiques histopathologiques et Immunohistochimiques. Thèse de médecine vétérinaire, École nationale vétérinaire de Nantes Oniris.
- HELLMÉN, E., BERGSTRÖM, R., HOLMBERG, L., *et al.* (1993) Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology* vol. 30, n° 1, p. 20-27. [<https://doi.org/10.1177/030098589303000103>]
- HIRAYAMA, K., YOKOTA, H., ONAI, R., *et al.* (2002) Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. *Journal of Comparative Pathology* vol. 127, n° 4, p. 249-256. [<https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0590>]
- HOMICSKO, K. (2020) Organoid technology and applications in cancer immunotherapy and precision medicine. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 65, p. 242-247. [<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.05.002>]
- HSU, W.-L., HUANG, H.-M., LIAO, J.-W., *et al.* (2009) Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Veterinary Journal* vol. 180, n° 1, p. 116-123. [<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.10.013>]
- IKEDA, K., HORIE-INOUE, K., INOUE, S. (2015) Identification of estrogen-responsive genes based on the DNA binding properties of estrogen receptors using high-throughput sequencing technology. *Acta Pharmacologica Sinica* vol. 36, n° 1, p. 24-31. [<https://doi.org/10.1038/aps.2014.123>]
- IM, K.S., KIM, N.H., LIM, H.Y., *et al.* (2014) Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Veterinary Pathology* vol. 51, n° 3, p. 549-559. [<https://doi.org/10.1177/0300985813498780>]
- JAKAB, C., HALÁSZ, J., KISS, A., *et al.* (2008) Evaluation of microvessel density (MVD) in canine mammary tumours by quantitative immunohistochemistry of the claudin-5 molecule. *Acta Veterinaria Hungarica* vol. 56, n° 4, p. 495-510. [<https://doi.org/10.1556/AVet.56.2008.4.7>]
- KARAYANNOPOULOU, M., KALDRYMIDOU, E., CONSTANTINIDIS, T.C., *et al.* (2005) Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology* vol. 133, n° 4, p. 246-252. [<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.05.003>]
- KASZAK, I., RUSZCZAK, A., KANAFA, S., *et al.* (2018) Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Veterinaria Scandinavica* vol. 60, p. 66. [<https://doi.org/10.1186/s13028-018-0417-1>]

- KAWAI, K., UETSUKA, K., DOI, K., *et al.* (2006) The activity of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in mammary tumors of dogs and rats. *The Journal of Veterinary Medical Science* vol. 68, n° 2, p. 105-111. [<https://doi.org/10.1292/jvms.68.105>]
- KIM, N.H., LIM, H.Y., IM, K.S., *et al.* (2013) Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. *Journal of Comparative Pathology* vol. 148, n° 4, p. 298-306. [<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.08.009>]
- KLOPFLEISCH, R., VON EULER, H., SARLI, G., *et al.* (2011) Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Veterinary Pathology* vol. 48, n° 1, p. 98-116. [<https://doi.org/10.1177/0300985810390826>]
- KORKAYA, H., LIU, S., WICHA, M.S. (2011) Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *The Journal of Clinical Investigation* vol. 121, n° 10, p. 3804-3809. [<https://doi.org/10.1172/JCI157099>]
- KUMARAGURUPARAN, R., PRATHIBA, D., NAGINI, S. (2006a) Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Research in Veterinary Science* vol. 81, n° 2, p. 218-224. [<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.08.002>]
- KUMARAGURUPARAN, R., PRATHIBA, D., NAGINI, S. (2006b) Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Research in Veterinary Science* vol. 81, n° 2, p. 218-224. [<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.08.002>]
- LANA, S.E., RUTTEMAN, G.R., WITHROW, S.J. (2007) Tumors of the Mammary Gland. In *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4th edition. St Louis, Saunders Elsevier, p. 619-636. [<https://doi.org/10.1016/B978-072160558-6.50029-0>]
- LEE, S.-Y., MEIER, R., FURUTA, S., *et al.* (2012) FAM83A confers EGFR-TKI resistance in breast cancer cells and in mice. *The Journal of Clinical Investigation* vol. 122, n° 9, p. 3211-3220. [<https://doi.org/10.1172/JCI60498>]
- LEVIN, E.R. (2003) Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Molecular Endocrinology* vol. 17, n° 3, p. 309-317. [<https://doi.org/10.1210/me.2002-0368>]
- LIEHR, J.G. (1997) Hormone-associated cancer: mechanistic similarities between human breast cancer and estrogen-induced kidney carcinogenesis in hamsters. *Environmental Health Perspectives* vol. 105, n° suppl 3, p. 565-569. [<https://doi.org/10.1289/ehp.97105s3565>]
- LIU, Q., ZHANG, C., SUN, A., *et al.* (2009) Tumor-Educated CD11bhighIaLow Regulatory Dendritic Cells Suppress T Cell Response through Arginase I. *The Journal of Immunology* vol. 182, n° 10, p. 6207-6216. [<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803926>]
- LO, Y.-H., KARLSSON, K., KUO, C.J. (2020) Applications of Organoids for Cancer Biology and Precision Medicine. *Nature Cancer* vol. 1, n° 8, p. 761-773. [<https://doi.org/10.1038/s43018-020-0102-y>]
- LOTZE, M.T. (1997) Getting to the source: dendritic cells as therapeutic reagents for the treatment of patients with cancer. *Annals of Surgery* vol. 226, n° 1, p. 1-5.
- MAGNOL, J.-P., MARCHAL, T., DELISLE, F., *et al.* (1998) Cancérologie clinique du chien. Édition T.Marchal. Saint-Pierre La Palud, France p. 217-229 et p. 317-318.
- MALINS, D.C., HOLMES, E.H., POLISSAR, N.L., *et al.* (1993) The etiology of breast cancer. Characteristic alteration in hydroxyl radical-induced DNA base lesions during oncogenesis with potential for evaluating incidence risk. *Cancer* vol. 71, n° 10, p. 3036-3043. [[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930515\)71:10<3036::aid-cncr2820711025>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930515)71:10<3036::aid-cncr2820711025>3.0.co;2-p)]
- MASUDA, H., ZHANG, D., BARTHOLOMEUSZ, C., *et al.* (2012) Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* vol. 136, n° 2, p. 331-345. [<https://doi.org/10.1007/s10549-012-2289-9>]
- MAUÉS, T., EL-JAICK, K.B., COSTA, F.B., *et al.* (2018) Common germline haplotypes and genotypes identified in BRCA2 exon 11 of dogs with mammary tumours and histopathological analyses. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 16, n° 3, p. 379-384. [<https://doi.org/10.1111/vco.12389>]
- MERLO, D. f., ROSSI, L., PELLEGRINO, C., *et al.* (2008) Cancer Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 22, n° 4, p. 976-984. [<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0133.x>]
- MILLANTA, F., CALANDRELLA, M., BARI, G., *et al.* (2005) Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science* vol. 79, n° 3, p. 225-232. [<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.02.002>]
- MILLANTA, F., SILVESTRI, G., VASELLI, C., *et al.* (2006) The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Research in Veterinary Science* vol. 81, n° 3, p. 350-357. [<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.01.007>]
- MISDORP, W. (2002) Tumors of the Mammary Gland. In *Meuteun, D.J (Ed.). Tumors in Domestic Animals*. 4th edition, Iowa State Press, p. 575-606. [<https://doi.org/10.1002/9780470376928.ch12>]

