



HAL
open science

Mise au point d'un test de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire chez le bouvier bernois par détection des mutations du gène PTPN11 dans l'ADN circulant du plasma

Alice Guyon

► **To cite this version:**

Alice Guyon. Mise au point d'un test de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire chez le bouvier bernois par détection des mutations du gène PTPN11 dans l'ADN circulant du plasma. Sciences du Vivant [q-bio]. 2023. dumas-04356230

HAL Id: dumas-04356230

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04356230>

Submitted on 20 Dec 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.

ANNÉE 2023 - Thèse n°95

MISE AU POINT D'UN TEST DE DIAGNOSTIC PRÉCOCE DU SARCOME HISTIOCYTAIRE CHEZ LE BOUVIER BERNOIS PAR DÉTECTION DES MUTATIONS DU GÈNE *PTPN11* DANS L'ADN CIRCULANT DU PLASMA

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEURE VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

le 26 octobre 2023

par

Alice, Emma GUYON

Sous la direction de
Jérôme ABADIE

- Président du jury : Monsieur Stéphane BÉZIEAU, Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes, chef du service de génétique médicale et responsable du service de génétique moléculaire.
- Membres du jury : Madame Catherine IBISCH, Maître de Conférences en Cancérologie à Oniris, assesseure.
- Monsieur Jérôme ABADIE, Maître de Conférences en Anatomie Pathologique, à Oniris, rapporteur.
- Membres invités : Monsieur Benoît HEDAN, Docteur Vétérinaire, ingénieur de recherche à l'Institut de Génétique et de Développement de Rennes, UMR 6290 CNRS, équipe Génétique du chien.

ANNÉE 2023 - Thèse n°95

MISE AU POINT D'UN TEST DE DIAGNOSTIC PRÉCOCE DU SARCOME HISTIOCYTAIRE CHEZ LE BOUVIER BERNOIS PAR DÉTECTION DES MUTATIONS DU GÈNE *PTPN11* DANS L'ADN CIRCULANT DU PLASMA

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEURE VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

le 26 octobre 2023

par

Alice, Emma GUYON

Sous la direction de
Jérôme ABADIE

Président du jury : Monsieur Stéphane BÉZIEAU, Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes, chef du service de génétique médicale et responsable du service de génétique moléculaire.

Membres du jury : Madame Catherine IBISCH, Maître de Conférences en Cancérologie à Oniris, assesseur.

Monsieur Jérôme ABADIE, Maître de Conférences en Anatomie Pathologique, à Oniris, rapporteur.

Membres invités : Monsieur Benoît HEDAN, Docteur Vétérinaire, ingénieur de recherche à l'Institut de Génétique et de Développement de Rennes, UMR 6290 CNRS, équipe Génétique du chien.

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment		
Responsable : Emmanuel JAFFRES – Adjointe : Frédérique NGUYEN		
Nutrition et Endocrinologie		
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (CERC) Martine KAMMERER (PR émérite)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Lionel MARTIGNAT (Pr) Julie HERVE (MC HDR) Grégoire MIGNOT (MC)	Solenn GAVAUD (CERC)
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Jérôme ABADIE (MC)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Pathologie générale, microbiologie et immunologie		
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (MC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC) Emmanuel JAFFRES (MC)	Mathilde MOSSER (MC) Boris MISERY (MC) Raouf TAREB (MC) Quentin PRUVOST (CEC)
PACENV = VET1	Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG)	
Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique		
Responsable : Raphaël GUATTEO – Adjoint : Jean-Michel CAPPELIER		
Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr) Lucile MARTIN (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Ségolène CALVEZ (MC HDR) Aurélien MADOUASSE (MC) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) François MEURENS (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Léa LOISEL (AERC) Kenny OBERLE (MC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Christophe CHARTIER (Pr) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (CERC) Bruno LE BIZEC (Pr) Marie-France PILET (Pr)	Fanny RENOIS-MEURENS (MC HDR) Sofia STRUBBIA (MC)

Département DSC Sciences cliniques		
Responsable : Catherine IBISCH – Adjoint : Marion FUSELLIER		
Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC) Margarida RIBEIRO DA SILVA NEUNLIST (MC)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (MC HDR)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Gwénoïla TOUZOT-JOURDE (MC) Claire DEFOURMSTRAUX (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)	Sabrina VIEU (AERC)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (MC HDR) Catherine IBISCH (MC) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) François FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (Pr) Lamia BRIAND (MC HDR)
Département GPA Génie des procédés alimentaires		
Responsable : Sébastien CURET-PLOQUIN – Adjointe : Vanessa JURY		
Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (MC HDR) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
PAC-ING	Cyril Gaillard (PCEA)	
Département MSC Management, statistiques et communication		
Responsable : Samira ROUSSELIERE – Adjointe : Véronique CARIOU		
Mathématiques, statistiques, informatique	El Mostafa QANNARI (Pr émérite) Chantal THORIN (Pr Ag) Evelyne VIGNEAU (Pr)	Véronique CARIOU (Pr) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC)	Sibylle DUCHAINE (MC) Sonia MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC) Christophe PAPINEAU (Ens. Cont.)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GUYLER (Ens. Cont.) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

Pr Ag : Professeur Agrégé, Pr : Professeur, MC : Maître de Conférence, MCC : MC contractuel,
 PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole,
 HDR : Habilité à Diriger des Recherches, CERC : Chargé d'Enseignement et de Recherche Contractuel, Ens.
 Cont. : Enseignant Contractuel

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- Nom et prénom de l'auteur : GUYON Alice
- Année de soutenance : 2023
- **Titre de la thèse** : Mise au point d'un test de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire chez le Bouvier Bernois par détection des mutations du gène *PTPN11* dans l'ADN circulant du plasma.
- **Intitulé du diplôme** : Thèse de doctorat vétérinaire
- **Université de soutenance** : Faculté de Médecine de Nantes
- **École de soutenance** : Oniris VetAgroBio Nantes : École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation
- Nombre de pages : 252

REMERCIEMENTS

À Monsieur Stéphane BEZIEAU

Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes, chef du service de génétique médicale et responsable du service de génétique moléculaire,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse, et pour votre réactivité.
Sincères remerciements et hommages respectueux.

À Monsieur Jérôme ABADIE

Maître de conférences en Anatomie Pathologique à l'école Nationale Vétérinaire de Nantes, ONIRIS,

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et dirigé sa réalisation. Pour votre aide précieuse lors de la relecture des lames, vos corrections rigoureuses apportées à mon manuscrit et votre bienveillance.

À Madame Catherine IBISCH

Maître de conférences en cancérologie à l'école Nationale Vétérinaire de Nantes, ONIRIS,

Pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse et pour avoir répondu à mes nombreuses interrogations sur les modalités de traitement du sarcome histiocytaire canin.

Sincères remerciements.

À Monsieur Benoît HEDAN

Docteur Vétérinaire, ingénieur de recherche à l'Institut de Génétique et de Développement de Rennes, UMR 6290 CNRS, équipe Génétique du chien,

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et en avoir dirigé la partie expérimentale. Pour votre encadrement lors de mes stages au laboratoire de Rennes, pour votre disponibilité, pour votre bienveillance et pour nos nombreux débats et discussions sur nos résultats, lors des trajets pour les suivis d'élevage.

Sincères remerciements.

*« Le hasard ne favorise l'invention
que pour des esprits préparés aux découvertes
par de patientes études et de persévérants efforts. »*

Louis Pasteur. Œuvres de Pasteur, Tome 7, p. 215.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIÈRES	11
TABLE DES ANNEXES	17
TABLE DES FIGURES	18
TABLE DES TABLEAUX	23
TABLE DES ABRÉVIATIONS	25
INTRODUCTION	28
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	30
Partie 1 : Présentation des biomarqueurs en oncologie vétérinaire	30
1. Définition et historique de la notion de « biomarqueur »	30
1.1. Construction historique du terme « biomarqueur »	30
1.2. Historique et précisions sur le sous-ensemble des « <i>surrogate endpoints</i> »	31
1.3. Description d'un biomarqueur	36
1.4. Étapes de validation d'un biomarqueur	37
1.4.1. Validation analytique	39
1.4.2. Validation clinique	39
1.4.3. Etablissement et confirmation de l'utilité clinique	40
1.4.4. Exemple de processus de validation appliqué à un biomarqueur de diagnostic précoce d'un cancer.....	42
1.5. Transposition au monde de la santé animale	43
2. Classification fonctionnelle des biomarqueurs	45
2.1. Risque / susceptibilité individuelle	45
2.2. Diagnostic	46
2.3. Suivi d'une maladie	50
2.4. Pronostic.....	52
2.5. Réponse à un traitement instauré	54
2.6. Prédicatif d'une réponse à un traitement spécifique	56
2.7. Innocuité.....	58
3. Classification biologique	61
3.1. Biopsies liquides	62

A) L'ADN tumoral circulant : un biomarqueur prometteur et non invasif.....	62
a) L'ADN circulant ou cfDNA	62
b) L'ADN tumoral circulant ou ctDNA	64
B) Cellules tumorales circulantes	67
C) Micro-ARN circulants et autres ARN.....	69
D) Protéines circulantes	70
E) Autres biomarqueurs circulants.....	71
3.2. Biomarqueurs tissulaires	72
3.2.1. Biomarqueurs histopathologiques ou immunohistochimiques	72
A) Biomarqueurs histologiques	72
B) Biomarqueurs immunohistochimiques	73
3.2.2. Biomarqueurs tissulaires en imagerie médicale.....	73

Partie 2 : Étude des biomarqueurs circulants appliquée au sarcome histiocyttaire chez le Bouvier Bernois76

1. Les maladies histiocytaires canines	76
1.1. Définition et origine des lignées cellulaires histiocytaires.....	76
1.1.1. Définition et description des histiocytes	76
1.1.2. Différenciation et caractérisation des lignées histiocytaires : clé pour la reconnaissance et le diagnostic de certitude des sarcomes histiocytaires.....	77
1.2. Brève nosologie des désordres histiocytaires canins	80
2. Le sarcome histiocyttaire canin	84
2.1. Epidémiologie du sarcome histiocyttaire	84
2.2. Prédilection familiale de la race Bouvier Bernois pour le sarcome histiocyttaire.....	85
2.2.1. Le Bouvier Bernois : une race à risque de développer un sarcome histiocyttaire	85
2.2.2. Une transmission oligogénique en cause dans la prédilection des Bouviers Bernois au sarcome histiocyttaire	86
2.2.3. Indice génétique utilisé pour la prédilection aux sarcomes histiocytaires chez les Bouviers Bernois	87
A) Travaux de recherche précurseurs dans l'identification des marqueurs génétiques associés au sarcome histiocyttaire chez le Bouvier Bernois.....	87
B) Le test génétique ANTAGENE permet de limiter l'incidence du sarcome histiocyttaire dans la race Bouvier Bernois	89
2.3. Description clinique du sarcome histiocyttaire	90
2.3.1. Signes et formes cliniques.....	90
2.3.2. Méthodes de diagnostic utilisées.....	92
A) Diagnostic lors de sarcome histiocyttaire clinique	92
B) Diagnostic précoce	92

2.3.3.	Données pronostiques générales	93
2.3.4.	Traitements disponibles et pronostics associés	94
A)	Thérapies locales.....	94
a)	Chirurgie	94
b)	Radiothérapie	94
B)	Thérapies systémiques	95
a)	Chimiothérapie.....	95
b)	Autres traitements systémiques	98
2.4.	Oncologie comparée avec l'homme : le Bouviers Bernois comme modèle d'étude	99
3.	Le gène <i>PTPN11</i> , principal gène muté dans le sarcome histiocytaire.....	104
3.1.	Gène <i>PTPN11</i> : structure et localisation	104
3.2.	Le gène <i>PTPN11</i> code pour la protéine SHP-2.....	105
3.2.1.	La protéine SHP-2 appartient à la famille des PTPs (Protéines Tyrosine Phosphatases).	105
3.2.2.	Structure de la protéine SHP-2.....	105
3.2.3.	Régulation intramoléculaire de la protéine SHP-2	106
3.2.4.	Rôle de la protéine SHP-2 dans les voies de signalisation intracellulaire	108
A)	Présentation de la voie MAP-Kinase	108
B)	Rôle de SHP-2 dans la voie MAP-Kinase	111
a)	Ligands ou substrats de la protéine SHP-2	111
b)	Fonctionnement de la signalisation en amont des MAP-Kinases, sans la participation de SHP-2.....	113
c)	Rôles de SHP-2 dans la signalisation, en amont des MAP-Kinases.....	114
3.2.5.	Autres rôles de la protéine SHP-2, hors voies de signalisation cellulaire.....	116
3.3.	Mutations du gène <i>PTPN11</i> et conséquences moléculaires et biologiques	118
3.3.1.	Les mutations de <i>PTPN11</i> chez l'homme.....	118
A)	Des mutations de <i>PTPN11</i> sont impliqués dans des désordres myéloprolifératifs et développementaux humains.....	118
a)	Le syndrome de Noonan :	119
b)	Le syndrome LEOPARD :.....	122
c)	Désordres myéloprolifératifs :	123
d)	Tumeurs solides	126
B)	Les mutations de <i>PTPN11</i> dans le sarcome histiocytaire humain	129
3.3.2.	Choix du gène <i>PTPN11</i> pour la mise au point d'un test de diagnostic du sarcome histiocytaire chez les Bouviers Bernois	130

A) Les différentes mutations impliquées dans le sarcome histiocytaire canin : rôle majeur du gène <i>PTPN11</i>	130
B) Les mutations de <i>PTPN11</i> sont prédominantes chez les Bouviers Bernois, en comparaison des autres races	131
C) Les mutations de <i>PTPN11</i> seraient spécifiques de la forme disséminée du sarcome histiocytaire.....	131
D) Les mutations du gène <i>PTPN11</i> seraient spécifiques du sarcome histiocytaire disséminé des Bouviers Bernois	132
3.4. La mutation du gène <i>PTPN11</i> se retrouve dans l'ADN circulant du plasma de chiens atteints de sarcome histiocytaire.....	132
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE : MISE AU POINT D'UN BIOMARQUEUR DE DIAGNOSTIC DU SARCOME HISTIOCYTAIRE CHEZ LE BOUVIER BERNOIS.....	137
1. Contexte et objectifs de l'étude : pertinence d'un test de détection des mutations du gène <i>PTPN11</i> comme biomarqueurs de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire chez le Bouvier Bernois	137
2. Matériels et méthodes.....	139
2.1. Origine des échantillons	139
2.1.1. Cohorte de chiens sélectionnés.....	139
2.1.2. Échantillons plasmatiques et tumoraux	139
2.1.3. Confirmation des diagnostics de sarcome histiocytaire par analyse histopathologique	140
2.2. Critères d'inclusion.....	144
2.2.1. Choix de la cohorte de Bouviers Bernois	144
2.2.2. Critères d'exclusion.....	145
2.3. Caractéristiques de la cohorte	145
2.4. Méthodes expérimentales : manipulations réalisées au sein du laboratoire de l'IGDR	146
2.4.1. Extraction de l'ADN	146
2.4.1.1. Extraction de l'ADN des tissus tumoraux.....	146
2.4.1.2. Extraction de l'ADN du plasma.....	148
2.4.1.3. Extraction de l'ADN du sang total ou du sang déplété en plasma.....	150
2.4.2. Amplification par ddPCR.....	152
2.4.2.1. Principe de la PCR	152
2.4.2.2. Choix de la méthode de ddPCR pour la détection des mutations du gène <i>PTPN11</i> pour notre étude	153
2.4.3. Autre méthode possible pour la détection des mutations du gène <i>PTPN11</i> : le séquençage de Sanger.....	156
2.4.4. Rédaction d'un questionnaire à destination des propriétaires de Bouviers Bernois, afin d'évaluer leur intérêt potentiel pour le test de diagnostic précoce en étude.....	159

3.	Résultats de l'étude expérimentale.....	160
3.1.	Caractéristiques descriptives de notre cohorte	160
3.2.	Analyse des résultats pour les individus décédés et affectés d'un sarcome histiocytaire confirmé par histopathologie	168
3.2.1.	Résultats de ddPCR sur les échantillons tumoraux de sarcome histiocytaire	168
A)	Répartition des mutations de <i>PTPN11</i> dans les cas mutés pour la tumeur.....	168
B)	Étude épidémio-clinique des individus atteints de sarcome histiocytaire.....	170
C)	Variabilité du taux de mutation tumorale selon les prélèvements analysés.....	171
D)	Illustrations graphiques des résultats de ddPCR des échantillons tumoraux.....	172
3.2.2.	Résultats de ddPCR sur les échantillons plasmatiques des individus affectés par un sarcome histiocytaire	175
A)	Illustration par individu des résultats de ddPCR sur les échantillons plasmatiques....	175
B)	Cas particulier du chien 19963 : un sarcome histiocytaire hémophagocytaire foudroyant.....	178
C)	Caractéristiques de performance de notre test de diagnostic du sarcome histiocytaire par détection des mutations de <i>PTPN11</i> dans l'ADN tumoral circulant, au sein de l'effectif des sept individus concernés	181
3.2.3.	Estimation de la précocité du diagnostic du sarcome histiocytaire par détection des mutations du gène <i>PTPN11</i> dans l'ADN circulant du plasma	182
3.3.	Individus présentant une mutation de <i>PTPN11</i> dans l'ADN circulant du plasma, sans diagnostic de certitude de sarcome histiocytaire.....	186
3.3.1.	Un individu en vie présentant une mutation de <i>PTPN11</i> dans l'ADN circulant du plasma, sans aucun signe clinique.....	186
3.3.2.	Un individu ayant présenté une mutation de <i>PTPN11</i> dans l'ADN circulant du plasma, mais décédé sans réalisation d'autopsie	188
3.3.3.	Un individu ayant présenté une mutation de <i>PTPN11</i> dans l'ADN des cellules blanches, mais étant décédé d'un lymphome ganglionnaire B	189
3.4.	Exploitation des réponses au questionnaire évaluant l'intérêt du test auprès des propriétaires de Bouviers Bernois	192
4.	Discussion	199
4.1.	Discussion sur les méthodes utilisées	199
4.1.1.	L'impact de l'étape d'extraction de l'ADN circulant dans le plasma sur la sensibilité de la ddPCR	199
4.1.2.	Augmenter la sensibilité de la détection du sarcome histiocytaire en recherchant d'autres mutations, sans en diminuer la spécificité.....	202
4.2.	Discussion sur les résultats	203
4.2.1.	Localisation préférentielle des sarcomes histiocytaires de notre cohorte aux poumons....	203

4.2.2.	Variabilité de la quantité d'ADN tumoral circulant (ADNtc).....	204
4.2.3.	Perspectives de thérapie ciblée.....	205
CONCLUSION	208
BIBLIOGRAPHIE	210
ANNEXES	224