- MISDORP, W., HART, A.A. (1976) Prognostic factors in canine mammary cancer. *Journal of the National Cancer Institute* vol. 56, n° 4, p. 779-786. [<https://doi.org/10.1093/jnci/56.4.779>]
- MOE, L. (2001) Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* vol. 57, p. 439-443.
- MONTAGNE, K. (2005) Les signaux non désirés en immunohistochimie sur tissus de souris: étude comparative de systèmes de révélation application à l'étude des effets du délai de fixation sur les indices de prolifération tumorale. Thèse de médecine, Faculté de médecine de Nancy, n°25.
- MORJARIA, S. (2021) Driver mutations in oncogenesis. *International Journal of Molecular and Immunology* vol. 6, n° 2, p. 100-102. [https://doi.org/10.25259/IJMIO_26_2020]
- MOUNEYRAC, L. (2018) Création d'un index pronostique pour les chiennes et chattes après diagnostic de carcinome mammaire invasif. [<http://www.mediathèque.centrale-canine.fr/Record.htm?idlist=1&record=19123467124919416499>] (consulté le 17/02/2022).
- MOUNEYRAC, L. (2018) Création d'un index pronostique pour les chiennes et chattes après diagnostic de carcinome mammaire invasif. Thèse de médecine vétérinaire, École nationale vétérinaire de Nantes Oniris.
- MUHAMMADNEJAD, A., KEYHANI, E., MORTAZAVI, P., *et al.* (2012) Overexpression of her-2/neu in malignant mammary tumors; translation of clinicopathological features from dog to human. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* vol. 13, n° 12, p. 6415-6421. [<https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.12.6415>]
- NAGLE, P.W., PLUKKER, J.T.M., MUIJS, C.T., *et al.* (2018) Patient-derived tumor organoids for prediction of cancer treatment response. *Seminars in Cancer Biology* vol. 53, p. 258-264. [<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.06.005>]
- NEAL, J.T., LI, X., ZHU, J., *et al.* (2018) Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell* vol. 175, n° 7, p. 1972- 1988.e16. [<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.021>]
- NIELSEN, T.O., HSU, F.D., JENSEN, K., *et al.* (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research* vol. 10, n° 16, p. 5367-5374. [<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0220>]
- NIETO, A., PÉREZ-ALENZA, M.D., DEL CASTILLO, N., *et al.* (2003) BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *Journal of Comparative Pathology* vol. 128, n° 4, p. 260-268. [<https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0631>]
- NORTH, S.M., BANKS, T.A. (2009) *Small Animal Oncology: An Introduction*. Edinburg, Saunders Elsevier.
- OLIVEIRA, L.O. de, OLIVEIRA, R.T. de, LORETTI, A.P., *et al.* (2003) Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae* vol. 31, n° 2, p.105 [<https://doi.org/10.22456/1679-9216.17079>]
- OSMANAGIC-MYERS, S., DECHAT, T., FOISNER, R. (2015) Lamins at the crossroads of mechanosignaling. *Genes & Development* vol. 29, n° 3, p. 225-237. [<https://doi.org/10.1101/gad.255968.114>]
- PALA, E.E., BAYOL, U., KESKIN, E.U., *et al.* (2015) Determination of HER2 and p53 Mutations by Sequence Analysis Method and EGFR/Chromosome 7 Gene Status by Fluorescence in Situ Hybridization for the Predilection of Targeted Therapy Modalities in Immunohistochemically Triple Negative Breast Carcinomas in Turkish Population. *Pathology Oncology Research* vol. 21, n° 4, p. 1223-1227. [<https://doi.org/10.1007/s12253-015-9956-1>]
- PASTOR, N., CABALLÉ, N.C., SANTELLA, M., *et al.* (2018) Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. *Austral Journal of Veterinary Sciences* vol. 50, n° 3, p. 143-147. [<https://doi.org/10.4067/S0719-81322018000300143>]
- PEÑA, L., DE ANDRÉS, P.J., CLEMENTE, M., *et al.* (2013) Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Veterinary Pathology* vol. 50, n° 1, p. 94-105. [<https://doi.org/10.1177/0300985812447830>]
- PEÑA, L., GAMA, A., GOLDSCHMIDT, M.H., *et al.* (2014) Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* vol. 51, n° 1, p. 127-145. [<https://doi.org/10.1177/0300985813509388>]
- PEÑA, L.L., NIETO, A.I., PÉREZ-ALENZA, D., *et al.* (1998) Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* vol. 10, n° 3, p. 237-246. [<https://doi.org/10.1177/104063879801000303>]
- PEREZ ALENZA, M.D., PEÑA, L., DEL CASTILLO, N., *et al.* (2000a) Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *The Journal of Small Animal Practice* vol. 41, n° 7, p. 287-291. [<https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2000.tb03203.x>]

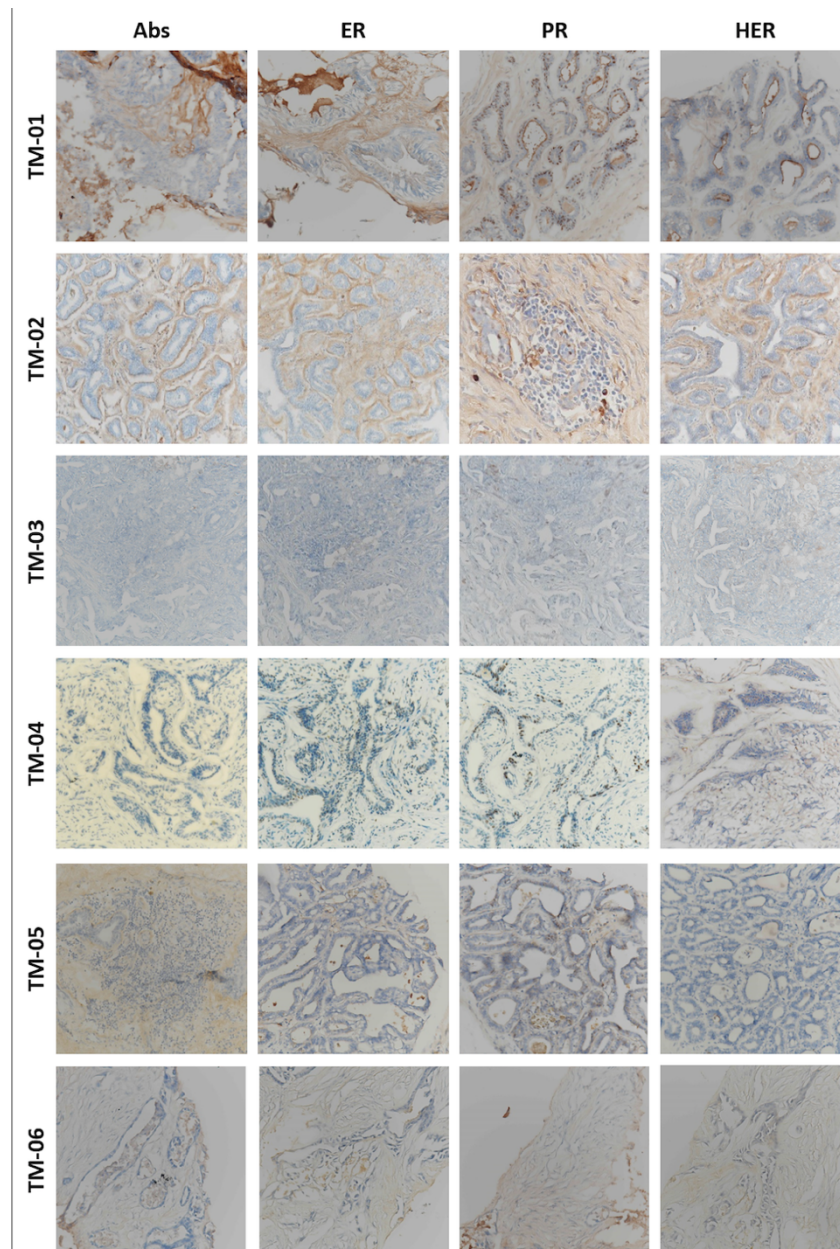
- PÉREZ ALENZA, M.D., PEÑA, L., NIETO, A.I., *et al.* (1997) Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita* vol. 33, n° 4, p. 581-585.
- PEROU, C.M., SØRLIE, T., EISEN, M.B., *et al.* (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* vol. 406, n° 6797, p. 747-752. [<https://doi.org/10.1038/35021093>]
- PETERSEN, O.W., RØNNOV-JESSEN, L., HOWLETT, A.R., *et al.* (1992) Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 89, n° 19, p. 9064. [<https://doi.org/10.1073/pnas.89.19.9064>]
- PHILIBERT, J.C., SNYDER, P.W., GLICKMAN, N., *et al.* (2003) Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 17, n° 1, p. 102-106. [[https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2003\)017<0102:iohfos>2.3.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2003)017<0102:iohfos>2.3.co;2)]
- PREZIOSI, R., SARLI, G., BENAZZI, C., *et al.* (1995) Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* vol. 113, n° 4, p. 301-313. [[https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(05\)80117-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(05)80117-3)]
- PÜCKLER, K. von (2021) Radiographie du thorax et de l'abdomen du chien et du chat: savoir réaliser et interpréter une radiographie. Puteaux, les Éditions du Point vétérinaire.
- QU, Y., HAN, B., GAO, B., *et al.* (2017) Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Mammary-like Organoids. *Stem Cell Reports* vol. 8, n° 2, p. 205-215. [<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.12.023>]
- QUEIROGA, F.L., PÉREZ-ALENZA, M.D., SILVAN, G., *et al.* (2008) Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17beta-estradiol) in canine mammary tumours. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* vol. 110, n° 1-2, p. 76-82. [<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.02.005>]
- QUEIROGA, F.L., PIRES, I., PARENTE, M., *et al.* (2011) COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. *Veterinary Journal* vol. 189, n° 1, p. 77-82. [<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.022>]
- QUEIROGA, F.L., RAPOSO, T., CARVALHO, M.I., *et al.* (2011) Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. *In Vivo* vol. 25, n° 3, p. 455-465.
- RAFFO-ROMERO, A., ABOULOUARD, S., BOUCHAERT, E., *et al.* (2023) Establishment and characterization of canine mammary tumoroids for translational research. *BMC Biology* vol. 21, n° 1, p. 23. [<https://doi.org/10.1186/s12915-023-01516-2>]
- REECE, W.O., ERICKSON, H.H., GOFF, J.P., *et al.* (2015) *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 13th edition, Ames, Wiley-Blackwell, p. 763.
- REHM, S., STANISLAUS, D.J., WILLIAMS, A.M. (2007) Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology* vol. 80, n° 3, p. 233-245. [<https://doi.org/10.1002/bdrb.20121>]
- RESSEL, L., PULEIO, R., LORIA, G.R., *et al.* (2013) HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research in Veterinary Science* vol. 94, n° 2, p. 299-305. [<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.016>]
- RESTUCCI, B., DE VICO, G., MAIOLINO, P. (2000) Evaluation of angiogenesis in canine mammary tumors by quantitative platelet endothelial cell adhesion molecule immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* vol. 37, n° 4, p. 297-301. [<https://doi.org/10.1354/vp.37-4-297>]
- RESTUCCI, B., PAPPARELLA, S., MAIOLINO, P., *et al.* (2002) Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* vol. 39, n° 4, p. 488-493. [<https://doi.org/10.1354/vp.39-4-488>]
- REZAI, A., TAVASOLI, A., BAHONAR, A., *et al.* (2009) Grading in canine mammary gland carcinoma. *Journal of Biological Sciences* vol. 9, n° 4, p. 333-338.
- RIVERA, P., MELIN, M., BIAGI, T., *et al.* (2009) Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Research* vol. 69, p. 8770-4. [<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1725>]
- ROCHFORT, H. (2008) Cancérogenèse hormonale chez la femme : des mécanismes à la prévention. *Comptes Rendus Biologies, Dossier: Nouveautés en cancérogenèse / New developments in carcinogenesis* vol. 331, n° 2, p. 104-113. [<https://doi.org/10.1016/j.crv.2006.07.009>]
- ROCHFORT, H. (1987) Do antiestrogens and antiprogestins act as hormone antagonists or receptor-targeted drugs in breast cancer? *Trends in Pharmacological Sciences* vol. 8, n° 4, p. 126-128. [[https://doi.org/10.1016/0165-6147\(87\)90180-5](https://doi.org/10.1016/0165-6147(87)90180-5)]
- ROSSI, F., SABATTINI, S., VASCELLARI, M., *et al.* (2018) The impact of toceranib, piroxicam and thalidomide with or without hypofractionated radiation therapy on clinical outcome in dogs with inflammatory