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Biomarqueurs tissulaires et liquides des tumeurs des glandes mammaires. D'après Kazsak <i>et al.</i> , 2022. [36].....	224
Annexe 2 : Biomarqueurs tissulaires utilisés pour les ostéosarcomes canins localisés aux membres. D'après Luu <i>et al.</i> , 2023. [66].....	225
Annexe 3 : Comparaison des signes cliniques chez des Flat-Coated Retriever et chez des Bouviers Bernois atteints de sarcome histiocytaire. D'après Erich <i>et al.</i> , 2022. [129]	226
Annexe 4 : Résultats des analyses sanguines selon les races (Flat-Coated Retrievers (FCR) ou Bouviers Bernois (BMD : <i>Bernese Mountain Dogs</i>)) et selon le type de sarcome histiocytaire (localisé (LHS : <i>Localized Histiocytic Sarcoma</i>) ou disséminé (DHS : <i>Disseminated Histiocytic Sarcoma</i>)). D'après Erich <i>et al.</i> , 2022. [129] – PCV : <i>Packed Cell Volume (hématocrite)</i>	226
Annexe 5 : Code international des acides aminés. D'après l'ENS de Lyon. [250].....	227
Annexe 6 : Mutations génomiques identifiées par séquençage de l'exome entier et confirmées par séquençage de Sanger, chez cinq chiens atteints de sarcome histiocytaire. D'après Asada <i>et al.</i> , 2023. [9]	228
Annexe 7 : Protocole joint au kit de prélèvement sanguin avec un questionnaire clinique, à destination des vétérinaires traitants, dans le cadre de l'étude génétique sur le sarcome histiocytaire menée par l'Équipe « Génétique du Chien de l'IGDR (UMR 6290 CNRS-UR1).	229
Annexe 8 : Protocole d'extraction d'ADN avec le kit « NucleoSpin® Tissue, Mini kit for DNA from cells and tissue » du laboratoire MACHEREY-NAGEL. [237].....	230
Annexe 9 : Protocole d'extraction d'ADN avec le kit « NucleoSnap® cfDNA kit for cell-free DNA plasma » du laboratoire MACHEREY-NAGEL. [239].....	232
Annexe 10 : Questionnaire à destination des propriétaires de Bouviers Bernois pour estimer leur intérêt vis-à-vis du test de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire chez leur(s) chien(s). Réalisation personnelle, Google Forms.....	235
Annexe 11 : Première version du résumé qui a été soumis pour le congrès mondial de cancérologie vétérinaire (WVCC : <i>World Veterinary Cancer Conference</i>) à Tokyo en mars 2024. Rédaction par Benoit Hédan, Jérôme Abadie.....	240

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Adaptation du modèle conceptuel des relations entre biomarqueurs, aboutissements de substitution, et le processus d'évaluation des interventions thérapeutiques. D'après <i>Biomarkers Definitions Working Group</i> , 2001. [3].....	32
Figure 2 : Adaptation de l'illustration des raisons de l'échec des <i>surrogate endpoints</i> . D'après Califf <i>et al.</i> , 2018. [7].....	34
Figure 3: Etapes de la chaîne de valeurs d'un biomarqueur. D'après BMK Tools – Biomarqueurs, 2023. [9].....	37
Figure 4 : Adaptation du schéma d'interdépendance entre les différentes étapes d'évaluation d'un biomarqueur. D'après <i>Institute of Medicine (US) Committee on Qualification of Biomarkers and Surrogate Endpoints in Chronic Disease</i> , 2010. [8].....	38
Figure 5 : Schéma permettant d'illustrer la distinction entre validation analytique et validation clinique d'un biomarqueur (réalisation personnelle).....	40
Figure 6 : Adaptation du schéma d'approche en cinq phases du développement et de l'évaluation des biomarqueurs de diagnostic précoce d'un cancer. D'après Srivastava <i>et al.</i> , 2020.....	42
Figure 7 : Effets d'une intervention thérapeutique sur les biomarqueurs et les résultats cliniques dans les essais cliniques. D'après <i>Biomarkers Definitions Working Group</i> , 2001. [3].....	44
Figure 8 : Schéma de la technique de résonance des plasmons de surface : détection optique en temps réel et sans marqueur, applicable au cancer mammaire chez le chien. D'après BRUCKER. [33]	49
Figure 9 : Illustration de l'inhibition de la PARP, piégeant la molécule PARP et entraînant la mort de la cellule. D'après Gil Da Costa, 2015.	58
Figure 10 : Les sept catégories fonctionnelles de biomarqueurs et leur utilité en santé (réalisation personnelle).....	60
Figure 11 : Schéma simplifié de la circulation de l'ADN tumoral. D'après Hédan <i>et al.</i> , 2022. [83]...64	64
Figure 12 : Altérations génétiques détectables dans l'ADN tumoral circulant. D'après Diaz <i>et al.</i> , 2014.	65
Figure 13 : Analyse de biomarqueurs pharmacodynamiques sur des biopsies de tumeurs humaines, basée sur le logiciel MetaMorph. D'après Schinde <i>et al.</i> , 2014.	73
Figure 14 : (a) Une femme atteinte d'un cancer du col de l'utérus présentait une tumeur primaire volumineuse au départ, mais (b) a présenté une réponse complète et une reconstitution du col de l'utérus à la suite d'un traitement par chimio-radiothérapie. D'après O'Connor <i>et al.</i> , 2017.	74
Figure 15 : Comparaison des avantages de la biopsie liquide et de la biopsie tissulaire en oncologie vétérinaire (réalisation personnelle).	74
Figure 16 : Résumé des différentes classifications des biomarqueurs en cancérologie ; les écritures sur fond blanc sont l'objet de ce travail de thèse : une mutation de l'ADN tumoral, détectée dans le sérum pour un diagnostic précoce d'un cancer (réalisation personnelle).....	75
Figure 17 : Histiocyte large et rond avec aspect vacuolaire typique. D'après Fulmer <i>et al.</i> , 2007.	77
Figure 18 : Facteurs de croissance et cytokines impliqués dans la différenciation des macrophages et des cellules dendritiques. D'après Gardiner, 2019.	78
Figure 19 : Immunophénotype des lignées cellulaires macrophagiques et dendritiques : molécules de surface cellulaire utilisées dans l'identification des lignées histiocytaires. D'après Gardiner, 2019.	79
Figure 20 : Caractéristiques histopathologiques et immunohistochimiques du sarcome histiocytaire. D'après Abadie <i>et al.</i> , 2009.	80

Figure 21 : Photographies d'un sarcome histiocytaire localisé sur la rate (a) et sur les poumons (b). D'après Hédan <i>et al.</i> , 2015.	82
Figure 22 : Pedigrees de Bouviers Bernois mettant en évidence la transmission familiale du sarcome histiocytaire et d'autres cancers. D'après Hédan <i>et al.</i> , 2015.	87
Figure 23 : Analyse pangénomique (GWAS) du sarcome histiocytaire dans deux populations de Bouviers Bernois identifiant une association sur le locus CFA11. D'après Shearin <i>et al.</i> , 2012.	88
Figure 24 : Exemples d'atteintes cliniques par les histiocytoses humaines. D'après Emile <i>et al.</i> , 2016.	100
Figure 25 : Le sarcome histiocytaire canin : prédispositions raciales, clinique, diagnostic, traitements et oncologie comparée avec l'homme. Réalisation personnelle.	103
Figure 26 : Organisation du gène <i>PTPN11</i> humain et structure de la protéine SHP-2 associée. D'après Tartaglia <i>et al.</i> , 2001.	104
Figure 27 : Organisation structurelle des domaines de la protéine SHP-2 humaine. D'après Matozaki <i>et al.</i> , 2009.	106
Figure 28 : Représentation de la protéine SHP-2. D'après Marasco <i>et al.</i> , 2023.	107
Figure 29 : Diagramme en ruban de la structure cristalline de la protéine SHP-2 humaine à gauche. L'encart à droite représente la zone encerclée en jaune sur le diagramme de gauche D'après Matozaki <i>et al.</i> , 2009.	107
Figure 30 : Modèle d'action de la protéine RAS. D'après Newkirk <i>et al.</i> , 2017.	109
Figure 31 : Cascade de kinases transmettant les signaux en aval de la protéine Ras activée, jusqu'aux MAP kinases. D'après Lodish <i>et al.</i> , 2008.	110
Figure 32 : SHP-2 dans les voies de signalisation des récepteurs de cytokines. D'après Niogret <i>et al.</i> , 2019.	113
Figure 33 : Activation de Ras suite à la liaison du ligand aux Récepteurs Tyrosine Kinases (RTK). D'après Lodish <i>et al.</i> , 2008.	114
Figure 34 : Activation de la voie MAP-Kinase par la protéine SHP-2. D'après Niogret <i>et al.</i> , 2019.	116
Figure 35 : Caractéristiques faciales typiques (face avant et latérale) chez des patients atteints du syndrome de Noonan et présentant une mutation du gène <i>PTPN11</i> . D'après Athota <i>et al.</i> , 2020.	120
Figure 36 : Localisation des variants pathogéniques du syndrome de Noonan sur le gène <i>PTPN11</i> humain, avec ses exons et les domaines fonctionnels de la protéine SHP-2. D'après Athota <i>et al.</i> , 2020.	121
Figure 37 : Structure de la protéine <i>PTPN11</i> et localisation des deux mutations faux-sens signalées chez les patients atteints du syndrome LEOPARD. D'après Digilio <i>et al.</i> , 2002.	122
Figure 38 : Structure cristalline de Shp2 (<i>Protein Data Bank 2SHP</i>), présentée sous forme de diagramme en ruban, et montrant les mutations associées au syndrome LEOPARD. D'après Kontaridis <i>et al.</i> , 2006.	123
Figure 39 : Schéma illustrant les rotations des domaines dans le variant muté SHP-2 E76K. D'après LaRochelle <i>et al.</i> , 2018.	125
Figure 40 : Distribution des mutations <i>PTPN11</i> connues (panneau du haut) et nouvellement découvertes (panneau du bas) dans le cancer humain. D'après Bentires-Alj <i>et al.</i> , 2004.	127
Figure 41 : Rôles de SHP-2 non mutée dans les cancers humains. D'après Matozaki <i>et al.</i> , 2009. ...	128
Figure 42 : Exemple de données issues du test multiplex de ddPCR pour la quantification absolue des mutations de <i>PTPN11</i> (<i>PTPN11-1</i> pour la variante E76K et <i>PTPN11-2</i> pour la variante G503V) dans le sarcome histiocytaire canin. D'après Prouteau <i>et al.</i> , 2021.	133
Figure 43 : Schéma de la signalisation et des fonctions de la protéine SHP-2, codée par le gène <i>PTPN11</i> . D'après Zhang <i>et al.</i> , 2015.	134

Figure 44 : Schéma en rubans de la protéine SHP-2 auto-inhibée ; les sites des mutations oncogéniques sont représentés en rouge. D’après LaRoche <i>et al.</i> , 2018.....	135
Figure 45 : Mutations dans la protéine SHP-2 associées à des maladies humaines. D’après Kontaridis <i>et al.</i> , 2006.	135
Figure 46 : Schéma du produit du gène <i>PTPN11</i> avec les domaines fonctionnels correspondants de la protéine SHP-2, indiquant les emplacements des mutations E76K et G503V, avec les changements d'acides aminés prédits. D’après Takada <i>et al.</i> , 2019.....	135
Figure 47 : Vue au microscope optique au grossissement 20 (à gauche) et 40 (à droite), d’une coupe histologique colorée avec la coloration HES, d’un infiltrat cellulaire hépatique de sarcome histiocytaire disséminé chez le chien 20272. Photographies : Jérôme Abadie, Oniris.	141
Figure 48 : Vue au microscope optique au grossissement 4 (à gauche) et 20 (à droite), d’une coupe histologique colorée avec la coloration HES, d’un infiltrat cellulaire splénique de sarcome histiocytaire disséminé chez le chien 19863. Photographies : Jérôme Abadie, Oniris.	141
Figure 49 : Vue au microscope optique au grossissement x20 (à gauche) et x40 (à droite), d’une coupe histologique colorée avec la coloration HES, d’un infiltrat cellulaire rénal de sarcome histiocytaire disséminé chez le chien 19863. Photographies : Jérôme Abadie, Oniris.	142
Figure 50 : Vue au microscope optique d’une coupe histologique colorée avec la coloration HES, d’un infiltrat cellulaire splénique de sarcome histiocytaire hémophagocytaire chez le chien 19963. Photographies : Marie Cuvelier, Oniris.	143
Figure 51 : Vue au microscope optique d’une coupe histologique avec la coloration HES (à gauche) et avec immunomarquage Iba-1 (à droite), d’un infiltrat cellulaire de sarcome histiocytaire hémophagocytaire dans un nœud lymphatique chez le chien 19963. Photographies : Marie Cuvelier, Oniris.	143
Figure 52 : Photographie du système d’aspiration utilisé pour l’extraction d’ADN des échantillons plasmatiques de notre cohorte de Bouviers Bernois. Photographie personnelle réalisée au laboratoire de l’Équipe « Génétique du Chien » de l’IGDR.....	149
Figure 53 : Etapes d’un cycle d’amplification de PCR (à gauche [238]), pouvant se réaliser dans un thermocycleur Biorad (à droite, photographie personnelle).	152
Figure 54 : Instruments de la société Biorad nécessaires pour la réalisation de la ddPCR. Photographies personnelles.	154
Figure 55 : Principe général de la ddPCR (droplet digital PCR) : trois étapes. D’après Audebert, 2014. [242].....	155
Figure 56 : Schéma d’une électrophorèse dans des capillaires lors d’un séquençage par la technique de Sanger. [238].....	157
Figure 57 : Séquenceur de Sanger de l’IGDR : fermé à gauche, ouvert à droite. Photographies personnelles.	158
Figure 58 : Exemple d’électrophorégramme obtenu sur logiciel après séquençage d’ADN par la technique de Sanger. Photographie personnelle.	158
Figure 59 : Radiographies thoraciques (de profil à gauche, de face à droite) du chien 19957 de la vallée de l’Hyrôme, réalisées le 27/12/2022 suite à une suspicion de lymphome intestinale, à la clinique vétérinaire Maupassant à VIHIERS.....	167
Figure 60 : Répartition des mutations du gène <i>PTPN11</i> dans les échantillons tumoraux de notre population de Bouviers Bernois atteints de sarcome histiocytaire (réalisation personnelle).	168
Figure 61 : Etude épidémio-clinique chez les chiens de notre cohorte atteints de sarcome histiocytaire : localisations des tumeurs avérées selon les organes (réalisation personnelle).	170

Figure 62 : Illustration graphique de la variabilité intratumorale des ratios de mutation E76K, selon le prélèvement réalisé dans l'organe : cas de la tumeur de l'épaule de l'individu 18735 (réalisation personnelle).....	171
Figure 63 : Graphiques des résultats de ddPCR pour deux individus atteints de sarcome histiocytaire. <i>En haut : résultat de l'analyse du prélèvement de rate du chien 19963, muté G503V ; en bas : résultat de l'analyse des poumons du chien 11962, muté E76K.</i>	173
Figure 64 : Graphiques des résultats de ddPCR pour deux individus atteints de sarcome histiocytaire. <i>En haut : résultat de l'analyse du prélèvement de foie du chien 19965, muté E76K ; en bas : résultat de l'analyse des nœuds lymphatiques du chien 19863, non muté.</i>	174
Figure 65 : Courbes de tendance polynomiales représentant l'évolution du ratio d'ADN tumoral circulant muté en fonction du temps, chez les six individus atteints d'un sarcome histiocytaire muté pour <i>PTPN11</i> (réalisation personnelle).....	177
Figure 66 : Graphiques des résultats de ddPCR sur échantillons plasmatiques pour deux individus atteints de sarcome histiocytaire.	178
Figure 67 : Clichés de la rate (à gauche) et de nœuds lymphatiques mésentériques (à droite) lors de l'autopsie du cas 19963 atteint de SH hémophagocytaire (réalisation : Marie Cuvelier, Oniris).	179
Figure 68 : Clichés au microscope optique d'une coupe histologique avec la coloration HES, d'infiltrats cellulaires pulmonaires de sarcome histiocytaire hémophagocytaire chez le chien 19963 (réalisation : Marie Cuvelier, LabOniris).	180
Figure 69 : Clichés au microscope optique d'une coupe histologique avec la coloration HES (à gauche) et avec immunomarquage Iba-1 (à droite), d'infiltrats de sarcome histiocytaire hémophagocytaire dans des vaisseaux lymphatique chez le chien 19963 (réalisation : Marie Cuvelier, LabOniris).	180
Figure 70 : Radiographies thoraciques (de profil à gauche, de face à droite) du chien 11962 de la Vallée de l'Hyrôme, réalisées le 21/07/2023 suite à une toux persistante, à la clinique vétérinaire Maupassant à VIHIERS.....	183
Figure 71 : Courbe de tendance polynomiale représentant l'évolution du ratio d'ADN tumoral circulant muté en fonction du temps, chez l'individu 19856, en vie et sans signe clinique (réalisation personnelle).....	187
Figure 72 : Graphique de ddPCR sur l'échantillon plasmatique du 31/01/2023 (élution 2) de l'individu 19856 (en vie et sans signe clinique) montrant une gouttelette positive pour la mutation E76K.	187
Figure 73 : Graphique de ddPCR sur l'échantillon plasmatique du 07/06/2022 (élution 2) de l'individu 19857 (décédé sans autopsie) montrant deux gouttelettes positives pour la mutation E76K.....	188
Figure 74 : Photographie du Bouvier Bernois 19959 (source : Mme Alexandra Vincent).	189
Figure 75 : Vue au microscope optique au grossissement 20 d'une coupe histologique colorée avec la coloration de Giemsa, de lymphocytes tumoraux caractéristiques d'un lymphome malin (cellules rondes, petites et nucléolées), issus d'une cytoponction ganglionnaire du chien 19959 (photographie : Jérôme Abadie, Oniris).	190
Figure 76 : Caractéristiques phénotypiques des cellules cancéreuses : les caractéristiques des cellules tumorales acquises au cours de leurs mutations. D'après Hanahan et Weinberg, Cell, 2011.....	191
Figure 77 : Répartition des participants selon leur tranche d'âge. Google Forms.	192
Figure 78 : Répartition des participants selon leur catégorie socio-professionnelle (réalisation personnelle).....	193
Figure 79 : Répartition des propriétaires de Bouviers Bernois : selon s'ils savent si un de leurs Bouviers Bernois est décédé d'un cancer (à gauche) ; et si oui, répartition des cancers selon leur nature (à droite) (réalisation personnelle).....	194

Figure 80 : Répartition des réponses de propriétaires de Bouviers Bernois, selon l'âge à partir duquel ils seraient prêts à effectuer le test de diagnostic précoce sur leur chien. Google Forms.	194
Figure 81 : Répartition des propriétaires de Bouviers Bernois selon le coût qu'ils seraient prêt à investir dans le test de diagnostic précoce, en fonction de leur catégorie socio-professionnelle (réalisation personnelle).....	195
Figure 82 : Répartition des propriétaires de Bouviers Bernois selon la fréquence à laquelle ils réaliseraient le test si son coût était de 50 euros (réalisation personnelle).	196
Figure 83 : Répartition des propriétaires de Bouviers Bernois selon les examens complémentaires qu'ils seraient prêts à réaliser si le test de diagnostic précoce est positif (réalisation personnelle).	196
Figure 84 : Solutions thérapeutiques que les propriétaires de Bouviers Bernois sont prêts à engager si les examens complémentaires révèlent une tumeur (réalisation personnelle).	197
Figure 85 : Comparaison de la fréquence souhaitée de réalisation du test de diagnostic précoce si le premier test est négatif (et a un coût de 50 euros) (en bleu) ; et de la fréquence de réalisation d'examen complémentaires si le test de diagnostic précoce s'avère positif (réalisation personnelle).....	198
Figure 86 : Illustration de la différence de résultats obtenus selon les éluions, pour deux prélèvements plasmatiques à des dates différentes chez la chienne 19963 (réalisation personnelle).....	200
Figure 87 : Graphiques de ddPCR des éluions 1 (en haut) et 2 (en bas) de l'échantillon plasmatique du 31/01/2023 de la chienne 19963 (réalisation personnelle).	201
Figure 88 : Structure schématique de la protéine SHP-2, stratégies thérapeutiques ciblées contre le cancer et petites molécules inhibitrices les plus récentes de SHP-2. D'après Frankson <i>et al.</i> , 2017.	206

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Exemple de description d'un biomarqueur, appliqué aux mutations du gène <i>PTPN11</i> , utilisées comme biomarqueur de diagnostic précoce de la forme disséminée du sarcome histiocytaire chez les Bouviers Bernois. [6], [9].....	37
Tableau II : Comparaison des résultats d'une méthode de référence pour une affection donnée, avec les résultats d'un test diagnostique en cours d'évaluation pour sa performance clinique. D'après PIP-CCRA (<i>Patient Involvement in Cancer Research Program - Canadian Cancer Research Alliance</i>), 2019. [4]	47
Tableau III : Comparaison des avantages et inconvénients de l'analyse de l'ADN tumoral circulant (ADNct) par rapport aux cellules tumorales circulantes (CTCs) (réalisation personnelle).....	68
Tableau IV : Stade clinique des carcinomes mammaires canins. D'après Nguyen, 2021.....	72
Tableau V : Explications des notes attribuées suite au calcul de l'indice génétique pour le sarcome histiocytaire chez un Bouvier Bernois. D'après ANTAGENE.	89
Tableau VI : Premières mutations du gène <i>PTPN11</i> , découvertes en 2001, parmi des cas familiaux et sporadiques affectés par le syndrome de Noonan. D'après Tartaglia <i>et al.</i> , 2001. [179].....	120
Tableau VII : Mutations de <i>PTPN11</i> détectées chez des patients atteints de LMMJ (Leucémie Myélomonocytaire Juvénile). D'après Loh <i>et al.</i> , 2004.	124
Tableau VIII : Les mutations de <i>PTPN11</i> dans la LMMJ (Leucémie Myélomonocytaire Juvénile), le syndrome myélodysplasique et la leucémie aiguë myéloïde. D'après Tartaglia <i>et al.</i> , 2003.....	126
Tableau IX : Mutations du gène <i>PTPN11</i> recherchées par ddPCR. Source : Benoit Hédan, Annexe 5.	146
Tableau X : Description et explication des étapes du protocole d'extraction d'ADN tissulaire avec le kit NucleoSpin® Tissue du laboratoire MACHEREY-NAGEL [235], [236].....	147
Tableau XI : Description et explication des étapes du protocole d'extraction d'ADN avec le kit NucleoSnap® cfDNA du laboratoire MACHEREY-NAGEL [236], [237].....	148
Tableau XII : Protocole d'extraction manuelle d'ADN à partir du sang. Source : CRB Cani-DNA..	151
Tableau XIII : Étapes réalisées par le thermocycleur pour le protocole de PCR utilisée dans la technique de ddPCR. D'après Bianchi, 2023.	154
Tableau XIV : Composition du MIX pour un puits, en vue de la réalisation d'une ddPCR. D'après Bianchi, 2023.....	155
Tableau XV : Composition du mix de ddPCR pour un puits, en vue de la réalisation d'une ddPCR sur de l'ADN plasmatique, pour la détection des deux hotspots mutationnels du gène <i>PTPN11</i> (E76K ou 655 et G503V ou 797). Réalisation : Benoit Hédan.	156
Tableau XVI : Caractéristiques de la cohorte d'étude de Bouviers Bernois	161
Tableau XVII : Description des causes de décès, des signes cliniques et inventaire des prélèvements tumoraux, plasmatiques et sanguins analysés, pour les Bouviers Bernois de l'élevage de la vallée de l'Hyrôme. Réalisation personnelle.	163
Tableau XVIII : Description des causes de décès, des signes cliniques et inventaire des prélèvements tumoraux, plasmatiques et sanguins analysés, pour les Bouviers Bernois de l'élevage du logis de Sainte-Macrine. Réalisation personnelle.....	165
Tableau XIX : Résultats de ddPCR détectant le ratio des mutations E76K et G503V dans les différentes tumeurs des huit individus atteints de SH (réalisation personnelle).....	169
Tableau XX : Résultats de ddPCR détectant le ratio des mutations E76K et G503V dans les différents prélèvements plasmatiques des six individus atteints d'un sarcome histiocytaire portant une mutation de <i>PTPN11</i> (réalisation personnelle).....	176

Tableau XXI : Répartition des mutations distinctes de <i>PTPN11</i> retrouvée chez chaque individu atteint de sarcome histiocytaire, selon leur présence dans au moins une lésion tumorale et/ou dans l'ADN tumoral circulant dans le plasma (réalisation personnelle).....	181
Tableau XXII : Détermination des dates de diagnostic clinique (diag. clinique), diagnostic de certitude (DC) et diagnostic précoce (DP) afin d'estimer le bénéfice du test diagnostic précoce du SH par rapport au diagnostic par suspicion clinique (réalisation personnelle). Les temps de survie et les délais sont en jours.	184
Tableau XXIII : Statistiques descriptives concernant le délai de précocité du test de diagnostic du sarcome histiocytaire chez nos six cas, par détection des mutations du gène <i>PTPN11</i> dans l'ADN circulant du plasma (réalisation personnelle).	185
Tableau XXIV : Résultats des analyses par ddPCR sur les échantillons plasmatiques du chien 19856, révélant la présence de la mutation E76K du gène <i>PTPN11</i> (réalisation personnelle).	186

TABLE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BEST : *Biomarkers, EndpointS, and other Tools Resource, FDA-NIH Biomarker Working group, 2021*

BIRC5 : *Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat Containing-5* (inhibiteur baculoviral de l'apoptose contenant la répétition 5)

BOPH : *Biomarkers of Potential Harm* (Biomarqueurs de Nocivité Potentielle)

BRAF : B-Raf proto-oncogène

BRCA : *Breast Cancer* (cancer du sein)

BTAM : *Bisphosphoryl Tyrosine-Based Activation Motifs* (motifs d'activation basés sur des tyrosines biphosphorylées)

CA 15-3 : *Cancer Antigen 15-3* (antigène cancéreux 15-3) ou Carbohydre Antigen

CAST : *Cardiac Arrhythmia Suppression Trial*

CCNU : 1-[2-chloroethyl]-3-cyclohexyl-1-chloroethylnitrosourea (lomustine)

CD : Cluster de Différenciation

CDKN2A/B : *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A/B* (inhibiteur de kinase cycline-dépendante 2A/B)

CEA : *Carcinoembryonic Antigen* (antigène carcino-embryonnaire)

cfDNA : *cell-free DNA*

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CNA : *Copy Number Alterations* (altération du nombre de copies)

ctDNA : *circulating tumor DNA*

CRP : *C-Reactive Protein* (protéine c-réactive)

CTCs : Cellules Tumorales Circulantes

cTnI : *cardiac Troponin I* (troponine cardiaque I)

ddPCR : *droplet digital PCR* (PCR digitale en gouttelettes)

DNA : ADN (Acide Désoxyribonucléique)

DTCs : *Disseminated Tumour Cells* (cellules tumorales disséminées)

ECD : *Erdheim-Chester Disease* (Maladie de Erdheim-Chester)

EDRN : *National Cancer Institute's Early Detection Research Network* (réseau de recherche de détection précoce de l'institut national du cancer)

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique

EGF(R) : *Epidermal Growth Factor (Receptor)* ((récepteur membranaire du) facteur de croissance épidermique)

ER : *Estrogen Receptor* (récepteur aux œstrogènes)

FDA : *Food and Drug Administration*

FDA-NIH BWG : *Food and Drug Administration – National Institute of Health Biomarker Working Group*

FFPE : *Formol-Fixed Paraffin Embedded*

GDP : Guanosine Diphosphate

GM-CSF : *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages)

GRB2 : *Growth factor Receptor-Bound protein 2* (protéine 2 liée au récepteur du facteur de croissance)

GTP : Guanosine Triphosphate
 GTPase : Guanosine Triphosphate phosphatase
 GWAS : *Genome Wide Association Study* (étude d'association pangénomique)
 HER2 : *Human Epidermal growth factor Receptor-2* (récepteur transmembranaire du facteur de croissance épidermique humain)
 HMGB1 : *Human high Mobility Group Box 1*
 Iba-1 : *Ionized calcium-binding adapter molecule 1* (molécule adaptatrice 1 se liant au calcium ionisé)
 ICAM : *Intercellular Adhesion Molecule* (molécule d'adhésion intercellulaire)
 IGDR : Institut Génétique et Développement de Rennes
 IL : Interleukine
 IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
 KRAS : *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
 LCH : *Langerhans Cell Histiocytosis* (Histiocytose à Cellules de Langerhans)
 LDH : Lactate Déshydrogénase
 LDL : *Low-Density Lipoprotein* (lipoprotéine de faible densité)
 LMMJ : Leucémie Myéломonoocytaire Juvénile
 LHA Oniris : Laboratoire d'Histologie Animale de l'École Nationale Vétérinaire de Nantes Oniris
 LINE : *Long Interspersed Nuclear Elements* (éléments nucléaires dispersés longs)
 MAPK ou MAP-kinases : *Mitogen-Activated Protein Kinases* (kinases nécessaires à l'induction de la mitose)
 MCED : *Multi-Cancer Early Detection* (test de diagnostic précoce multi-cancer)
 MDM2 : *Murine Double Minute 2* (protéine régulant négativement p53)
 MGG : May-Grünwald Giemsa
 NCI : *National Cancer Institute*
 NGS : *Next Generation Sequencing*
 NIH : *National Institute of Health*
 NIH DWG : *National Institute of Health Definitions Working Group*
 ORF : *Open Reading Frame* (cadre de lecture ouverte)
 PARP : Poly ADP Ribose Polymérase
 Pb : paires de bases
 PBS : *Phosphate Buffered Saline* (tampon phosphate salin)
 PCR : *Polymerase Chain Reaction* (réaction de polymérisation en chaîne)
 PDGF(R) : *Platelet-Derived Growth Factor (Receptor)* ((récepteur du) facteur de croissance dérivé des plaquettes)
 PR : Récepteur à la Progestérone
 PSA : *Prostate Specific Antigen* (Antigène prostatique Spécifique)
 PTP : *Protein Tyrosine Phosphatase* (protéine tyrosine phosphatase)
 PTPN11 : *Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type 11* (protéine tyrosine phosphatase non réceptrice de type 11)
 Ras : *Rat sarcoma*
 RASGAP : *Ras-GTPase Activating Protein* (protéine activatrice de l'activité GTPase de Ras)
 Raf : *Rapidly accelerated Fibrosarcoma*
 RCF : *Relative Centrifugal Force*
 RECAF : *Receptor for Alfa Feto-protein* (récepteur de l'alpha fœto-protéine)
 RTK : Récepteur Tyrosine Kinase
 RT-PCR : *Real Time PCR* (PCR en temps réel)

SCF : *Stem Cell Factor*

SH : Sarcome Histiocytaire

SHP-2 : *Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2* (protéine tyrosine phosphatase 2 contenant le domaine d'homologie Src 2)

SNP : *Single Nucleotid Polymorphism* (polymorphisme d'un seul nucléotide)

SPR : *Surface Plasmon Resonance* (résonance des plasmons de surface)

STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription* (transducteur de signal et activateur de transcription)

TGF : *Transforming Growth Factor* (facteur de croissance transformant)

TK1 : Thymidine Kinase 1

TP53 : *Tumor Protein 53*

UMR : Unité Mixte de Recherche

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

Le cancer est la première cause de mortalité chez les chiens. Le diagnostic est souvent trop tardif, contrairement à la médecine humaine où certains tests de dépistage sont déjà pratiqués en routine pour les cancers les plus fréquents. De plus, les traitements mis en place en oncologie vétérinaire sont souvent automatiques et non spécifiques, et consistent en une excision chirurgicale de la masse tumorale si cela est possible, suivie de protocoles de chimiothérapie et/ou de radiothérapie [1].

Aujourd'hui, peu de tests de diagnostic précoce des cancers canins existent. Néanmoins, ces deux dernières décennies ont vu émerger de nouvelles technologies basées sur des approches « -omiques », permettant des avancées notables dans le domaine de l'oncologie, humaine et vétérinaire. Concernant la génomique, le développement du séquençage nouvelle génération (NGS : *Next Generation Sequencing*) a permis l'identification de mutations oncogènes inconnues, grâce à des comparaisons à grande échelle de génomes d'individus sains et d'individus malades (GWAS : *Genome Wide Association Study*, étude d'association pangénomique). Par conséquent, le NGS peut maintenant être utilisé comme technique de diagnostic précoce d'un cancer, mais peut également permettre d'identifier des mutations « driver » (mutations initiant les processus tumoraux) comme potentielles cibles thérapeutiques. Ces mutations « driver » pourraient donc être validées comme biomarqueurs de diagnostic ou biomarqueurs prédictifs d'une réponse à un traitement ; un biomarqueur étant une caractéristique objective pouvant être mesurée et utilisée comme indicateur de processus physiologiques ou pathologiques. Ainsi, une médecine personnalisée pourrait être appliquée en oncologie vétérinaire, permettant d'améliorer la prise en charge de nombreux cancers [1].

Dans ce contexte, de nombreux biomarqueurs ont vu le jour en oncologie vétérinaire. Ces biomarqueurs sont détectables dans des supports biologiques variés, y compris dans le sang. Ainsi, une prise de sang peut être qualifiée de « biopsie liquide » et être utilisée afin d'en extraire l'ADN (Acide Désoxyribonucléique) plasmatique et d'y rechercher des mutations oncogéniques connues. En effet, différentes études ont montré qu'il est possible de détecter des mutations, même à faible fréquence, dans l'ADN tumoral circulant du plasma [2], [3]. Ces résultats servent de base à notre étude expérimentale, où nous cherchons à mettre au point un test de diagnostic précoce, par détection de mutations dans l'ADN circulant du plasma, pour le sarcome histiocytaire du Bouvier Bernois, une race canine particulièrement prédisposée à ce cancer.

Le sarcome histiocytaire canin est une tumeur maligne rare et particulièrement agressive, pour laquelle aucun traitement n'est réellement efficace à ce jour. Elle représente moins de 1% des tumeurs hématopoïétiques chez le chien [4] ; et existe à une fréquence encore bien moindre chez l'homme. Anciennement appelée « histiocytose maligne », cette tumeur est issue des histiocytes, cellules du système immunitaire rassemblant les cellules dendritiques et les macrophages. Ce cancer peut prendre trois formes distinctes : la forme localisée, souvent externe, plus fréquemment retrouvée chez les Flat Coated Retrievers ; la forme disséminée interne, plus agressive et plus complexe à diagnostiquer et à traiter, forme à laquelle les Bouviers Bernois sont génétiquement prédisposés [5] ; et enfin la forme hémophagocytaire, fulgurante dans son évolution. Les signes cliniques sont insidieux et non spécifiques, ce qui en fait une affection souvent mortelle, responsable de plus de la moitié des décès par maladie dans certaines races comme les Bouviers Bernois, pour lesquels un quart des cancers sont des sarcomes histiocytaires [6].

Différents travaux de recherche ont permis d'identifier le gène *PTPN11* comme potentiel oncogène spécifique du sarcome histiocytaire du Bouvier Bernois. Ce gène code pour la protéine SHP-2, impliquée dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaire stimulant la prolifération, la survie, la différenciation et la migration des cellules, tumorales ou non. Les mutations principalement retrouvées sur ce gène, situé sur le chromosome 26 du chien, sont des substitutions d'acides aminés : E76K (acide glutamique substitué par une lysine au codon 76) et G503V (glycine substituée par une valine à la position 503). Ce sont des mutations gain de fonction, engendrant une activation constitutive de la protéine SHP-2, d'où la prolifération cellulaire incontrôlée qui en découle [7]–[9]. D'autres mutations du gène *PTPN11*, qui seront précisées dans la partie expérimentale de ce manuscrit, ont également été décrites.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude, réalisée au sein de l'équipe de recherche « Génétique du Chien » de l'Institut de Génétique et de Développement de Rennes (IGDR UMR 6290 CNRS-UR1), en collaboration avec l'École Nationale Vétérinaire de Nantes-Oniris. Nous avons suivi pendant plus de deux ans une cohorte de trente-cinq Bouviers Bernois issus de deux élevages différents, en réalisant des prélèvements sanguins tous les trois mois. À chaque décès d'un des chiens, en cas de diagnostic de sarcome histiocytaire confirmé par analyse histopathologique et d'une mutation de *PTPN11* identifiée dans le prélèvement tumoral, nous avons mené une étude rétrospective en analysant l'ADN extrait des prélèvements plasmatiques, du plus récent au plus ancien. Ce travail avait pour objectif d'estimer la fiabilité et le délai de précocité avec lesquels il était possible de détecter les mutations associées au sarcome histiocytaire, grâce à une simple prise de sang. Lors de la fin de notre collecte de prélèvements sanguins, nous avons analysé l'échantillon plasmatique le plus récent de chaque chien toujours en vie, afin de rechercher d'éventuelles mutations de *PTPN11*. Le cas échéant, un suivi par examen d'imagerie tomodensitométrique a été mis en place pour dépister une potentielle masse tumorale.

Envisageant de rendre accessible au grand public ce test de diagnostic précoce, s'il voit le jour, un questionnaire a été construit à l'attention des propriétaires de Bouviers Bernois, particuliers ou éleveurs, afin de sonder leur intérêt pour ce test. Cette étude de marché, incomplète et à petite échelle, permet d'évaluer la pertinence d'une commercialisation possible, d'un tel test de diagnostic précoce, dans un futur proche.