- mammary carcinoma. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 16, n° 4, p. 497-504. [<https://doi.org/10.1111/vco.12407>]
- ROSSOUW, J.E., ANDERSON, G.L., PRENTICE, R.L., *et al.* (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* vol. 288, n° 3, p. 321-333. [<https://doi.org/10.1001/jama.288.3.321>]
- RUTTEMAN, G.R., MISDORP, W., BLANKENSTEIN, M.A., *et al.* (1988) Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *British Journal of Cancer* vol. 58, n° 5, p. 594-599.
- SACHS, N., DE LIGT, J., KOPPER, O., *et al.* (2018) A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* vol. 172, n° 1-2, p. 373-386.e10. [<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.010>]
- SANTOS, A. A. F., OLIVEIRA, J.T., LOPES, C.C.C., *et al.* (2010) Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* vol. 143, n° 4, p. 268-275. [<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.04.006>]
- SANTOS, M., CORREIA-GOMES, C., MARCOS, R., *et al.* (2015) Value of the Nottingham Histological Grading Parameters and Nottingham Prognostic Index in Canine Mammary Carcinoma. *Anticancer Research* vol. 35, n° 7, p. 4219-4227.
- SANTOS, M., MARCOS, R., FAUSTINO, A.M.R. (2010) Histological study of canine mammary gland during the oestrous cycle. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 45, n° 5, p. e146-154. [<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01536.x>]
- SARLI, G., PREZIOSI, R., BENAZZI, C., *et al.* (2002) Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* vol. 14, n° 1, p. 25-34. [<https://doi.org/10.1177/104063870201400106>]
- SCHEVENEMENT, A. (2010) Choix comparatif d'une technique d'investigation par imagerie médicale des tumeurs intra-thoraciques chez le chien. Thèse de médecine vétérinaire. École nationale vétérinaire de Lyon VetAgroSup.
- SCHNEIDER, R., DORN, C.R., TAYLOR, D.O. (1969) Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute* vol. 43, n° 6, p. 1249-1261.
- SERVICE DE CANCEROLOGIE DE VETAGRO SUP (2022) Confirmer et préciser le diagnostic d'une tumeur. *In Mon Animal et son Cancer*. [<http://cancer-chien-chat.vetagro-sup.fr/index.php/confirmer-et-preciser-le-diagnostic/>] (consulté le 27/02/2022).
- SHARKEY, L.C., RADIN, M.J. (2020) *Veterinary Cytology*. Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell.
- SHERWOOD, L., KLANDORF, H., YANCEY, P.H., *et al.* (2016) *Physiologie animale*. Louvain-la-Neuve, De Boeck Supérieur.
- SILVA, I.L.D., DIAS, A.P.M., BERTAGNOLLI, A.C., *et al.* (2014) Analysis of EGFR and HER-2 expressions in ductal carcinomas in situ in canine mammary glands. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. [<https://doi.org/10.1590/1678-41626128>]
- SILVER, I.A. (1966) The anatomy of the mammary gland of the dog and cat. *The Journal of Small Animal Practice* vol. 7, n° 11, p. 689-696. [<https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1966.tb04394.x>]
- SIMIAN, M., BISSELL, M.J. (2017) Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *The Journal of Cell Biology* vol. 216, n° 1, p. 31-40. [<https://doi.org/10.1083/jcb.201610056>]
- SIMON, D., SCHOENROCK, D., NOLTE, I., *et al.* (2009) Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Veterinary Clinical Pathology* vol. 38, n° 4, p. 521-528. [<https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00150.x>]
- SLEECKX, N., VAN BRANTEGEM, L., VAN DEN EYNDEN, G., *et al.* (2014) Angiogenesis in canine mammary tumours: a morphometric and prognostic study. *Journal of Comparative Pathology* vol. 150, n° 2-3, p. 175-183. [<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.09.005>]
- SORENMO, K. (2003) Canine mammary gland tumors. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* vol. 33, n° 3, p. 573-596. [[https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(03\)00020-2](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(03)00020-2)]
- SORENMO, K.U., DURHAM, A.C., RADAELLI, E., *et al.* (2019) The estrogen effect; clinical and histopathological evidence of dichotomous influences in dogs with spontaneous mammary carcinomas. *PloS One* vol. 14, n° 10, p. e0224504. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224504>]
- SORENMO, K.U., KRISTIANSEN, V.M., COFONE, M.A., *et al.* (2009) Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 7, n° 3, p. 162-172. [<https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2009.00184.x>]