Afin de mieux cerner les enjeux de cette partie expérimentale visant à mettre au point un biomarqueur, nous allons tout d'abord, dans une première partie bibliographique, rassembler les connaissances actuelles sur les biomarqueurs en oncologie vétérinaire, en rappelant la définition qui leur est donnée, les différentes catégories fonctionnelles de biomarqueurs existant, ainsi que les supports biologiques variés pouvant être utilisés pour rechercher un biomarqueur. Ensuite, dans une seconde partie, le sarcome histiocytaire canin et le gène *PTPN11* associé seront abordés. La définition des histiocytes ainsi que la classification des désordres histiocytaires canins et humains seront d'abord rappelées ; puis la présentation clinique du sarcome histiocytaire sera détaillée. Enfin, la structure et le rôle de la protéine SHP-2 et du gène *PTPN11* qui la code seront décrits. Cela permettra par la suite d'exposer les mutations de *PTPN11* rencontrées dans les maladies humaines et notamment dans le sarcome histiocytaire humain, ainsi que canin. La similitude de cette affection entre le Bouvier Bernois et l'homme ouvre ainsi la porte vers de potentielles études translationnelles en oncologie comparée.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : Présentation des biomarqueurs en oncologie vétérinaire

1. Définition et historique de la notion de « biomarqueur »

1.1. Construction historique du terme « biomarqueur »

Le terme « biomarqueur » est le diminutif de « marqueur biologique ». Ce concept apparaît pour la première fois dans la littérature scientifique à la fin des années 1960 [10], bien qu'il ne soit pas utilisé alors dans le sens reconnu aujourd'hui [11]. Il devient plus communément employé dans les années 1990, mais pour des significations encore diverses et incohérentes entre elles [10]. Cela motive en 1999 le *National Institute of Health Definitions Working Group* (NIH DWG), à construire un consensus, publié en 2001, sur l'utilisation des différentes terminologies relatives au terme de biomarqueur. L'objectif est de clarifier les échanges autour du développement, de la validation et de l'utilisation des biomarqueurs dans le monde scientifique et médical [10], [12]. Ainsi, la définition établie pour le mot « biomarqueur » est la suivante : « *une caractéristique qui est mesurée et évaluée objectivement comme indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathogéniques ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique* » [12], [13].

Cette définition est employée pendant plus de 15 ans ; cependant la signification, l'interprétation et l'usage du mot varient toujours selon les auteurs. En effet, la pertinence et les modalités d'utilisation d'un biomarqueur donné ne sont pas toujours clairement décrites. En outre, la compréhension croissante de la complexité de la biologie et de ses liens avec l'environnement, et par conséquent le fait qu'un biomarqueur puisse remplir plusieurs fonctions, ralentissent la recherche sur ces marqueurs [14]. Ainsi, au printemps 2015, la *Food and Drug Administration* (FDA) et le NIH, reconnaissant que le manque de clarté dans la terminologie et les définitions précédemment établies entrave les avancées scientifiques, forment un groupe de travail ayant comme priorité l'harmonisation des termes utilisés dans le domaine des biomarqueurs. Le FDA-NIH *Biomarker Working Group* (FDA-NIH BWG) rédige donc l'ouvrage « *Biomarkers, Endpoints, and other Tools (BEST) resource* », publié en 2016 et régulièrement mis à jour (dernière révision le 29 novembre 2021) [14], [15].

Cet ouvrage, « *BEST resource* », contient un glossaire clarifiant les termes concernés, assurant une communication plus efficace entre les différents acteurs et permettant de progresser dans la recherche biomédicale et le développement de nouveaux traitements [10], [14]. La définition du terme biomarqueur est donc ainsi revue et devient : « *une caractéristique définie qui est mesurée objectivement comme indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathogéniques ou de réponses biologiques à une exposition ou à une intervention, incluant une intervention thérapeutique.* » [15]. Cette nouvelle spécification élargit la définition précédente à des marqueurs d'exposition environnementale ou toxicologique [10].

Les types de biomarqueurs que nous pouvons rencontrer sont également précisés dans l'ouvrage BEST : « *les biomarqueurs peuvent inclure des caractéristiques moléculaires, histologiques, radiographiques ou physiologiques.* [15] » ; ainsi que les sept principales fonctions qu'ils peuvent remplir :

- Biomarqueur de risque / susceptibilité
- Biomarqueur diagnostique
- Biomarqueur de suivi / de contrôle de l'évolution d'un processus pathologique
- Biomarqueur pronostique
- Biomarqueur prédictif d'une réponse à une exposition ou intervention
- Biomarqueur de réponse (aussi dénommé biomarqueur pharmacodynamique) après exposition à un produit médical ou un agent environnemental
- Biomarqueur d'innocuité [15]

L'explication précise pour chaque catégorie sera détaillée ci-dessous (cf. *1.2. Classification fonctionnelle des biomarqueurs*). Il est important de noter qu'un biomarqueur peut remplir plusieurs fonctions [16] et donc entrer dans plusieurs des catégories mentionnées ci-dessus.

Le **classement des biomarqueurs selon leur fonction** est la manière la plus commune de les distinguer **historiquement**. En 2001, lors de la rédaction du premier consensus sur les biomarqueurs, seules cinq catégories fonctionnelles étaient décrites : diagnostic, staging (stadification de la maladie), pronostic, prédictif ou suivi d'une réponse à une intervention thérapeutique [12]. Un dernier sous-ensemble de biomarqueurs a été décrit dans ce consensus : les « *surrogate endpoints* », traduisibles par « aboutissements de substitution » (voir infra) [10]. En 2010, un comité de l'Institut de Médecine est dépêché sur demande de la FDA pour travailler sur le sujet épineux des biomarqueurs et des « *surrogate endpoints* », Ce comité énumère dix usages des biomarqueurs dans le cadre des soins aux patients atteints de maladies chroniques et cinq usages destinés au développement des médicaments, les « *surrogate endpoints* » constituant un de ces cinq usages. Certaines de ces catégories se chevauchent [17]. Ce n'est donc qu'en **2016** que les **sept catégories fonctionnelles**, citées ci-dessus, sont **clairement réfléchies et définies**, sans recoupement entre elles. Alors, les « *surrogate endpoints* » sont inclus dans la catégorie des biomarqueurs de réponse à une intervention thérapeutique, ou biomarqueurs pharmacodynamiques.

1.2. Historique et précisions sur le sous-ensemble des « *surrogate endpoints* »

Après étude de la littérature sur le sujet des biomarqueurs, il semble indispensable d'évoquer les « *surrogate endpoints* », tant ce sujet semble avoir fait débat au cours des consensus établis au fil des années.

En effet, le NIH-DWG en 2001 et l'institut de médecine en 2010 font des *surrogate endpoints* une catégorie distincte de biomarqueurs, à l'encontre du FDA-NIH BWG en 2016. Ce dernier explique que des variables autres que les biomarqueurs peuvent être incluses dans les *surrogate endpoints*, ce qui élargit cet ensemble au-delà des biomarqueurs [10], [12], [15].

En reprenant l'historique de ce terme dans ses grandes étapes, sa logique et son sens sont plus facilement compréhensibles :

- En 2001, il est défini ainsi [12] : « **c'est un biomarqueur se substituant à un paramètre ou résultat clinique ; il doit permettre la prédiction du bénéfice clinique (ou des dommages, ou du manque de bénéfice ou de dommages) en se basant sur des preuves épidémiologiques, thérapeutiques, pathophysiologiques, ou autres preuves scientifiques** » (Figure 1). Un **paramètre ou résultat clinique** (ou *clinical endpoint*) étant lui-même défini comme « **une caractéristique ou une variable reflétant comment un patient se sent, fonctionne ou survit** ». L'ouvrage BEST précise d'ailleurs en 2016 qu'un biomarqueur, quant à lui, ne répond pas cette dernière définition [15]. Un paramètre ou résultat clinique est donc une mesure d'une caractéristique d'une maladie, ou un résultat d'analyse, reflétant l'effet d'une intervention thérapeutique. Il correspond au résultat final après une intervention thérapeutique. Il serait le critère le plus fiable pour estimer le bénéfice ou le risque d'une intervention thérapeutique dans des essais cliniques randomisés. Ainsi, les *surrogate endpoints* constitueraient un sous-ensemble de biomarqueurs, des intermédiaires permettant de prédire les résultats cliniques, et donc d'accélérer le processus de mise sur le marché de solutions thérapeutiques [12].

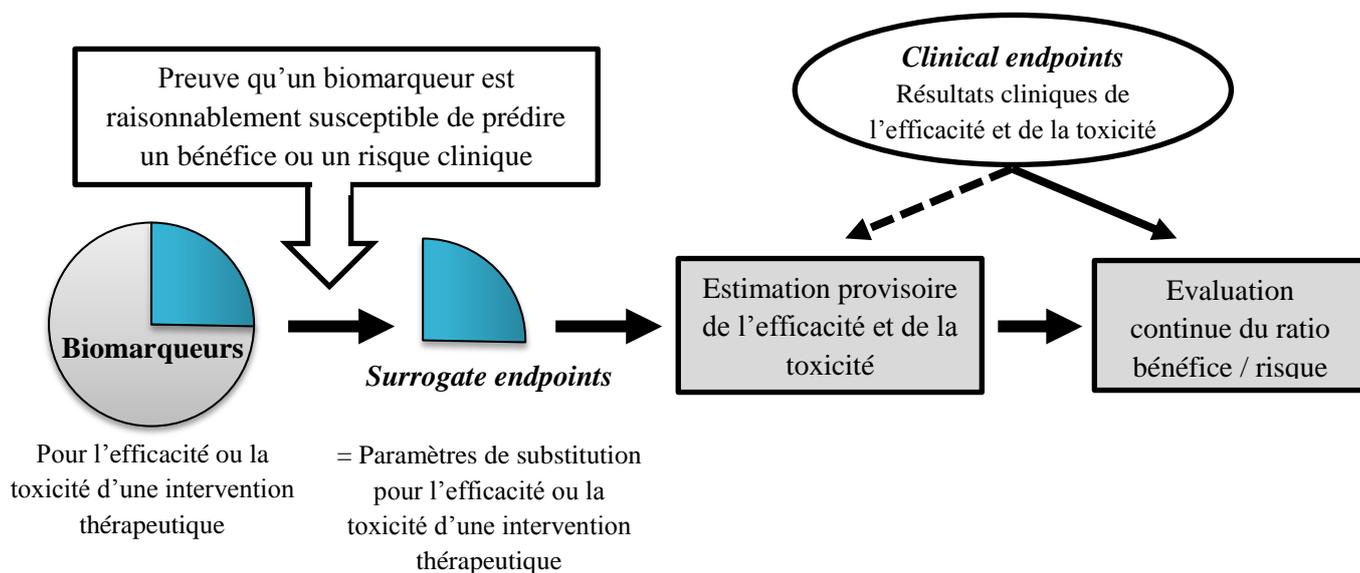


Figure 1 : Adaptation du modèle conceptuel des relations entre biomarqueurs, aboutissements de substitution, et le processus d'évaluation des interventions thérapeutiques.

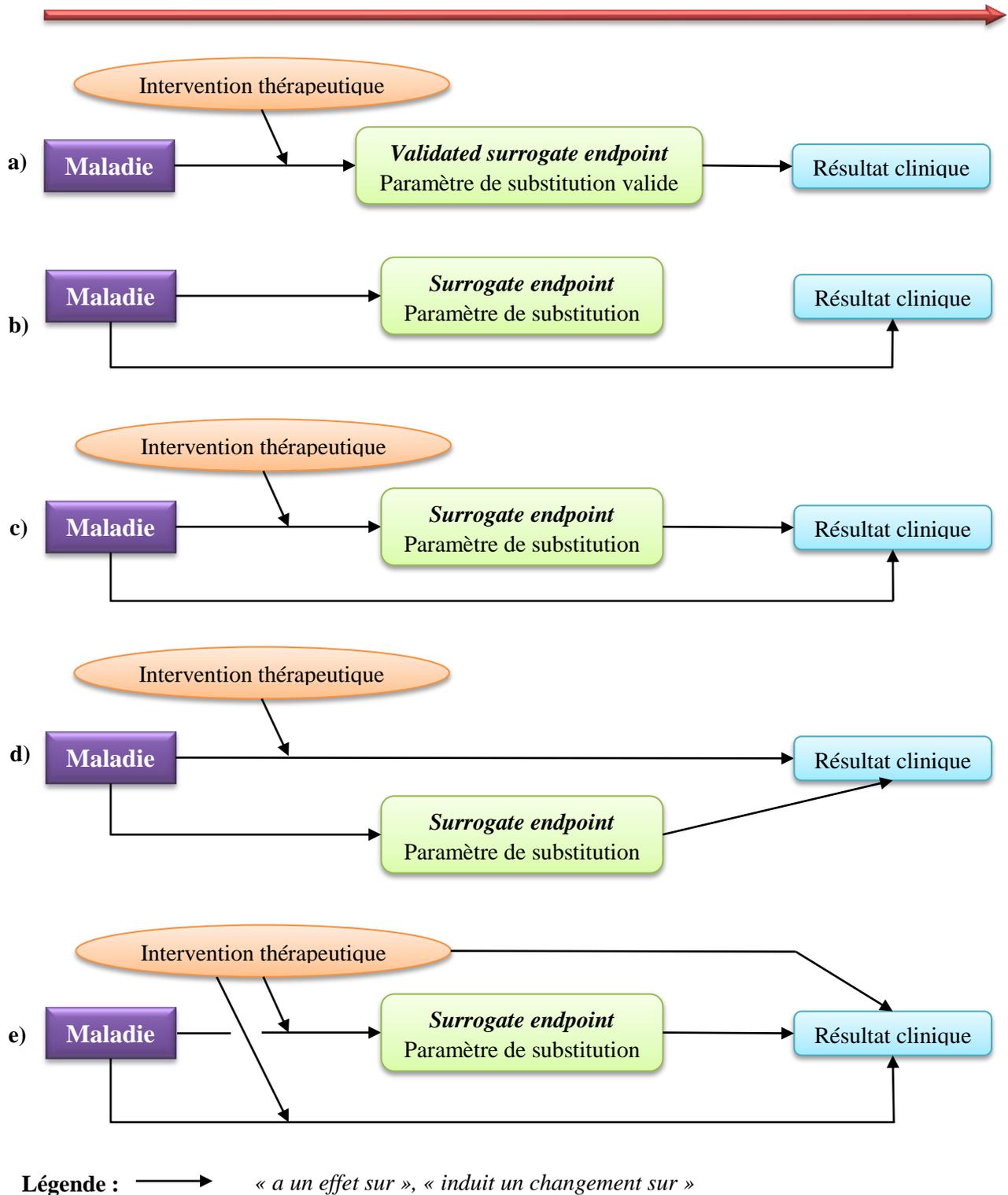
D'après Biomarkers Definitions Working Group, 2001. [3]

- En 2010, le comité de l'Institut de Médecine, en charge de revoir les définitions autour des biomarqueurs, reprend celle écrite en 2001 pour *surrogate endpoints*. Un exemple est donné : la **pression artérielle sanguine** est un *surrogate endpoint*, pour tester différentes classes de molécules anti-hypertensives dans des essais cliniques. C'est alors un intermédiaire avant le résultat clinique final, qui peut être l'amélioration clinique ou la mort de la personne. D'autres exemples complètent cette illustration dans la littérature : la **mesure de l'hémoglobine A1c dans le sang** (ou hémoglobine glyquée, étant le reflet de la glycémie) pour voir l'effet des médicaments traitant le diabète sucré ; ou encore la **réduction de la quantité d'ARN du VIH** (Virus de l'Immunodéficience Humaine) pour les thérapies traitant le VIH [5]. Les *surrogate endpoints* forment alors une catégorie fonctionnelle de biomarqueurs dans le domaine du développement de

médicaments, comme mentionné ci-dessus. Ce sont des mesures de résultats à court terme, en substitution aux paramètres principaux mesurés à long terme, afin de déterminer plus rapidement si un traitement est efficace et sûr dans la démarche réglementaire d'autorisation de mise sur le marché [17]. Les variations de ces paramètres sont détectées plus facilement, plus rapidement, et parfois de manière moins invasive, qu'un résultat clinique, qui lui nécessite souvent plus de patients [15].

- En 2016, le livre BEST reprend les définitions précédentes, mais nuance le lien des *surrogate endpoints* avec le terme biomarqueur. En effet, les *surrogate endpoints* incluent alors des variables autres que les biomarqueurs ; et ceux utilisés comme biomarqueurs ont une définition analogue aux biomarqueurs de réponse (ou biomarqueurs pharmacodynamiques) [10]. Ils sont également caractérisés par leur niveau de validation clinique, décroissant ici : paramètre de substitution validé, paramètre raisonnablement susceptible d'être un substitut, et candidat pour être un substitut [15] :
 - **Paramètre de substitution validé** : il doit répondre à deux éléments clés :
 - une mécanique biologique claire et bien comprise ;
 - des données cliniques prouvant avec une forte probabilité qu'une variation de ce paramètre prédit un bénéfice clinique spécifique [15], et même plus précisément, que la variation de ce paramètre doit pouvoir expliquer le changement du résultat clinique. Cela signifie que des déductions statistiques doivent avoir été établies avec un certain niveau de confiance, dans le cadre d'essais cliniques multiples qui tous modifient le biomarqueur et le résultat clinique, par les mêmes mécanismes biologiques. Le but est de démontrer que la relation entre le changement du biomarqueur et le changement du résultat est généralisable à l'ensemble des thérapies.

La grande majorité des biomarqueurs ne peut donc pas correspondre à des substituts validés (effet de l'intervention thérapeutique uniquement sur le substitut ou sur le résultat clinique, ou intervention d'autres mécanismes interférant avec l'effet de la thérapie) ; et même en cas de validation, le substitut n'est valable que dans un contexte d'utilisation spécifique [16] (Figure 2).



**Figure 2 : Adaptation de l'illustration des raisons de l'échec des *surrogate endpoints*.
D'après Califf *et al.*, 2018. [7]**

a) Ce cas illustre un paramètre de substitution valide. b) Dans ce cas, la maladie affecte le paramètre de substitution supposé et le véritable résultat clinique par des mécanismes différents. c) L'intervention affecte le critère de substitution, ce qui entraîne un changement du résultat clinique. Cependant, le résultat clinique est aussi impacté par d'autres mécanismes. d) L'intervention affecte le résultat clinique par des mécanismes indépendants de ceux affectant le paramètre de substitution puis le résultat clinique. Une modification du substitut n'est donc pas une mesure fiable de la modification du résultat clinique. e) Tous les échecs cités dans les cas b) à d) sont présents ici. [16]

Le paramètre de substitution validé peut être utilisé pour appuyer une autorisation de mise sur le marché, sans autres études ultérieures. Ce terme est réglementairement défini de façon large, mais fait presque toujours référence à un biomarqueur. Les mêmes exemples que ceux cités ci-dessus sont décrits, et d'autres sont ajoutés, comme : la réduction du cholestérol LDL (*Low-Density Lipoprotein*) pour valider les traitements réducteurs du cholestérol ; ou encore la diminution de l'acide urique dans le sang pour les traitements contre la goutte [15].

- **Paramètre raisonnablement susceptible d'être un *surrogate endpoint*** [15] : il correspond à un paramètre répondant une mécanique biologique claire et bien comprise. Ainsi, une variation de ce paramètre est corrélée avec un bénéfice clinique. En revanche, les données cliniques sont insuffisantes pour valider ce paramètre comme *surrogate endpoint*. Il peut être utilisé pour accélérer l'approbation commerciale de certains médicaments, mais des essais cliniques post-commercialisation sont requis pour vérifier et décrire les bénéfices cliniques. Quelques illustrations permettent de mieux faire la nuance avec les paramètres de substitution validés ; il peut s'agir :
 - Des résultats sur six mois de traitement (statut infectieux de cultures de crachats et taux de rechute de l'infection) ont été considérés raisonnablement susceptibles de prédire la résolution de la tuberculose pulmonaire et ont permis d'accélérer l'approbation de traitements contre la tuberculose ;
 - La preuve radiographique de réduction d'une tumeur et la survie sans progression de certains types de cancers ont été considérés raisonnablement susceptibles de prédire une amélioration de la survie globale avec certaines thérapies et ont permis d'accélérer l'approbation de traitements contre ces types de cancer.
- **Candidat à être *surrogate endpoint*** : un paramètre encore en évaluation pour sa capacité à prédire un bénéfice clinique [15]. La plupart des paramètres candidats n'ont pas montré de bénéfice clinique avec assez d'exactitude afin d'être utilisés comme preuve fiable pour prendre une décision clinique ou thérapeutique [14]. Ceci est notamment illustré par l'échec des agents anti-arythmiques testés dans l'essai CAST (Cardiac Arrhythmia Suppression Trial), pour améliorer la survie en diminuant les contractions ventriculaires ectopiques. Les médicaments étaient effectivement efficaces pour supprimer ces contractions ectopiques, mais entraînaient une hausse de la mortalité [14].