- SORENMO, K.U., RASOTTO, R., ZAPPULLI, V., *et al.* (2011) Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology* vol. 48, n° 1, p. 85-97. [<https://doi.org/10.1177/0300985810389480>]
- SORENMO, K.U., WORLEY, D., ZAPPULLI, V., *et al.* (2019) Tumors of the Mammary Gland, *In Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 6th Edition, Elsevier Saunders, p. 604-625. [<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-59496-7.00028-1>]
- SOYSAL, S.D., TZANKOV, A., MUENST, S.E. (2015) Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology* vol. 82, n° 3-4, p. 142-152. [<https://doi.org/10.1159/000430499>]
- SPINK, D.C., HAYES, C.L., YOUNG, N.R., *et al.* (1994) The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on estrogen metabolism in MCF-7 breast cancer cells: evidence for induction of a novel 17 beta-estradiol 4-hydroxylase. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* vol. 51, n° 5-6, p. 251-258. [[https://doi.org/10.1016/0960-0760\(94\)90037-x](https://doi.org/10.1016/0960-0760(94)90037-x)]
- SPOERRI, M., GUSCETTI, F., HARTNACK, S., *et al.* (2015) Endocrine control of canine mammary neoplasms: serum reproductive hormone levels and tissue expression of steroid hormone, prolactin and growth hormone receptors. *BMC Veterinary Research* vol. 11, n° 1, p. 235. [<https://doi.org/10.1186/s12917-015-0546-y>]
- SRIVASTAVA, V., HUYPKE, T.R., PHONG, K.T., *et al.* (2020) Organoid models for mammary gland dynamics and breast cancer. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 66, p. 51-58. [<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.05.003>]
- SZCZUBIAŁ, M., ŁOPUSZYNSKI, W. (2011) Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 9, n° 4, p. 296-303. [<https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00268.x>]
- TANNER, K., MORI, H., MROUE, R., *et al.* (2012) Coherent angular motion in the establishment of multicellular architecture of glandular tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 109, n° 6, p. 1973-1978. [<https://doi.org/10.1073/pnas.1119578109>]
- TAVARES, W.L.F., LAVALLE, G.E., FIGUEIREDO, M.S., *et al.* (2010) Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica* vol. 52, p. 67. [<https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-67>]
- TAVASOLY, A., GOLSHAHI, H., REZAIE, A., *et al.* (2013) Classification and grading of canine malignant mammary tumors. *Veterinary Research Forum* vol. 4, n° 1, p. 25-30.
- THUMSER-HENNER, P., NYTKO, K., ROHRER BLEY, C. (2020) Mutations of BRCA2 in canine mammary tumors and their targeting potential in clinical therapy. *BMC Veterinary Research* vol. 16. [<https://doi.org/10.1186/s12917-020-2247-4>]
- TIRIAC, H., BELLEAU, P., ENGLE, D.D., *et al.* (2018) Organoid Profiling Identifies Common Responders to Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Cancer Discovery* vol. 8, n° 9, p. 1112-1129. [<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0349>]
- TONITI, W., BURANASINSUP, S., KONGCHAROEN, A., *et al.* (2009) Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in canine mammary tumors. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* vol. 10, n° 5, p. 907-911.
- TORRES, C.G., ITURRIAGA, M.P., CRUZ, P. (2021) Hormonal Carcinogenesis in Canine Mammary Cancer: Molecular Mechanisms of Estradiol Involved in Malignant Progression. *Animals* vol. 11, n° 3, p. 608. [<https://doi.org/10.3390/ani11030608>]
- VAN GARDEREN, E., SCHALKEN, J.A. (2002) Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. *Molecular and Cellular Endocrinology* vol. 197, n° 1-2, p. 153-165. [[https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(02\)00259-9](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(02)00259-9)]
- VARALLO, G.R., GELALETI, G.B., MASCHIO-SIGNORINI, L.B., *et al.* (2019) Prognostic phenotypic classification for canine mammary tumors. *Oncology Letters* vol. 18, n° 6, p. 6545-6553. [<https://doi.org/10.3892/ol.2019.11052>]
- VASCELLARI, M., CAPELLO, K., CARMINATO, A., *et al.* (2016) Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer. *Preventive Veterinary Medicine* vol. 126, p. 183-189. [<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.02.008>]
- WALSH, A.J., COOK, R.S., SANDERS, M.E., *et al.* (2014) Quantitative optical imaging of primary tumor organoid metabolism predicts drug response in breast cancer. *Cancer Research* vol. 74, n° 18, p. 5184-5194. [<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0663>]
- WEEBER, F., OOF, S.N., DIJKSTRA, K.K., *et al.* (2017) Tumor Organoids as a Pre-clinical Cancer Model for Drug Discovery. *Cell Chemical Biology* vol. 24, n° 9, p. 1092-1100. [<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.06.012>]

- WODARZ, D., NEWELL, A.C., KOMAROVA, N.L. (2018) Passenger mutations can accelerate tumour suppressor gene inactivation in cancer evolution. *Journal of The Royal Society Interface* vol. 15, n° 143, p. 20170967. [<https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0967>]
- YAMAGAMI, T., KOBAYASHI, T., TAKAHASHI, K., *et al.* (1996) Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *The Journal of Veterinary Medical Science* vol. 58, n° 11, p. 1079-1083. [https://doi.org/10.1292/jvms.58.11_1079]
- YANG, L., LIU, B., CHEN, H., *et al.* (2020) Progress in the application of organoids to breast cancer research. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 24, n° 10, p. 5420-5427. [<https://doi.org/10.1111/jcmm.15216>]

Annexe 1 : Photographies des lames des tumeurs mammaires après marquage immunohistochimique (ER-PR-HER2) (Raffo-Romero et *al.*, 2023)



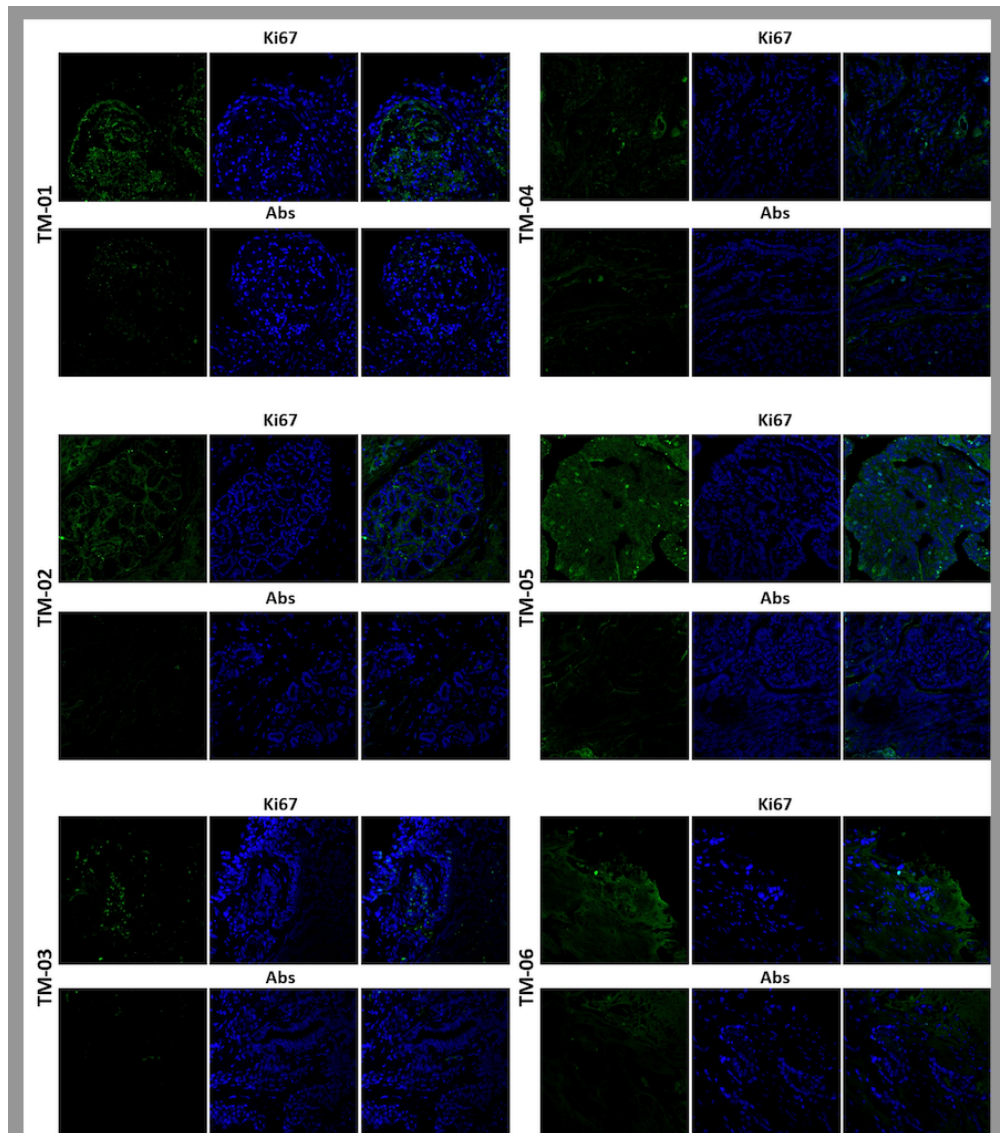
Abs : absence (contrôle)

ER : Marquage du récepteur aux œstrogènes

PR : Marquage du récepteur à la progestérone

HER : Marquage du récepteur HER2

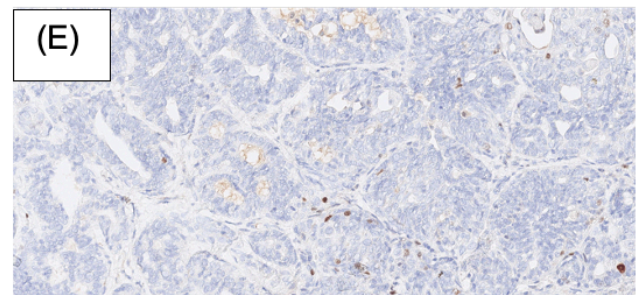
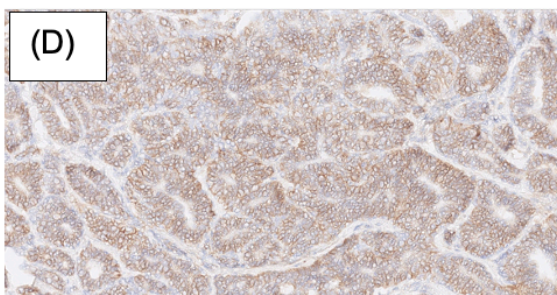
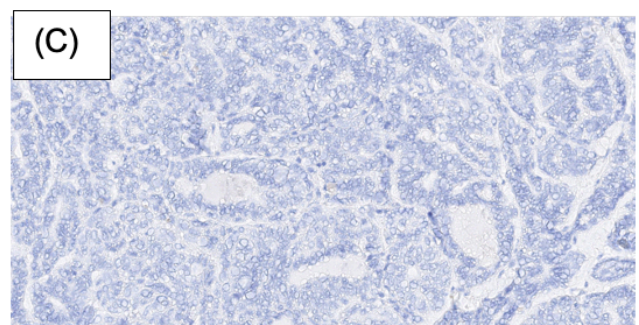
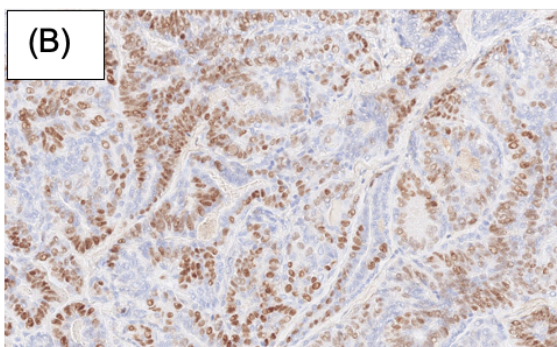
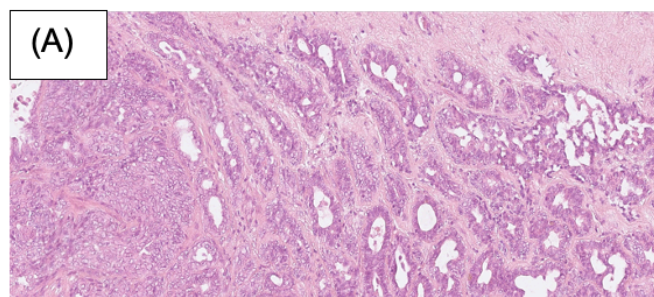
Annexe 2 : Immunofluorescence pour Ki-67 sur les lames de tumeurs mammaires (Raffo-Romero et *al.*, 2023)



Abs : absence (contrôle)

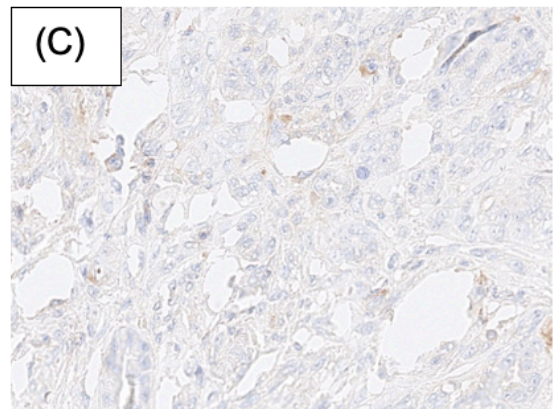
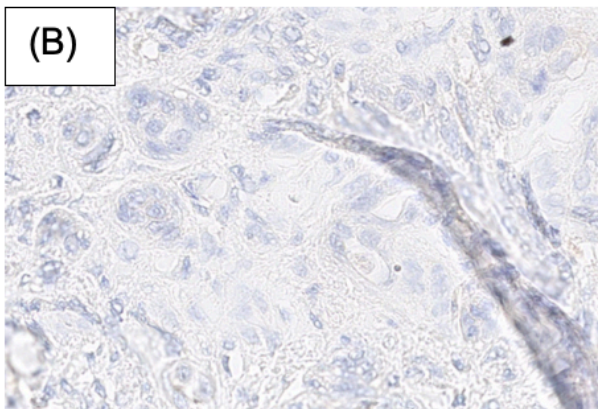
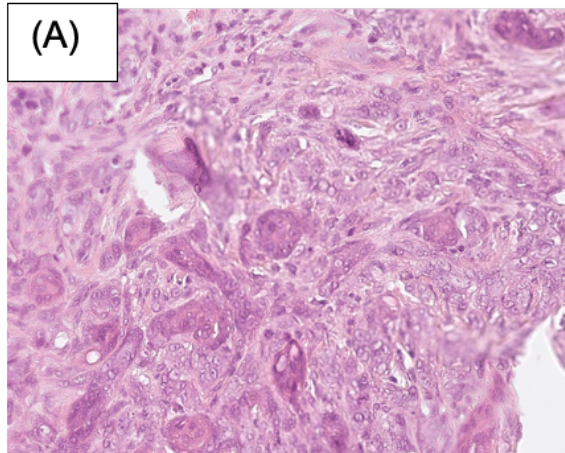
Annexe 3 : Photographies fournies par Emmanuel Bouchaert (OCR) des lames histologiques et immunohistochimiques des tumeurs mammaires envoyées au laboratoire Cerbavet pour interprétation (réalisée en mai-juin 2023)

Tumeur TM-03



- A : Lames histologiques (coloration Hémalum-éosine-safran) de la tumeur TM-03*
B : Immunohistochimie pour le récepteur à la progestérone PR (positif)
C : Immunohistochimie pour le récepteur aux œstrogènes ER (négatif)
D : Immunohistochimie pour le récepteur à HER2 (2+)
E : Immunohistochimie pour Ki67 (indice de prolifération de 3,5%).