Les *surrogate endpoints* ou paramètres de substitution sont donc considérés aujourd'hui comme correspondant majoritairement aux biomarqueurs pharmacodynamiques, et permettent de prédire le bénéfice clinique de certaines thérapies, accélérant ainsi le processus réglementaire d'autorisation de mise sur le marché sans attendre la conclusion finale des essais cliniques.

Par la suite, nous ne parlerons plus de ces paramètres substitutifs, pouvant englober plus que des biomarqueurs pharmacodynamiques comme expliqué ci-dessus, et nous nous limiterons aux sept catégories fonctionnelles décrites dans l'ouvrage BEST.

1.3. Description d'un biomarqueur

La description d'un biomarqueur est un résumé succinct mais complet visant à identifier correctement un biomarqueur, sa plausibilité biologique (c'est-à-dire sa pertinence vis-à-vis de la maladie étudiée) et sa méthode de mesure. Ces caractéristiques clés d'un biomarqueur permettent d'harmoniser les informations issues de différentes sources scientifiques, et d'être certain qu'il est question du même biomarqueur dans des publications de différents laboratoires. Cette description, illustrée dans le **Tableau I**, inclut donc plusieurs éléments importants :

- **L'identité du biomarqueur :**
 - **Nom** de la substance à analyser (par exemple fibrinogène), ou de la caractéristique anatomique (par exemple angle d'une articulation) ou physiologique (par exemple la pression artérielle) mesurée ;
 - **L'identifiant unique** du biomarqueur le cas échéant et **l'acronyme** couramment utilisé, pour s'assurer que des ressources différentes font bien référence au même marqueur. Plusieurs ressources standardisées listent ces informations : **UniProt** (<http://uniprot.org/>), **HUGO Gene Nomenclature Committee** (<http://genenames.org>), **Protein Data Bank** (<http://rcsb.org/pdb/home/home.do>), ou **Enzyme Commission** (<http://enzyme.expasy.org>) notamment ;
 - **La source** spécifique pour l'évaluation du biomarqueur (sang, urine, biopsie d'un organe, radiographie d'une partie du corps par exemple), permettant de savoir à quelles valeurs usuelles se référer et dans quel contexte se placer. La source du biomarqueur permet également de déterminer **le type** de biomarqueur recherché : moléculaire, histologique, radiographique, numérique ou physiologique.

- **La pertinence biologique du biomarqueur :** résumé succinct de la relation entre le biomarqueur et la maladie d'intérêt, par une description brève des mécanismes biologiques, physiologiques ou pathologiques les reliant. Cela aide aussi à mieux cerner comment différents biomarqueurs peuvent interagir et peuvent être utilisés pour prédire un résultat biologique ou clinique auquel ils participent par le biais de voies biochimiques communes.

- **La méthode de mesure :** la façon dont est mesuré, imagé ou quantifié le biomarqueur ainsi que les unités de quantification sont essentielles afin de pouvoir comparer et interpréter les données provenant de différents laboratoires.

Tableau I : Exemple de description d'un biomarqueur, appliqué aux mutations du gène *PTPN11*, utilisées comme biomarqueur de diagnostic précoce de la forme disséminée du sarcome histiocytaire chez les Bouviers Bernois. [6], [9]

Nom du biomarqueur	Mutations de <i>PTPN11</i> (<i>Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor 11</i>)
Acronyme	503G/V, 76 E/G, 76 E/K, 72 A/P, 69E/K, 60G/V
Identifiant unique	HGNC:9644
Source	Plasma
Type	Moléculaire
Plausibilité biologique	A été détecté dans le sérum des Bouviers Bernois avant l'apparition de signes cliniques associés à une forme disséminée du sarcome histiocytaire
Méthode de mesure	ddPCR (<i>droplet digital Polymerase Chain Reaction</i>)
Unité de mesure	Fractional abundance (abondance fractionnaire)

1.4. Étapes de validation d'un biomarqueur

La mise au point d'un biomarqueur commence par des étapes simples mais indispensables (Figure 3) [15], [18] :

- Etape 1 : la **découverte du biomarqueur** (identification, description, principes de base de son fonctionnement)
- Etape 2 : la **conception du test permettant de détecter** le biomarqueur (des hypothèses sur son utilisation finale sont d'ores et déjà émises)
- Etape 3 : le **développement de ce test** (prouver que le test détecte bien le biomarqueur sur des échantillons en conditions de laboratoire)
- Etape 4 : la **preuve de concept** (premier essai en conditions réelles sur quelques dizaines d'échantillons témoins et malades, permet de s'assurer que le test est bien utilisable en pratique)
- Etapes 5 et 6 : **validation** analytique et clinique du test (détaillée ci-dessous)
- Etape 7 : approbation réglementaire et autorisation de mise sur le marché (AMM)



**Figure 3: Étapes de la chaîne de valeurs d'un biomarqueur.
D'après BMK Tools – Biomarqueurs, 2023. [9]**

La validation est un **processus par lequel il est montré que la performance du test est acceptable pour l'objectif visé**. Ce test doit être accompagné de trois éléments essentiels, normalement définis lors des étapes 2 et 3 : le matériel pour mesurer le paramètre d'intérêt, une méthode de mesure et enfin une méthode et/ou des critères pour interpréter les résultats des mesures. Pour un biomarqueur, les étapes de validation principales sont : la **validation analytique** (le test mesure ce qu'il est censé mesurer de façon acceptable), et la **validation clinique ou qualification** (le biomarqueur permet, par l'intermédiaire du

test, de prédire un résultat clinique pertinent) [15]. Auparavant, le terme « validation » équivalait à celui de « validation analytique », et les étapes de validation et qualification se rassemblaient sous le terme « évaluation d'un biomarqueur » [17]. Après, vient l'étape de confirmation de l'**utilité clinique**, où est spécifié le contexte d'**utilisation** du test [15]. Ces trois étapes (validation analytique puis clinique, et spécification de l'utilisation) sont interchangeables et interdépendantes ; elles ne sont pas nécessairement séparées dans le temps [17]. Chaque étape a ses exigences propres ; et leurs réévaluation et perfectionnement sont continus tout au long du processus (Figure 4) [10].

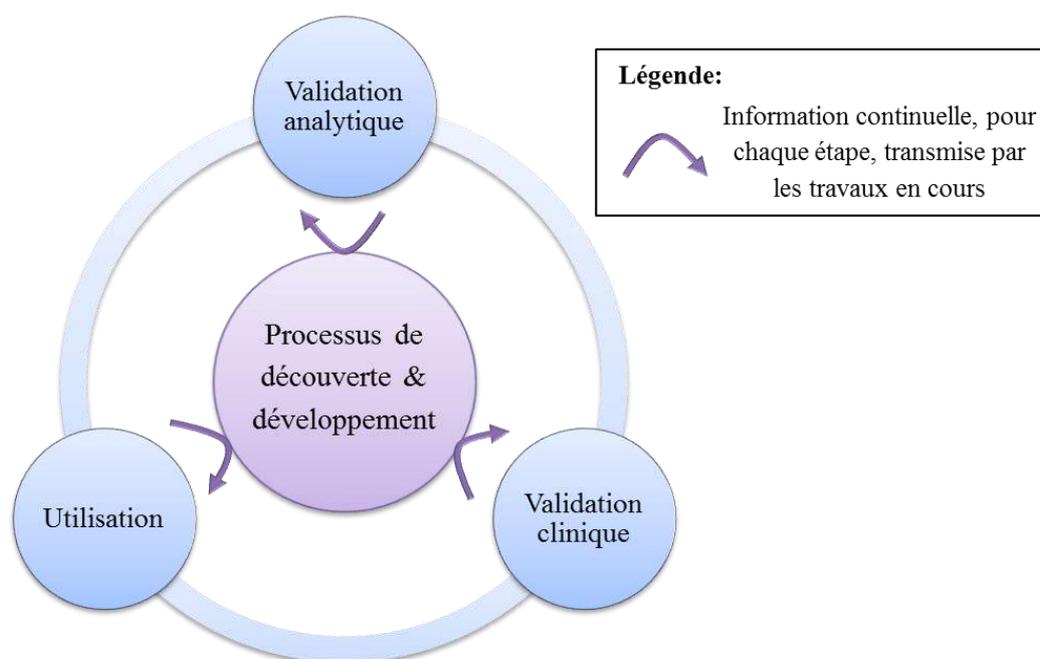


Figure 4 : Adaptation du schéma d'interdépendance entre les différentes étapes d'évaluation d'un biomarqueur. D'après *Institute of Medicine (US) Committee on Qualification of Biomarkers and Surrogate Endpoints in Chronic Disease, 2010*. [8]

L'utilisation d'un biomarqueur peut permettre d'avoir des éléments clés pour la validation clinique et analytique, et inversement. Toutes ces étapes sont interconnectées et permettent une progression partagée et commune pour le développement et la validation finale du biomarqueur. En outre, le cercle au centre représente les processus en cours qui doivent continuellement informer chaque acteur du processus d'évaluation des biomarqueurs (flèches).

Le principe de cette évaluation est applicable à un large éventail d'utilisations des biomarqueurs, des biomarqueurs d'exploration pour lesquels moins de preuves sont requises, aux biomarqueurs substitutifs à des résultats cliniques (*surrogate endpoints*). Les domaines d'application sont très variés : la recherche et le développement de produits dans les secteurs des médicaments, de l'alimentation et des équipements, ainsi que dans le domaine de la santé publique. Cette évaluation doit être adaptée aussi bien à un panel de biomarqueurs qu'à un biomarqueur unique. Elle doit également être valable quel que soit le type de biomarqueur : circulant, génétique ou numérique (imagerie) par exemple [17].

1.4.1. Validation analytique

La validation analytique est la première étape du processus de validation, permettant de **montrer la performance du test de détection du biomarqueur**, en utilisant un protocole technique spécifié. Ce protocole inclut la validation pré-analytique, *i.e.* les méthodes de collecte, de manipulation et de stockage des échantillons [15], [18].

Le test doit être acceptable, dans sa détection du biomarqueur, en termes de : **sensibilité** (limite de détection et de quantification), **spécificité** (seuil limite par rapport à la valeur de référence), **exactitude** (proximité des valeurs mesurées avec la valeur vraie) et **précision** (proximité des différentes valeurs mesurées entre elles, reflétant la reproductibilité du test). Chacune de ces valeurs est donnée avec un intervalle de confiance. Ainsi, le test doit être fiable (proche de la vérité, donc exact), reproductible dans de multiples laboratoires avec des paramétrages cliniques différents (soit précis) et il doit avoir une sensibilité et une spécificité adéquate au contexte d'utilisation [8]–[10].

La robustesse et la fiabilité du test sont éprouvées en conditions réelles d'utilisation, sur des échantillons représentatifs de la population ciblée, avec pour objectif final de définir les conditions optimales d'utilisation. L'analyse des données correspond à la validation post-analytique [18].

Cette étape de validation peut également inclure des informations visant à déterminer dans quelle mesure des données provenant de différents tests, mais concernant le même biomarqueur, peuvent être **comparées** [17].

La validation analytique est une validation technique du biomarqueur, non une validation de l'utilité clinique de ce biomarqueur [15] (**Figure 5**). Les **essais biologiques** sont la méthode la plus souvent employée pour la validation analytique d'un biomarqueur [10].

1.4.2. Validation clinique

La validation clinique est un processus permettant de **montrer que le test**, l'outil, ou l'instrument identifie, mesure ou **prédit de manière acceptable le résultat clinique d'intérêt**, c'est-à-dire qu'il y a une corrélation entre les résultats du test et les observations cliniques [10], [15], [17], [18] (**Figure 5**). Elle peut se décomposer en plusieurs phases [18] :

- La **vérification clinique** : confirme les performances cliniques du test, soit son aptitude à prédire avec précision et fiabilité le phénotype clinique d'intérêt et le bénéfice apporté au patient (surveillance, dépistage, aide au diagnostic, solution thérapeutique, pronostic). Elle est réalisée sur une cinquantaine à une centaine de sujets témoins et malades et permet de s'assurer que les résultats des chercheurs lors de l'étape 4 (**Figure 3**) sont reproductibles à plus grande échelle, et qu'il y a toujours une bonne corrélation entre le résultat du test et la clinique ;
- La **validation clinique** du test à proprement parler : comme la vérification clinique, confirme l'aptitude du test à prédire avec précision et fiabilité le phénotype clinique d'intérêt et le bénéfice apporté au patient (par exemple, survie globale des patients ou survie sans progression de la maladie, selon le traitement donné). Cette phase est réalisée à l'aide de cohortes encore plus larges. La sensibilité et la spécificité diagnostiques (*i.e.* la corrélation entre résultat du test et résultat clinique) sont établies, grâce à des standards de référence comme l'histopathologie [19].

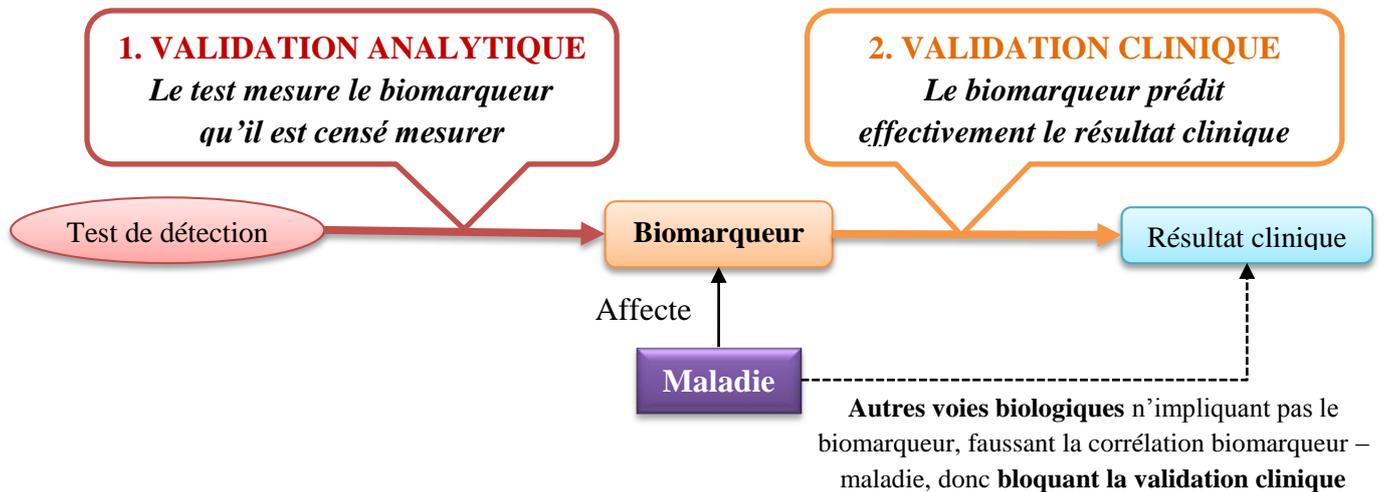


Figure 5 : Schéma permettant d'illustrer la distinction entre validation analytique et validation clinique d'un biomarqueur (réalisation personnelle).

Selon l'objectif souhaité pour le biomarqueur, des niveaux de preuve différents sont requis et des degrés d'incertitude variables sont tolérés ; d'où l'intérêt d'une interdépendance avec l'étape suivante : la confirmation de l'utilité clinique.

1.4.3. Etablissement et confirmation de l'utilité clinique

Cette dernière étape, parallèle à la validation clinique, consiste à **démontrer l'utilité clinique et donc la valeur ajoutée du test sur la prise en charge des patients** : le test fournit-il une aide pour le choix de la prise en charge ? Permet-il la mise en place d'une stratégie préventive ? Le but est donc de prouver que le test apporte un bénéfice réel au patient [10], [18].

Pour cela, une analyse contextuelle est menée sur l'usage auquel le biomarqueur est destiné. Cette analyse doit être conduite par un panel d'experts. Tout d'abord, la **catégorie fonctionnelle du biomarqueur doit être déterminée**. Ensuite, un certain nombre de paramètres doivent être pris en compte : prévalence, morbidité, mortalité de la maladie, risques et bénéfices associés à l'utilisation du test, coût du test, et si le biomarqueur est destiné à devenir un paramètre de substitution ou non. Dans ce dernier cas, des preuves solides et un contexte convaincant sont nécessaires. Il est également important d'évaluer les effets indésirables de la réalisation du test, l'impact des résultats faux positifs et faux négatifs. De nouvelles caractéristiques de performance du test sont alors déterminées : **valeurs prédictives positive et négative** [10], [15], [17], [19].

Rappel théorique – Définition de la valeur prédictive
Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine, 2023 [20]

« Valeur prédictive : probabilité de la fiabilité des tests utilisés dans un but de diagnostic ou de dépistage

La **valeur prédictive positive** désigne la probabilité qu'une personne ayant un test positif soit vraiment positive (c'est-à-dire malade).

La **valeur prédictive négative** désigne la probabilité qu'une personne dont le test est négatif ne soit pas malade.

La valeur prédictive d'un test **dépend de la sensibilité et de la spécificité** du test utilisé, **mais également de la prévalence** de l'affection étudiée dans l'échantillon. »

« **Prévalence** : nombre total de cas d'une maladie donnée ou de tout autre évènement (accident, etc.) existant dans une population déterminée, sans distinction entre les cas nouveaux et les cas anciens, au cours d'une période de temps définie ou à un instant défini. »

Ainsi, la validation réglementaire d'un test se fait dans le cadre d'une utilisation spécifique, et ne sera pas valable réglementairement dans un autre cadre. Le glossaire de l'ouvrage BEST définit cette confirmation de l'utilité clinique comme étant l'étape de **qualification** [10], [15].