Tumeur TM-04



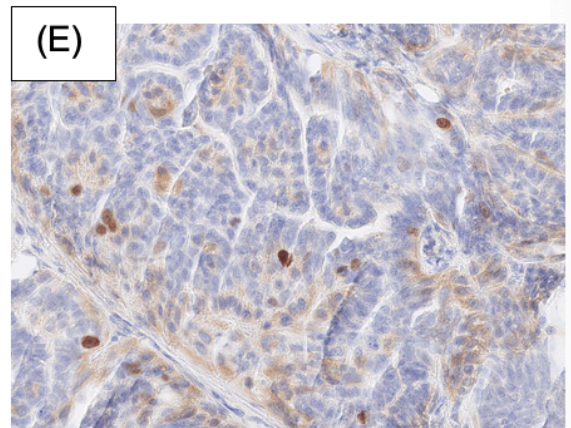
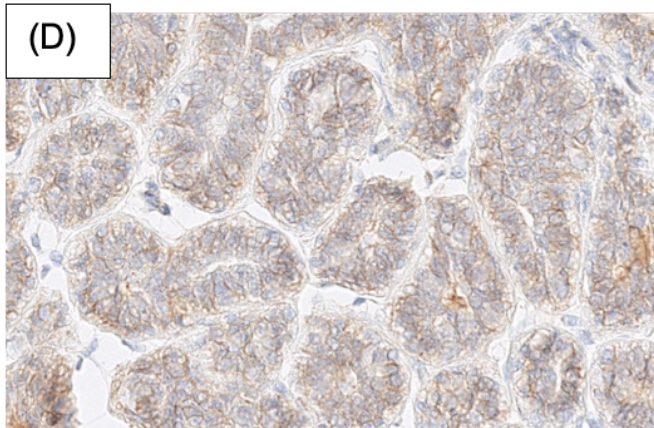
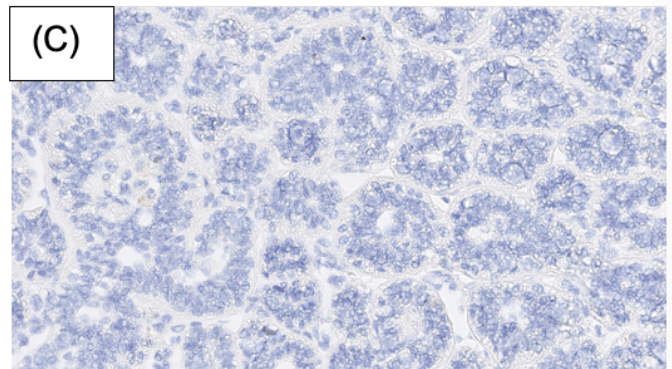
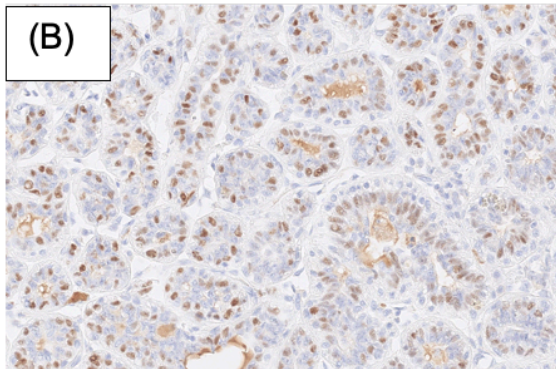
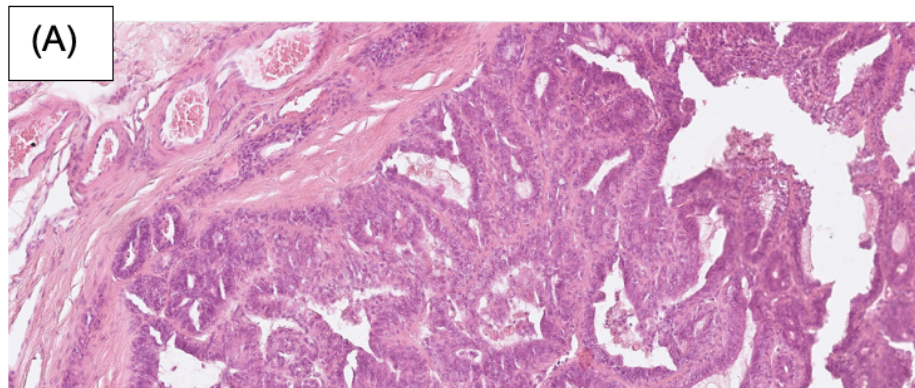
A : Lames histologiques (coloration Hémalum-éosine-safran) de la tumeur TM-04

B : Immunohistochimie pour le récepteur HER2 (négatif) ; on observe la présence d'un pli sur la photographie

C : Immunohistochimie pour le récepteur à la progestérone PR (négatif)

La zone d'intérêt (carcinome) n'est pas présente sur les lames utilisées pour le marquage Ki67 et ER. Ces dernières sont donc non interprétables.