1.4.4. Exemple de processus de validation appliqué à un biomarqueur de diagnostic précoce d'un cancer

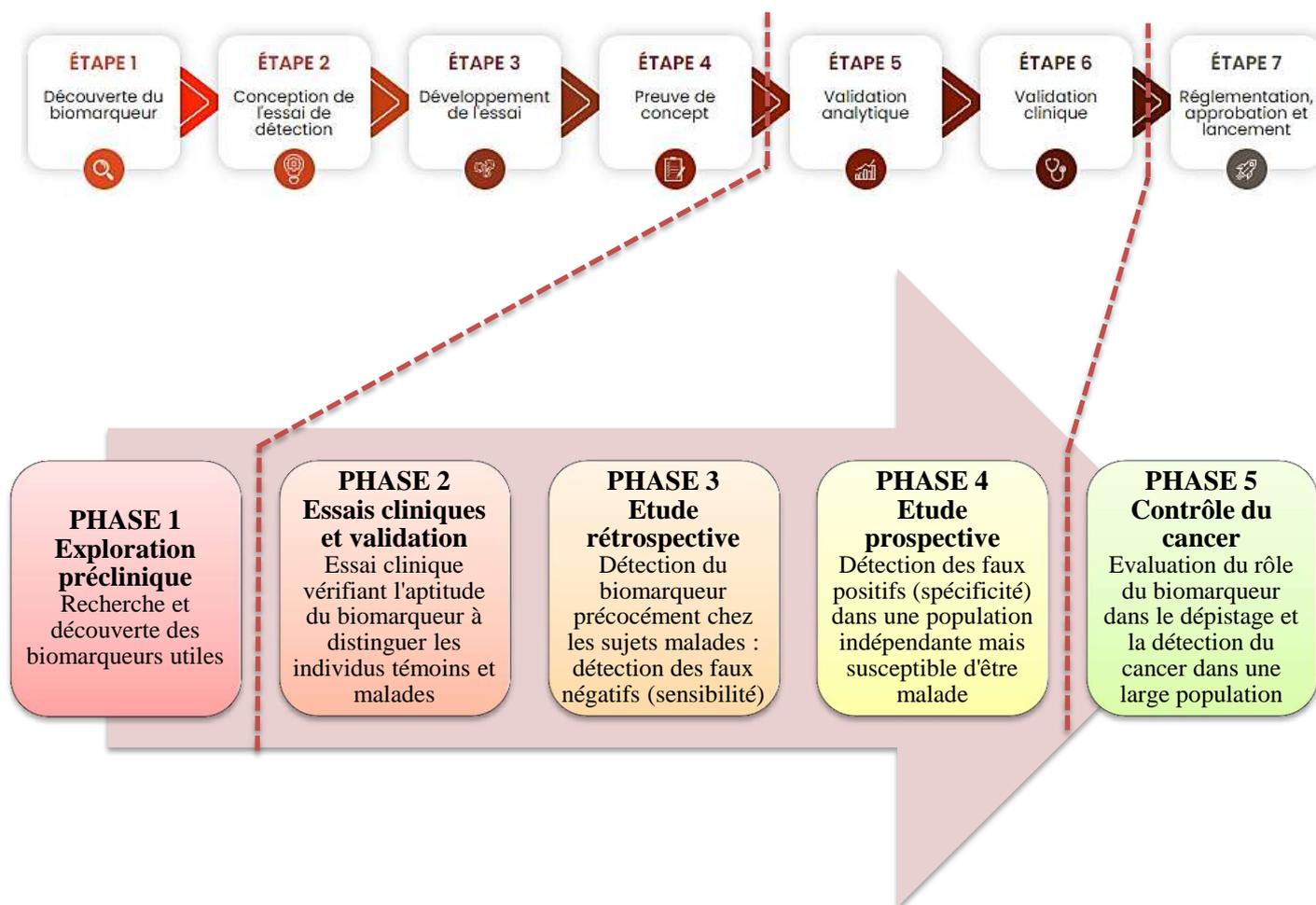


Figure 6 : Adaptation du schéma d'approche en cinq phases du développement et de l'évaluation des biomarqueurs de diagnostic précoce d'un cancer. D'après Srivastava *et al.*, 2020.

Approche mise au point par l'EDRN: National Cancer Institute's Early Detection Research Network (réseau de recherche de détection précoce de l'institut national du cancer) [21]

L'exemple choisi ici permet d'illustrer de manière adéquate le sujet central de cette thèse : **la mise au point d'un test de diagnostic précoce d'un certain type de cancer** (Figure 6). Ainsi, en projetant sur l'approche ci-dessus les étapes de mise au point d'un biomarqueur décrites précédemment, on peut associer la phase 1 aux étapes 1, 2, 3 et 4 de découverte et d'élaboration d'un test permettant de détecter le biomarqueur d'intérêt. Ensuite, les phases 2, 3 et 4 correspondent aux étapes de validation analytique et clinique. La particularité pour un test de diagnostic précoce est la nécessaire **réalisation d'études rétrospectives et prospectives permettant d'estimer la fiabilité de la précocité annoncée**. La phase 5 peut être considérée comme étant une étape de pharmacovigilance, après mise sur le marché du test de détection du biomarqueur d'intérêt [21].

Le dernier point important à mettre en avant dans le cadre de notre travail, après avoir mis en exergue l'application des définitions et étapes décrites dans un contexte de diagnostic précoce d'un cancer, est la transposition de toutes ces définitions et implications au domaine de la médecine vétérinaire.

1.5. Transposition au monde de la santé animale

La notion de **biomarqueur** n'a **pas été clairement définie** dans le monde vétérinaire. La plupart des auteurs laissent ce terme sans définition ou ont utilisé la définition fournie par le FDA NIHBWG en 2016 [15]. Deux exceptions sont cependant notées : Fry et Dunbar en 2007, définissent un biomarqueur d'exposition comme « *un indicateur biologique distinctif utilisé pour identifier le moment où un évènement ou un processus physiologique d'intérêt se produit chez un animal* » ; et selon Mobasheri et Cassidy en 2010, un biomarqueur est « *une entité biochimique utilisée pour mesurer l'avancée d'une maladie ou les effets d'un traitement sur un résultat clinique* ». Ces derniers auteurs citent également la **définition de l'Institut National du Cancer** (NCI: *National Cancer Institute*): « *une molécule biologique, recherchée dans le sang ou dans d'autres fluides corporels, permettant de révéler un processus normal ou anormal, un état ou une maladie* ». Les deux dernières définitions données ici sont **restrictives**, car elles n'incluent pas les biomarqueurs non moléculaires ou non biochimiques, tels que des images radiographiques ou échographiques, une température corporelle, une pression oculaire, une pression artérielle, une fréquence cardiaque ou respiratoire, etc... [10], [13].

Ainsi, aujourd'hui, les définitions du glossaire BEST sont largement applicables à la santé animale (médecine ou industrie), que ce soit pour le mot biomarqueur ou pour tous les autres termes qui y sont relatifs [10], [16]. En médecine vétérinaire, un biomarqueur est donc aussi : « *une caractéristique définie qui est mesurée objectivement comme indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathogéniques ou de réponses biologiques à une exposition ou à une intervention, incluant une intervention thérapeutique.* » [15].

En revanche, bien que les mêmes définitions soient applicables, les chercheurs et autres utilisateurs des biomarqueurs doivent être **prudents quant aux réglementations** en vigueur, différentes entre la médecine humaine et la **médecine vétérinaire**. Selon les pays, il n'existe pas toujours de normes réglementaires en santé animale, comparables à celles de la santé humaine. C'est pourquoi il est essentiel d'établir, dès le début du processus de découverte d'un biomarqueur, des **critères rigoureux pour les phases de test en vue d'une application vétérinaire réglementaire**. En général, en médecine vétérinaire, la validation complète d'un biomarqueur n'a pas lieu avant la mise sur le marché, d'où l'intérêt de choisir avec précaution les patients sur qui le biomarqueur est recherché et de faire preuve de prudence pour l'interprétation des tests. La **pharmacovigilance vétérinaire** a donc ici une importance capitale [10].

BILAN

Un biomarqueur est défini comme « *une caractéristique qui est mesurée et évaluée objectivement comme indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathogéniques ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique* ».

Sept catégories fonctionnelles de biomarqueurs sont aujourd'hui décrites, relatives à la définition d'informations sur le risque individuel, le pronostic, le diagnostic, le suivi d'une maladie, la prédiction ou le suivi d'une réponse à un traitement, l'innocuité d'une solution thérapeutique.

Parmi la catégorie des biomarqueurs pharmacodynamiques, on trouve un ensemble appelé paramètres de substitution ou *surrogate endpoints*. Ce sont des biomarqueurs prédisant avec une forte probabilité un résultat clinique donné avant découverte de ce résultat (Figure 7).

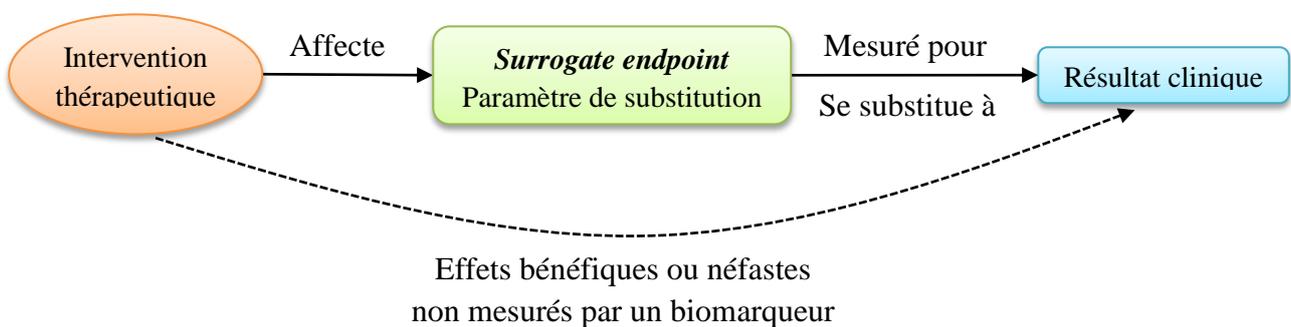


Figure 7 : Effets d'une intervention thérapeutique sur les biomarqueurs et les résultats cliniques dans les essais cliniques. D'après *Biomarkers Definitions Working Group, 2001*. [3]

Dans de nombreux cas, l'intervention va affecter le résultat clinique par une voie biologique qui ne reflète pas entièrement la façon dont va être modifié le biomarqueur. Cela arrive souvent dans les maladies complexes, où un unique biomarqueur ne peut rendre compte que d'une infime partie de l'effet du traitement. Une intervention peut aussi avoir des effets imprévus qui diminuent ou annulent totalement le bénéfice de la thérapie. Cet impact indépendant des bénéfices ou dommages imprévus d'une intervention thérapeutique sur un résultat clinique est représenté par la flèche en pointillés. Les biomarqueurs qui ne reflètent pas une portion suffisante de l'effet du traitement n'acquièrent pas le statut de paramètre de substitution (surrogate endpoints).

Enfin, après découverte d'un biomarqueur et élaboration d'un test pour le détecter, la **validation** de ce biomarqueur est constituée de **trois étapes** principales : la validation **analytique** (le test mesure effectivement le biomarqueur), la validation **clinique** (la corrélation est fiable entre la mesure du biomarqueur et le résultat clinique correspondant), et la confirmation de **l'utilité clinique** (détermination de la catégorie fonctionnelle du biomarqueur et de valeurs argumentant ce choix).

Tous ces points, décrits essentiellement en médecine humaine, sont entièrement **transposables en médecine vétérinaire**, bien que les normes réglementaires soient différentes.

2. Classification fonctionnelle des biomarqueurs

Comme expliqué dans la partie précédente, **sept catégories fonctionnelles** de biomarqueurs sont aujourd'hui décrites [10], [15]. Dans cette partie, chaque catégorie fonctionnelle va être définie et illustrée à l'aide d'exemples concrets, choisis en oncologie vétérinaire quand cela est possible. Les articles concernant les biomarqueurs en médecine vétérinaire ne représentent en effet qu'une petite partie de l'ensemble des articles traitant des biomarqueurs [22]. Les listes d'exemples proposées ne sont pas exhaustives, mais reprennent pour la plupart des découvertes récentes sur les biomarqueurs vétérinaires. Les définitions sont reprises de l'ouvrage BEST, actualisé en 2021, et complétées.

Avant tout, il est intéressant de noter qu'un même biomarqueur **peut remplir plusieurs fonctions** ; mais aussi qu'il est parfois **plus fiable d'utiliser un panel de biomarqueurs** pour une même utilisation concernant le même processus pathologique, en raison de la complexité de celui-ci. En effet, chaque biomarqueur du panel peut jouer un rôle partiel dans une des voies biologiques menant au résultat final ; la prise en compte de tous les biomarqueurs permet alors de se faire une idée plus exacte de la finalité clinique [10], [16].

2.1. Risque / susceptibilité individuelle

Un biomarqueur de risque ou de susceptibilité est un « **biomarqueur indiquant le potentiel d'un individu à développer une maladie ou une affection** », alors qu'il ne montre aucun signe clinique apparent de cette maladie ou affection. Ce type de biomarqueur peut être associé à une augmentation ou une diminution de la probabilité de développer la maladie ou affection d'intérêt [15].

Il ne faut pas confondre les biomarqueurs de risque ou susceptibilité avec les biomarqueurs pronostiques, qui décrivent eux la probabilité d'apparition d'un événement pathologique chez un individu déjà diagnostiqué comme étant atteint d'une affection, et avec les biomarqueurs diagnostiques, qui eux indiquent si un individu est effectivement atteint d'une maladie [15], [23].

Le séquençage des génomes des animaux domestiques a permis de grandes avancées pour ces biomarqueurs, en identifiant les **bases génétiques de la prédisposition ou de la résistance** à certaines maladies. Des tests génétiques ont ainsi été générés, aussi bien pour les animaux de compagnie que pour les animaux de production, permettant de **guider les choix d'accouplements** dans les élevages pour limiter l'apparition de diverses affections [10].

Exemples :

- Une étude **GWAS** (*Genome Wide Association Study* ou étude d'association pangénomique, permettant de comparer le génome d'individus sains et affectés afin d'identifier les mutations prédisposantes non somatiques d'une affection [24]) réalisée en 2015 a permis d'identifier des marqueurs génétiques (**SNP** : *Single Nucleotid Polymorphism*) associés à un risque augmenté de développement d'un **mastocytome** chez la race **Golden Retriever**. Ils sont notamment situés sur les chromosomes 14 et 20 du génome canin [25].
- Différentes études ont permis d'identifier des loci de susceptibilité au développement de la maladie définie comme « **complexe respiratoire bovin** » chez la race **Holstein** [26], [27].

- En 2016, une mutation prédisposant la **race canine Doberman aux cardiomyopathies dilatées** est découverte [28]. Il s'agit d'une mutation du gène codant pour la **titine**, une protéine indispensable au fonctionnement du muscle cardiaque en coordonnant l'alignement parfait des myofibrilles au sein des sarcomères [29]. Une première mutation de prédisposition avait été trouvée en 2014, la délétion du gène codant pour la protéine mitochondriale PDK4 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4), qui fournit de l'énergie aux cardiomyocytes. Les chiens présentant ces deux mutations ont plus de risques de développer une cardiomyopathie dilatée, le risque étant un peu amoindri si le chien n'en possède qu'une. Des tests pour détecter ces deux mutations sont aujourd'hui commercialisés [28].
- Deux gènes, **BRCA1 et BRCA2** (*Breast Cancer 1 et 2*), déjà identifiés comme étant des gènes de prédisposition aux cancers du sein et des ovaires chez la femme, ont été montrés comme possiblement associés également à ces cancers chez le chien [30]. De la même façon, très récemment, en janvier 2023, un autre gène a été montré comme étant le gène le **plus muté dans les tumeurs mammaires canines** : le gène **PIK3CA** (sous-unité catalytique α (*Catalytic subunit Alpha*) de la Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate Kinase), retrouvé également muté dans les cancers du sein humains [31].
- L'identification, grâce à une analyse GWAS, de neuf marqueurs génétiques principaux a permis de produire un test donnant un **indice génétique** sur la probabilité de développement d'un **sarcome histiocytaire** dans la race **Bouvier Bernois** (Partie 2, 2.2.3) [32], [33].

L'intérêt majeur des biomarqueurs de risque est de guider des **stratégies de prévention** des affections chez les individus prédisposés, quand cela est possible. Par exemple peuvent être envisagés des adaptations nutritionnelles, des changements dans le mode de vie, des interventions ou thérapies particulières, comme par exemple des thérapies ciblées (vaccins, médicaments ciblés) ou de la chimio-prévention (administration de médicaments pour réduire le risque d'apparition d'un cancer). Les effets secondaires de ces solutions de prévention doivent alors être pris en compte afin de trouver le bon **compromis entre risques et bénéfices**. La connaissance de ces données de prédisposition permet aussi de mettre en place une **surveillance plus rapprochée** dans le temps, par le biais par exemple d'examens d'imagerie (échocardiographie, mammographie), pouvant favoriser une détection plus précoce de certains cancers. Par ailleurs, la découverte de ces biomarqueurs permet également de grandes **avancées en médecine humaine**, permettant là aussi de diminuer le risque d'apparition de maladies. Le développement de l'EDRN dans les années 2000 (*Early Detection Research Network* : réseau de recherche sur la détection précoce) témoigne de cet engouement pour les biomarqueurs [10], [15], [23], [34].

2.2. Diagnostic

Un biomarqueur diagnostique est un « **biomarqueur utilisé pour détecter ou confirmer la présence d'une maladie ou d'une affection d'intérêt, ou pour identifier les individus avec un certain sous-type d'une maladie** ». Le test de diagnostic doit être suffisamment fiable, car la détermination de l'atteinte ou non du patient par la maladie d'intérêt est critique pour la suite de la prise en charge (traitement, intégration dans un essai clinique) [15].

Le diagnostic d'un **sous-type** de l'affection en jeu est également fondamental, car le résultat de cette classification peut être utilisé comme donnée pronostique ou prédictive de la réponse à un traitement [15]. Par exemple, dans le cas des tumeurs mammaires, le classement en cancer hormonodépendant (cellules possédant des récepteurs aux œstrogènes et/ou à la progestérone) permet de mettre en place un traitement anti-hormonal ; tandis qu'un sous-type dit « triple négatif », c'est-à-dire ne possédant pas de récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone et à l'oncorécepteur HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* : récepteur transmembranaire du facteur de croissance épidermique humain), est plus difficile à traiter [35], [36].

La performance clinique du test diagnostique est évaluée, comme expliqué précédemment, par les **calculs de la sensibilité et la spécificité du test, par rapport à une méthode de référence** [15]. En reprenant l'illustration du carcinome mammaire, celui-ci est diagnostiqué avec certitude par biopsie puis histologie. Pour calculer la sensibilité et la spécificité de la mammographie par exemple, les résultats donnés vont être comparés et sommés, comme le montre le **Tableau II** et l'encadré ci-dessous. En revanche, en l'absence de méthode standard de référence, fixer des valeurs seuils et définir précisément le contexte d'utilisation clinique permet de donner une approximation de la fiabilité du test [16].

Une lecture par colonne du tableau permet le calcul de la sensibilité et de la spécificité, tandis qu'une lecture par ligne permet le calcul des **valeurs prédictives, positive et négative**. Ces dernières valeurs permettent d'estimer la **performance attendue** du biomarqueur diagnostique **dans les conditions d'utilisation définies**. Cela implique de préciser la population à diagnostiquer et la manière dont le test s'y applique, ainsi que la prévalence de l'affection chez la population d'intérêt. En effet, comme expliqué ci-dessus, les valeurs prédictives dépendent de la sensibilité et de la spécificité du test mais aussi de la prévalence de la maladie. Ainsi, si la prévalence de la maladie est faible, il est difficile d'avoir une valeur prédictive positive élevée ; tandis que si cette prévalence est haute, la valeur prédictive négative sera faible. Il s'agit donc de mettre en balance les inconvénients potentiels relatifs aux résultats faussement négatifs ou positifs, pour choisir le test de diagnostic avec les meilleures valeurs prédictives selon l'objectif voulu, et pour éviter des interventions médicales invasives non nécessaires ou des conséquences psychologiques dommageables suite au diagnostic faussement posé [13], [15], [16].

Tableau II : Comparaison des résultats d'une méthode de référence pour une affection donnée, avec les résultats d'un test diagnostique en cours d'évaluation pour sa performance clinique. D'après PIP-CCRA (*Patient Involvement in Cancer Research Program - Canadian Cancer Research Alliance*), 2019. [4]

		Méthode de référence	
		Etat positif = malade	Etat négatif = sain
Indicateur ou test	Résultat positif	Vrais positifs (VP)	Faux Positifs (FP)
	Résultat négatif	Faux Négatifs (FN)	Vrais Négatifs (VN)

**Rappel théorique – Méthodes de calcul des caractéristiques de performance d'un test diagnostic
selon le Tableau II [15]**

Sensibilité = Fraction des individus malades dont le test est positif = $VP / (VP + FN)$

Spécificité = Fraction des individus sains dont le test est négatif = $VN / (VN + FP)$

Valeur Prédicative Positive = Proportion des individus testés positifs et étant effectivement malades
= $VP / (VP + FP)$

Valeur Prédicative Négative = Proportion des individus testés négatifs et étant effectivement sains
= $VN / (VN + FN)$

De nombreux biomarqueurs de diagnostic (et de pronostic) en cancérologie vétérinaire ont été découverts suite à des études sur des modèles animaux pour des affections humaines, ou suite à des études non cliniques évaluant la sûreté de nouveaux médicaments humains [10].

Exemples :

- Concernant les **tumeurs mammaires chez les chiennes**, de nombreuses études ont été menées ces vingt dernières années. L'analyse histologique suite à exérèse de la masse reste le « gold standard » pour un diagnostic de certitude d'un cancer des glandes mammaires [36], mais d'autres méthodes de diagnostic se sont développées, ciblant différentes molécules, grâce à des techniques variées, moins invasives que la chirurgie :
 - Les microARN, ARN non codants d'une vingtaine de nucléotides contrôlant l'expression génique au niveau post-transcriptionnel. Notamment, la surexpression du **microARN 19b** dans le sérum représente un excellent candidat comme biomarqueur de diagnostic du cancer mammaire. Les **microARN 21 et 29b** peuvent également avoir une application comme biomarqueurs diagnostiques, que ce soit dans un échantillon de sérum ou de tumeur, où ils sont surexprimés [36]–[39].
 - La surexpression des **antigènes CEA (*Carcinoembryonic Antigen*) et CA 15-3 (*Cancer Antigen*)** dans le sérum est corrélée avec le niveau de malignité du cancer mammaire : taille et grade histologique de la tumeur, infiltration métastatique des nœuds lymphatiques. De plus, la détection commune de ces deux antigènes augmente la sensibilité de diagnostic précoce des cancers mammaires [36], [39], [40].
 - La **protéine BIRC5 (*Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat containing-5*)** est surexprimée dans les tumeurs mammaires. Ce changement peut être détecté classiquement par RT-PCR, ou par la technique de résonance des plasmons de surface (**SPR : *Surface Plasmon Resonance***) permettant d'avoir une sensibilité et une spécificité diagnostiques accrues. Cette technique permet de détecter et de quantifier la liaison d'une molécule (ici BIRC5) à son anticorps spécifique fixé sur la surface du capteur, grâce au changement de l'indice de réfraction proche de la surface, lors de la liaison de la molécule à l'anticorps. Le résultat obtenu est un **sensorgramme**, représentant l'intensité du signal de résonance en fonction du temps [41], [42] (**Figure 8**).

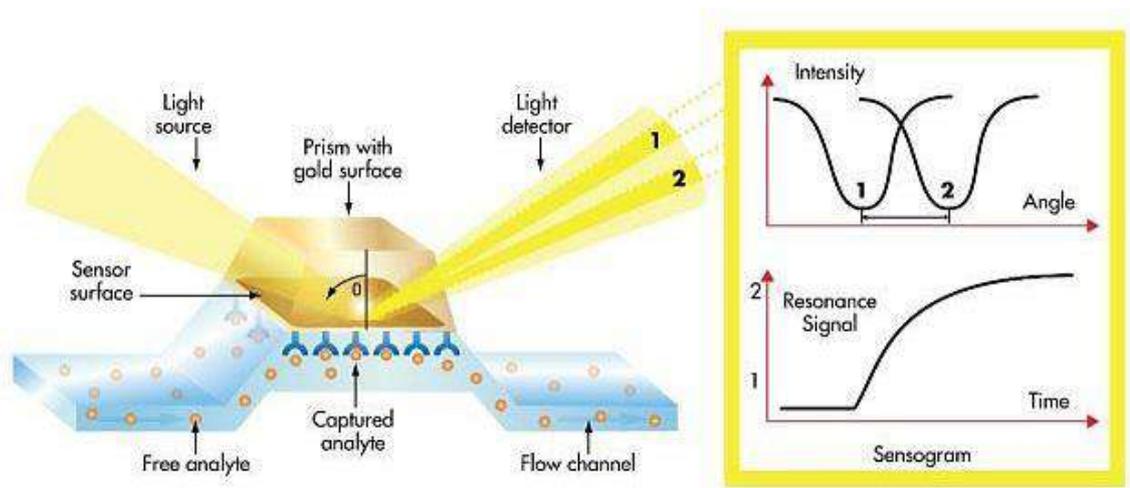


Figure 8 : Schéma de la technique de résonance des plasmons de surface : détection optique en temps réel et sans marqueur, applicable au cancer mammaire chez le chien. D'après BRUCKER. [33]

- D'autres protéines, non spécifiques, peuvent être associées aux molécules citées pour accroître la sensibilité du diagnostic : **la CRP (C-Reactive Protein) et la LDH (Lactate Deshydrogénase)**. Leur concentration augmentée dans le sérum peut être reliée, si d'autres marqueurs sont aussi relevés, à l'apparition d'une tumeur mammaire. Ces biomarqueurs non spécifiques sont davantage réservés à un diagnostic d'un stade avancé de la tumeur [36], [40].
- Les mutations de certains gènes, bien connus en tant qu'oncogènes et comme acteurs du cycle cellulaire, permettent d'améliorer le diagnostic car elles peuvent être détectées plus **précocement** : **mutations du gène p53** (protéine 53 ; gène suppresseur de tumeur, impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose) **et du gène PIK3CA** (sous-unité catalytique alpha de la phosphatidylinositol-4;5-bisphosphate 3-kinase). Ces mutations sont recherchées dans l'ADN circulant du plasma, par ddPCR (droplet digital PCR) et sont associées à une activité mitotique plus importante et un plus haut grade histologique [36], [43].
- Enfin, un dernier exemple concernant le diagnostic des tumeurs mammaires permet de souligner la diversité des types de biomarqueurs existants, ici dans le domaine de l'épigénétique. En effet, **l'hypométhylation des séquences LINE-1** (*long interspersed nuclear elements* : éléments nucléaires dispersés longs, rétrotransposons de 6000 à 7000 paires de bases [20]), mesurée par RT-PCR suite à une digestion enzymatique, peut être utilisée comme biomarqueur diagnostique [44].

- Dans l'exploration de la littérature sur les biomarqueurs diagnostiques, **l'activité de l'enzyme thymidine kinase 1 (TK1)** est souvent décrite comme étant un marqueur bien corrélé avec le diagnostic et le pronostic de certains cancers, canins notamment. La TK1 est une enzyme cytoplasmique catalysant la phosphorylation de la thymidine en thymidine monophosphate ; son activité est particulièrement augmentée lors de la transition des phases G1 à S du cycle cellulaire et reflète donc une hausse globale de la synthèse d'ADN. D'après Selting *et al.*, la mesure de concentration augmentée de TK1 sérique peut être utile à la confirmation d'un diagnostic ou au diagnostic précoce d'un cancer canin, d'autant plus si elle est couplée à la mesure de CRP. Cela est vrai en particulier pour les lymphomes et les sarcomes histiocytaires. Selon Thamm *et al.*, un tel constat permet également de confirmer la suspicion diagnostique d'un hémangiosarcome splénique, en cas d'hémoabdomen et de masse splénique chez un chien. Quelques études ont également été réalisées chez les chats, ainsi selon Taylor *et al.*, un accroissement important de l'activité de la TK1 sérique est très évocateur d'un lymphome [45]–[49].

Cela a permis la production de tests sanguins par lds laboratoires vétérinaires : TK Canine Cancer Panel, TK Feline Cancer Panel, INCaSE (Initial Notification Cancer Screen) canine cancer screening test (Veterinary Diagnostics Institute) ou encore OncoPet RECAF test (REceptor for Alfa Feto-protein, marqueur de prolifération des cellules malignes, développé par OncoPet Diagnostics, Inc.) [10], [50], [51].

2.3. Suivi d'une maladie

Un biomarqueur de suivi est un « *biomarqueur mesuré périodiquement pour évaluer l'état d'une maladie ou d'une affection ou pour mettre en évidence l'exposition (ou son effet) à un traitement médical ou à un agent environnemental* ». Il permet de suivre la progression d'une maladie, de rendre compte de l'apparition ou de l'aggravation de certaines anomalies ; mais aussi d'apprécier la réponse, favorable ou non, à un traitement. Le suivi est donc un concept large englobant plusieurs notions, expliquant le chevauchement de cette catégorie fonctionnelle avec d'autres catégories : pronostic, réponse à un traitement, innocuité [15], [16].

L'intérêt d'une mesure répétée régulièrement se justifie car au-delà de la valeur mesurée, c'est **l'évolution de cette valeur** qui va être interprétée, son amplitude de variation, et sa relation vis-à-vis des caractéristiques de la maladie (durée d'évolution, sévérité des signes cliniques). Différentes périodes sont intéressantes au cours de l'évolution clinique pour mesurer un biomarqueur de suivi : après le diagnostic, avant le début d'une intervention thérapeutique, au cours de l'intervention ou après la fin de l'intervention. La répétition des mesures va donc avoir un réel avantage car **le traitement va pouvoir être adapté** selon les valeurs obtenues, en réalisant une nouvelle intervention ou en augmentant l'intensité du traitement en cas de détérioration du pronostic, ou encore en supprimant le traitement si celui-ci s'avère être toxique pour l'organisme. Ces biomarqueurs peuvent donc avoir également une valence pronostique. Par exemple pour les tumeurs solides comme les tumeurs mammaires, des examens d'imagerie sont réalisés régulièrement pour suivre la régression ou la progression de la tumeur, ou encore sa récurrence après traitement. La variation du biomarqueur a donc un **rôle majeur en influant sur la prise de décision du clinicien**, bien que l'évolution clinique en elle-même doive toujours être prise en compte. En effet, il y a souvent un manque de précision sur l'intervalle de temps idéal entre deux mesures du biomarqueur et le moment idéal de prise de la mesure au cours du suivi [15], [16].

Les biomarqueurs de suivi sont utilisés pour le **développement de produits médicaux**, notamment au cours d'essais cliniques pour de nouveaux médicaments ou de nouveaux dispositifs de santé. Ils justifient la poursuite des études de développement quand un effet sur la cible biologique est obtenu. Dans ce sens, ils peuvent être assimilés aux biomarqueurs pharmacodynamiques. Ces biomarqueurs peuvent aussi suivre l'évolution des effets secondaires d'un traitement sur un organe en particulier, ce qui permet d'évaluer la toxicité de l'intervention et son niveau d'innocuité (association alors aux biomarqueurs d'innocuité) [15], [16].

Il est à noter que ces mêmes biomarqueurs de suivi d'une affection peuvent également servir dans des **études épidémiologiques individuelles ou de groupe**, comme c'est le cas pour les bilans sanguins (cholestérolémie, glycémie, créatinine urinaire...) réalisés respectivement pour la détection et la prévention de l'hypercholestérolémie, du diabète, de l'insuffisance rénale [15].

Exemples :

- De nouveau, l'un des cancers canins les plus étudiés est le **cancer mammaire**.
 - Comme expliqué précédemment, la concentration sérique de l'**antigène CA15-3** est corrélée avec le stade d'avancement de la tumeur mammaire. Ainsi, plus la concentration sera élevée, plus la taille de la tumeur et son degré de malignité seront importants. La progression de la tumeur peut donc être suivie grâce à l'évolution de ce dosage ; au contraire de la mesure d'une valeur unique qui peut permettre de diagnostiquer le stade clinique à un instant précis. De la même façon que pour l'usage diagnostique, le dosage de l'**antigène CEA** améliore la sensibilité du test [39].
 - Les **Cellules Tumorales Circulantes (CTCs)** peuvent être de bons candidats pour suivre la progression, et notamment l'apparition de métastases ou l'infiltration vasculaire locale de la tumeur mammaire primaire. Peu d'études ont été menées à ce sujet en médecine vétérinaire, mais Da Costa *et al.* rapportent en 2012 que les CTCs des tumeurs mammaires peuvent être détectées dans le sang grâce à l'expression de six gènes, en réalisant une RT-PCR ciblant leurs ARNm (ARN messagers) : AGR2, ATP8B1, CRYAB, F3, IRX3 and SLC1A1. Les gènes les plus prometteurs en termes de sensibilité et spécificité sont alors CRYAB et ATP8B1. Cela est confirmé par une nouvelle étude publiée en 2013 par la même équipe : la recherche des CTCs par détection combinée de l'expression de 4 gènes (CRYAB, ATP8B1, CLDN7, EGFR) permet de suivre le **potentiel métastatique** d'une tumeur mammaire avec une bonne sensibilité et spécificité (respectivement à 72,5% et 80%) [52]–[54].
- Selon Ploypetch *et al.*, la **surexpression de quatre gènes** (FKBP4, ESRRA, IGSF10 et ABCB5), détectée par recherche spectrométrique des transcrits dans le sérum des chiens étudiés, serait un bon indicateur de l'apparition de **métastases** de deux **tumeurs buccales** : le mélanome buccal à stade avancé et le carcinome épidermoïde buccal à stade avancé. Ces biomarqueurs seraient aussi intéressants comme biomarqueurs de suivi de la réponse à un traitement, donc comme biomarqueurs pharmacodynamiques [55].

- Concernant l'activité de la thymidine kinase 1 (**TK1**) évoqué précédemment, celle-ci aurait un intérêt de suivi de la maladie pour le **lymphome malin chez le chien**. En effet, son augmentation permettrait de prédire la **rechute du cancer** avant réapparition des signes cliniques, et donc un changement plus précoce du protocole thérapeutique pourrait être mis en place [56].
- Enfin, ce dernier exemple permet d'évoquer la **CRP**, protéine sensible mais non spécifique présente dans toute phase d'inflammation aiguë. De nouveau, associée à d'autres biomarqueurs, elle a une utilité de suivi **des lymphomes chez le chien** car son augmentation au-delà du seuil de 54,1 mg/L permettrait de prédire que le cancer est **disséminé** et donc qu'il est à un stade avancé (stades IV ou V). Cela a également une utilité pronostique [57].

2.4. Pronostic

Un biomarqueur pronostique est un « *biomarqueur utilisé pour identifier la probabilité d'un évènement clinique, d'une récurrence ou de la progression d'une maladie ou d'une affection chez les patients déjà atteints par cette maladie ou affection* ». Il peut indiquer une probabilité augmentée ou diminuée d'un évènement, toujours dans un contexte bien défini : stade de la maladie, thérapie de fond initiée. L'évènement clinique concerné peut être la mort, la récurrence, la progression d'une maladie, ou l'apparition d'une nouvelle affection. En oncologie, les biomarqueurs pronostiques sont, traditionnellement, la taille de la tumeur, le nombre de nœuds lymphatiques envahis par des cellules tumorales ou la présence de métastases. De plus en plus, les indicateurs ou signatures moléculaires des tumeurs sont utilisés en remplacement ou en complément de ces caractéristiques clinicopathologiques [13], [15], [16].

Les biomarqueurs pronostiques sont souvent utilisés, dans le cadre **d'essais cliniques**, comme **critères d'inclusion** de patients ayant le plus de probabilité de développer un évènement clinique donné. En effet, plus un patient a de probabilités de voir son affection s'aggraver, plus l'efficacité du traitement pourra être éprouvée. Ce choix préalable permet donc de **renforcer la puissance statistique** des essais cliniques [15], [16].

Un autre intérêt des biomarqueurs pronostiques est de déterminer les **ressources à allouer dans le domaine de la santé publique** : selon l'impact clinique et financier d'une affection, une organisation de soins de santé peut distinguer les individus pour lesquels un suivi plus rapproché serait bénéfique, et ainsi éviter des examens complémentaires ou interventions médicales inutiles pour d'autres [16].

L'ouvrage BEST **différencie les biomarqueurs pronostiques des biomarqueurs de risque** : en effet, dans le premier cas, l'affection est déjà présente mais elle peut s'aggraver ou s'améliorer ; tandis que dans le second cas l'individu concerné est sain et n'a aucun signe clinique ni aucune certitude de développer la maladie mais simplement une prédisposition. La **distinction doit également être faite avec les biomarqueurs prédictifs d'une réponse à un traitement** : ceux-ci identifient les facteurs associés à une réponse probable à une intervention ou à une exposition, au contraire des biomarqueurs pronostiques qui ne tiennent pas compte de potentielles futures interventions thérapeutiques. Ils peuvent indiquer la nécessité d'un traitement supplémentaire, mais ne sont pas utilisés pour décider du choix du traitement [13], [15], [16].

Exemples :

- L'exemple classique des **tumeurs mammaires canines** est repris ici, en se basant sur les explications données pour les biomarqueurs diagnostiques (2.2) :
 - Concernant les microARN, le **microARN 18a** serait surexprimé dans le sérum des individus avec mise en évidence histologique d'une invasion lymphatique par des cellules tumorales, indiquant donc un pronostic plus sombre pour ces cas [24]–[26]. De la même façon, la surexpression des **microARN 21 et 29b** révélerait la progression du processus de généralisation du cancer mammaire (faible différenciation des cellules, métastases) [38], [39]
 - Comme décrit dans la partie 1.2.2., la surexpression des **antigènes CEA et CA15-3** est corrélée avec le niveau de malignité du cancer mammaire : taille et grade histologique de la tumeur, infiltration métastatique des nœuds lymphatiques. Ce sont donc deux indicateurs pronostiques importants dans la progression des tumeurs mammaires [36], [39], [40].
 - Les cytokines, glycoprotéines de bas poids moléculaires sécrétées par divers tissus et cellules et impliquées dans les processus inflammatoires, immunitaires et tumoraux, sont aussi de bons candidats comme biomarqueurs pronostiques des cancers mammaires. Ainsi, selon Gelaleti *et al.*, l'**interleukine 8 (IL-8)**, connue pour ses propriétés tumorigènes et pro-angiogéniques, voit sa concentration augmenter lors de progression du cancer ou de récurrence. Elle permet d'identifier les patients avec un pronostic plus sombre afin d'ajuster plus rapidement le traitement [58]. Comparativement, l'**interleukine 35 (IL-35)**, ayant un rôle majeur dans la pathogénie de la tumeur et sa progression, est surexprimée en cas de : nécrose de la tumeur, ulcération de la peau, hausse de l'index mitotique ou du pléomorphisme nucléaire, invasion vasculaire par des embolies tumorales ou invasion des nœuds lymphatiques, avancée dans le stade de malignité histologique [36], [59]. En conclusion, ces deux interleukines sont associées à un pronostic plus sombre pour les individus concernés.
 - Enfin, il est à noter que des **auto-anticorps** dirigés contre les tumeurs mammaires canines et détectés dans le sérum des chiens (TYMS, IGFBP5, HAPLN1) seraient aussi associés négativement au pronostic des individus, de hautes concentrations étant corrélées avec le degré de malignité et la progression des tumeurs mammaires [60].
- Un deuxième exemple bien documenté concerne le **lymphome malin** chez le chien. Le stade clinique et le phénotype histologique restent les éléments les plus importants pour estimer le pronostic des individus affectés, mais quelques études montrent des résultats prometteurs concernant la corrélation entre le pronostic et la quantité de **cellules tumorales circulantes** dans le sang [61] ; ou entre le pronostic et la concentration de **thymidine kinase sérique** (plus celle-ci est élevée, plus les durées de rémission et de survie globale seraient courtes) [56].