Tumeur TM-05



A : Lames histologiques (coloration Hémalum-éosine-safran) de la tumeur TM-05

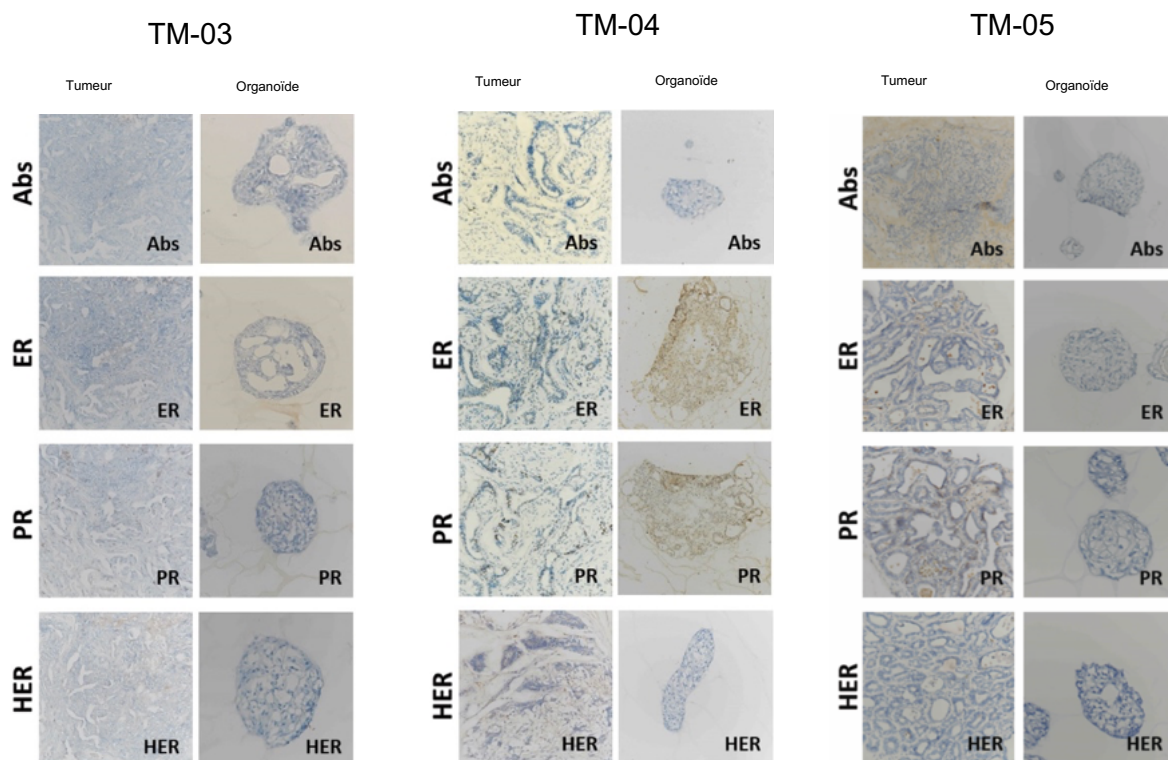
B : Immunohistochimie pour le récepteur à la progestérone PR (positif)

C : Immunohistochimie pour le récepteur aux œstrogènes ER (négatif)

D : Immunohistochimie pour le récepteur à HER2 (2+)

E : Immunohistochimie pour Ki67 (indice de prolifération de 1,9%).

Annexe 4 : Photographies des lames des tumeurs après marquage immunohistochimique (ER-PR-HER2) (Raffo-Romero et al., 2023)



Abs : absence (contrôle)

ER : Marquage du récepteur aux œstrogènes

PR : Marquage du récepteur à la progestérone

HER : Marquage du récepteur HER2

INTÉRÊT PRÉCLINIQUE DES ORGANOÏDES DANS LA MODÉLISATION DU CANCER MAMMAIRE CANIN

AUTEUR : Camilla Rondeau

RÉSUMÉ :

La culture d'organoïdes à partir de prélèvements tumoraux semble avoir un avenir prometteur en cancérologie notamment dans le cas du cancer du sein. Des similitudes ont été observées entre cancer du sein et carcinome mammaire canin. C'est donc à partir du carcinome mammaire canin que cette étude a été menée pour évaluer le potentiel intérêt préclinique (pronostique et thérapeutique) des tumoroïdes. L'objectif de cette étude était de comparer les caractéristiques morphologiques et moléculaires entre organoïdes et tumeurs d'origine. Trente-trois tumeurs mammaires canines ont pu être collectées. Parmi ces trente-trois tumeurs, trois carcinomes ont été utilisées pour une étude comprenant des analyses histopathologiques des tumeurs et de leurs organoïdes. Les lames histologiques ont d'abord montré que les organoïdes conservaient les mêmes aspects histologiques, de type carcinome. Une immunohistochimie a été réalisée pour les marqueurs ER, PR et HER2 ainsi qu'une immunofluorescence pour le marqueur de prolifération Ki-67. Les organoïdes cette fois-ci ne conservaient pas les mêmes immunophénotypes que leurs tumeurs d'origine. Ces derniers étaient « triple-négatif » ; contrairement aux tumeurs d'origine. Dans la pratique courante, le pronostic en cas de tumeur « triple-négatif » est moins bon qu'en cas de tumeur de type « luminal ». L'expression de Ki-67 est revenue très faible à l'immunofluorescence. L'hypothèse la plus probable serait que le temps de développement des organoïdes fut trop limité (quarante-deux jours) pour permettre l'expression phénotypique complète mais également que la fixation des anticorps serait plus difficile sur des lames d'organoïdes que sur les lames de tissus. Organoïdes et tumeurs montraient donc les mêmes aspects histologiques mais divergeaient en termes d'immunohistochimie. Une réflexion et différents essais pourront être entrepris pour tester l'importance de la simulation d'un micro-environnement tumoral (constitué principalement de cellules dendritiques et de lymphocytes) dans le développement des tumoroïdes.

MOTS CLÉS :

ORGANOÏDE, CARCINOME MAMMAIRE, IMMUNOPHÉNOTYPE, MODÉLISATION, CHIEN, CYTOMÉTRIE EN FLUX

JURY :

Président : Pr Alain Fontbonne

Directrice de thèse : Pr Fanny Pilot-Storck

Examinatrice : Dr Morgane Canonne-Guibert

Invité : Dr Agata Rybicka

ORGANOIDS PRECLINICAL INTEREST IN CANINE MAMMARY CANCER MODELLING

AUTHOR: Camilla RONDEAU

SUMMARY:

Organoids culture from tumor samples looks like a promising medical advance in oncology notably in the case of breast cancer. Similarities have been observed between breast cancer and canine mammary carcinoma. Therefore, this study was conducted with canine mammary carcinoma and aimed at assessing the potential preclinical (prognostic and therapeutic) use of tumoroids. The goal was to compare morphological and molecular characteristics between organoids and original tumors. Among 33 tumors, only 3 carcinomas and their organoids were used for histological analyze. First, histological slides of organoids revealed the same aspects than those from their original tumor (carcinoma type). Immunohistochemistry was performed for ER, PR and HER2 as well as immunofluorescence for Ki-67. At this point, organoids diverged from their original tumor. Organoids had triple negative immunophenotype rather tumors had luminal immunophenotype. In current practice, the prognosis of a triple negative tumor type is poorer than a luminal tumor type. The expression of Ki67 was very poor on immunohistochemistry. The principal hypothesis would be that the development time of organoids (42 days) was too limited to allow enough phenotypic expression. This could also be due to a lack of fixation of antibodies on organoid slides than tissue slides. Finally, organoids and tumors showed the same histological aspects but diverged in terms of immunohistochemistry. Reflections and various studies should be undertaken about the importance of a tumor microenvironmental simulation in tumoroid development through blood dendritic cells and lymphocytes' introduction in culture medium.

KEYWORDS:

ORGANOID, CANINE MAMMARY CANCER, IMMUNOPHENOTYPE, MODELLING, CHIEN, FLOW CYTOMETRY

JURY:

Chairperson: Pr Alain Fontbonne

Thesis Director: Pr Fanny Pilot-Storck

Reviewer: Dr Morgane Canonne-Guibert

Guest: Dr Agata Rybicka