- Au sujet du **cancer de la prostate chez le chien**, quelques études ont été menées afin d'identifier des biomarqueurs pronostiques, comme le PSA (Prostate Specific Antigen : Antigène prostatique Spécifique) chez l'homme. Ainsi, d'après Thiemeyer *et al.*, un certain nombre de **gènes** impliqués dans la cancérogénèse et la progression du cancer de la prostate (notamment dans l'environnement cellulaire) seraient de bons indicateurs pronostiques, étant **exprimés différemment** par rapport à des individus sains ou avec un meilleur pronostic [62].

2.5. Réponse à un traitement instauré

Un biomarqueur de réponse à un traitement instauré, ou biomarqueur **pharmacodynamique**, est un « *biomarqueur utilisé pour mettre en évidence une réponse biologique, bénéfique ou néfaste, chez un individu ayant été exposé à un produit médical ou à un agent environnemental* ». Il donne une indication sur l'activité biologique d'un produit médical ou d'un agent environnemental, mais ne permet pas de donner dans l'immédiat des conclusions sur l'efficacité du produit testé, sur son mécanisme d'action ou sur le résultat clinique attendu. Concernant ce dernier point, ce sont les « *surrogate endpoints* » ou critères d'évaluation substitutifs (*cf. 1.1.2.*), sous-ensemble des biomarqueurs pharmacodynamiques, qui permettent de prédire le résultat clinique, positif ou négatif, après exposition à l'agent concerné, et avant le résultat final de l'essai clinique. Dans ce cas, cela évite des études de trop longue durée ou trop invasives [10], [15], [16].

Les biomarqueurs pharmacodynamiques sont utilisés dans le **développement de médicaments** car ils apportent une **preuve de concept**, c'est-à-dire la validation que le produit médical étudié entraîne bien la réponse pharmacologique attendue dans l'organisme. Ils permettent aussi de mener des **études doses-réponses** afin de déterminer la dose de médicament la plus adaptée pour répondre à l'objectif souhaité d'amélioration clinique. Cependant, il n'est pas toujours possible de distinguer l'effet biologique direct du médicament d'un changement spontané dans la maladie ou affection. Il faut donc s'assurer de la fiabilité du biomarqueur par rapport au changement observé [15], [16].

Un autre usage de cette catégorie fonctionnelle est **d'évaluer la nocivité potentielle à long terme**, suite à l'exposition à un produit médical ou environnemental : on parle de Biomarqueurs de Nocivité Potentielle (*Biomarkers of Potential Harm* ou **BOPH**). Ils peuvent inclure des effets biologiques précoces non voulus, des altérations morphologiques, de structure ou de fonction, des signes cliniques [15].

En oncologie, ils permettent de montrer l'effet d'un traitement sur la tumeur en elle-même mais aussi sur l'ensemble de l'organisme [63].

Exemples :

- Le niveau d'activité de la thymidine kinase 1 (**TK1**), dans le cadre du **lymphome malin canin et de la leucémie canine**, est aussi corrélé à la réponse au protocole de chimiothérapie : lors du traitement, les dosages de TK1 sont significativement différents entre les chiens en rémission complète et ceux sans rémission [47], [64].

- Selon Tagawa *et al.*, la quantité d'**ADN circulant** dans le plasma, **muté pour BRAF V595E**, est corrélée avec la réponse du **carcinome urothélial canin** à différentes molécules de chimiothérapie (carboplatine, mitoxantrone) ou à sa réponse suite à une intervention chirurgicale : après l'intervention thérapeutique, la quantité d'ADN muté BRAF V595E diminue ; puis elle augmente de nouveau lors de récurrence [65].

- D'après Luu *et al.*, concernant les **ostéosarcomes canins**, la concentration sérique de **TGF β 1** (*Transforming Growth Factor* : facteur de croissance transformant) diminuerait après traitement par radiothérapie et administration de zolendronate (traitement de l'ostéoporose) et serait donc un bon biomarqueur de suivi de la réponse au traitement [66].

- Pour toutes les **tumeurs solides en oncologie vétérinaire**, un **consensus** a été rédigé en 2015 sur les **critères d'évaluation de la réponse de ces tumeurs à un traitement**, en se basant sur le même consensus en médecine humaine. Il propose une méthode standardisée pour estimer la réponse tumorale, afin d'harmoniser la rédaction des rapports d'essais cliniques [67] :
 - (1) Mesure initiale de la tumeur et des lésions tumorales associées, internes (métastases) ou externes

 - (2) Méthode de mesure : la technique et la méthode utilisée doivent être toujours les mêmes, en privilégiant l'imagerie pour son objectivité, en particulier le scanner plus sensible que l'échographie et plus reproductible dans ses mesures que l'IRM.

 - (3) Evaluation de la réponse tumorale :
 - a. Estimation de la taille tumorale / du volume tumoral.
 - b. Documentation préalable importante, pour identifier les lésions ciblées par le traitement, donc celles susceptibles de régresser.
 - c. Caractérisation de la réponse : réponse complète ou partielle, progression (de plus de 20%) ou stabilité de la maladie (diminution de moins de 30% ou augmentation de moins de 20%). Ces mesures de taille de la tumeur elle-même et des lésions associées sont donc des biomarqueurs de réponse au traitement.
 - d. Réévaluation périodique, à ajuster selon le protocole thérapeutique et selon la nature histologique de la tumeur ; elle se fait en général tous les six à huit mois.
 - e. Confirmation de la réponse : nécessaire dans les essais non randomisés afin de s'assurer que la réponse identifiée n'est pas secondaire à une erreur de mesure. En cas de stabilité de la tumeur, une confirmation peut être nécessaire six à huit mois après arrêt du traitement.

 - (4) Calcul de la valeur de survie sans progression de la tumeur.

 - (5) Communication des résultats de la réponse au traitement par rédaction d'un rapport de l'essai clinique.

2.6. Prédicatif d'une réponse à un traitement spécifique

Un biomarqueur prédictif est un « *biomarqueur utilisé pour identifier les individus qui sont plus susceptibles de montrer une réponse favorable ou défavorable à une exposition à un produit médical ou à un agent environnemental, que des individus comparables qui ne présentent pas ce même biomarqueur* ». La réponse attendue peut être une amélioration des signes cliniques ou de la durée de survie, ou au contraire un effet indésirable. En oncologie, ces biomarqueurs prédisent l'effet d'un ensemble d'interventions visant à prévenir ou à traiter le cancer : médicaments, produits biologiques, dispositifs médicaux, interventions médicales, ou même modifications alimentaires ou comportementales. Ils peuvent être binaires (absence ou présence) ou se caractériser par une gamme de valeurs [13], [15].

Les biomarqueurs prédictifs peuvent être des **caractéristiques de l'individu lui-même**, liées à sa constitution biologique (comme la fonction hépatique ou rénale), l'ADN germlinal, ou des particularités métaboliques... Ils sont alors indépendants de l'affection dont est atteint l'individu. Ils peuvent aussi correspondre à des **caractéristiques de la maladie ou du processus pathologique**, telles que la concentration d'une protéine dans le tissu tumoral ou dans le sérum du patient, ou les mutations présentes au sein de la tumeur. Ils sont souvent choisis selon le mécanisme d'action de l'intervention étudiée. Bien comprendre l'impact de l'intervention sur le patient et sur la maladie est fondamental pour choisir le biomarqueur prédictif le plus adéquat [13], [15].

Pour établir qu'un biomarqueur est bien prédictif de l'effet d'une intervention, un **essai randomisé** doit être mené avec deux groupes d'individus : ceux présentant le biomarqueur et ceux ne le présentant pas. L'ensemble de ces individus est réparti aléatoirement pour subir l'intervention expérimentale ou l'intervention témoin (placebo ou traitement standard). Une **différence doit être observée** au sein du groupe positif au biomarqueur, entre ceux qui ont reçu le traitement expérimental et ceux qui ne l'ont pas reçu ; et au sein du groupe ayant reçu le traitement expérimental, entre ceux qui sont positifs et ceux négatifs au biomarqueur. Si seule la deuxième condition est vérifiée, le biomarqueur étudié peut avoir simplement des capacités pronostiques, et être présent quelle que soit l'intervention réalisée [13], [15], [16].

Une première utilisation de ces biomarqueurs concerne le domaine du **développement des produits médicaux**. Afin d'enrichir le panel d'individus susceptibles de répondre au traitement testé, de nombreux patients sont intégrés en raison de la valeur élevée du biomarqueur prédictif de la réponse à ce traitement. Ainsi, l'effet significatif de l'intervention sera observable sur un plus grand échantillon ce qui permettra de **renforcer la puissance statistique** de l'essai clinique [15], [16].

La même idée est défendue dans l'utilisation en pratique clinique, pour **décider du choix du traitement** pour un patient. L'utilisation de biomarqueurs prédictifs permet de sélectionner les patients pour lesquels une certaine intervention sera bénéfique, de choisir parmi une large gamme d'interventions, ou encore de déterminer la population la plus à risque suite à **l'exposition à un agent environnemental**, et nécessitant alors une intervention supplémentaire. En effet, en cas d'exposition à un agent cancérigène (fumée de tabac, radiations ionisantes), ou en cas **d'effets indésirables de certains médicaments** (ulcères gastriques provoqués par des corticoïdes), connaître la population susceptible de présenter des résultats plus néfastes pourra servir à mettre en place des mesures préventives [13], [15], [16].

Selon Taylor *et al.*, la **distinction** doit être faite entre des **biomarqueurs prédictifs « compagnons »** et des **biomarqueurs complémentaires**. Pour les deux types, la positivité du biomarqueur indique la nécessité d'un traitement chez les individus. Cependant, en cas de test négatif, le traitement ne doit pas être mis en place pour les biomarqueurs « compagnons » tandis que cela est envisageable en fonction de la clinique ou d'autres biomarqueurs pour ceux dits « complémentaires » [68].

Exemples :

- Un exemple phare de biomarqueur prédictif en oncologie vétérinaire concerne les **mastocytomes cutanés canins**. En effet, deux thérapies ciblées sont aujourd'hui disponibles : le **masitinib** et le **tocéranib**, deux inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinase, dont le **récepteur c-kit**. Ce récepteur pour le facteur de croissance SCF (*Stem Cell Factor*) est muté dans de nombreux mastocytomes cutanés canins, ce qui entraîne son activation constitutive, stimulant alors la prolifération et la survie cellulaire. Cette mutation est donc également un biomarqueur diagnostique, étant plus fréquente dans les grades histologiques II et III (selon le grading de Patnaik) ; et pronostique, étant corrélée à l'agressivité de la tumeur et à une médiane de survie globale plus courte. Concernant son rôle prédictif, il a été montré que les plus hauts taux de réponse au masitinib ou au tocéranib étaient observés sur les mastocytomes cutanés mutés pour *c-kit* [69].
- Pour les **tumeurs mammaires canines**, un biomarqueur qui est à la fois prédictif de la maladie et de la réponse à un traitement, est la **mutation du gène BRCA2**. Ce gène est un suppresseur de tumeur, car son transcrite permet de réparer les erreurs des ADN double brin. La mutation entraîne une diminution de la transcription et donc diminue la capacité des cellules à réparer l'ADN double brin. La thérapie ciblée qui a été développée **inhibe la PARP1** (Poly ADP Ribose Polymerase 1). Cette dernière vient se fixer sur l'ADN lors de rupture simple brin et catalyse une poly-ADP ribosylation. Cette modification entraîne le recrutement d'autres protéines de réparation de l'ADN. Si PARP1 est inhibée, il n'y a pas de réparation de la rupture d'ADN simple brin, qui devient donc une rupture double brin au cycle de réplication suivant. En raison du défaut de réparation de l'ADN double brin causé par la mutation de BRCA2 dans les cellules tumorales, les ruptures sans réparation d'ADN double brin s'accumulent dans la cellule, aboutissant à sa mort (Figure 9) [70]. La mutation de BRCA2 est donc un facteur prédictif d'une réponse favorable au traitement par des inhibiteurs des PARP (olaparib, rucaparib et niraparib notamment) [71].
- Selon Meyer *et al.*, le niveau d'expression de la protéine **HMGB1** (*Human high Mobility Group Box 1*) permet de prédire le résultat clinique d'une **chimiothérapie** à base de cisplatine ou carboplatine. En effet, un haut niveau d'expression est corrélé avec l'efficacité de la chimiothérapie, mais permet aussi d'ajuster le protocole en instaurant des doses plus basses de ces molécules antitumorales. En effet, les protéines HMGB1 se lient sélectivement et avec une grande affinité aux complexes formés par l'ADN lié au cisplatine ou carboplatine. Cette liaison bloque l'excision de ces fragments d'ADN et empêche donc leur réparation. La protéine HMGB1 **contribue donc à la mort des cellules tumorales** [72], [73].

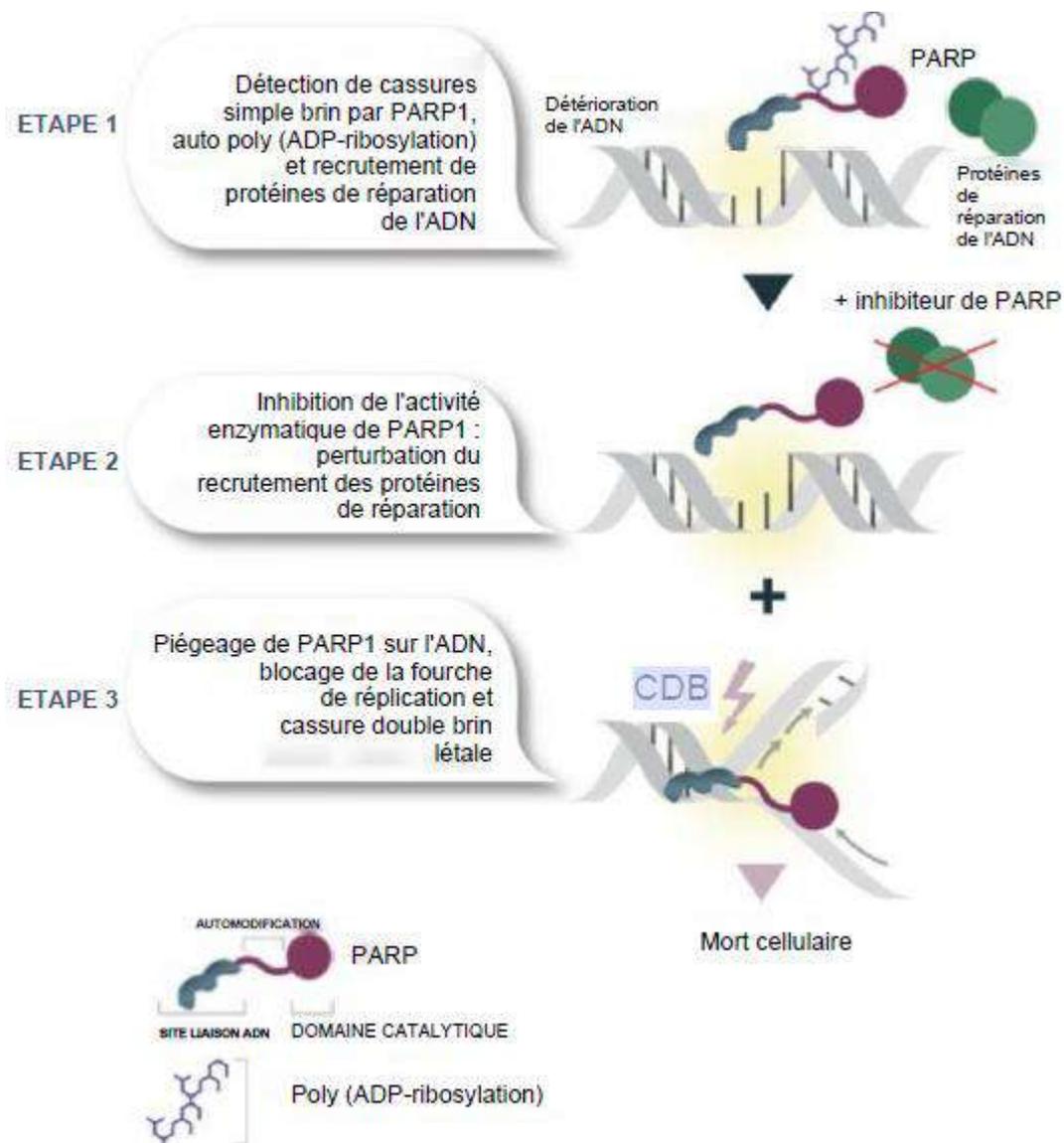


Figure 9 : Illustration de l'inhibition de la PARP, piégeant la molécule PARP et entraînant la mort de la cellule. D'après Gil Da Costa, 2015.

PARP1 : Poly ADP Ribose Polymerase 1 ; CDB : Cassure Double Brin. [69]

2.7. Innocuité

Un biomarqueur d'innocuité est un « *biomarqueur mesuré avant ou après l'exposition à un produit médical ou à un agent environnemental pour indiquer la probabilité, la présence ou l'étendue de la toxicité, en tant qu'effet indésirable* ». Toutes les interventions thérapeutiques ou expositions environnementales pouvant avoir des effets néfastes, indésirables ou toxiques, il est intéressant d'avoir des biomarqueurs prédisant ces effets. Idéalement, une variation du biomarqueur prédit la toxicité avant qu'elle ne devienne trop sévère ou même avant apparition de tout signe clinique, permettant un ajustement du dosage du traitement voire son arrêt. Ainsi, un **suiti des fonctions** hépatique, rénale, cardiovasculaire est fondamental pour estimer la toxicité d'une thérapie et s'assurer qu'elle peut être poursuivie en toute sécurité.

Dans d'autres cas, un biomarqueur d'innocuité peut **indiquer la nécessité d'un traitement**, par exemple en cas d'hypokaliémie suite à l'administration d'un diurétique, une supplémentation en potassium doit être mise en place. La kaliémie est alors un marqueur d'innocuité pour le diurétique.

Ces biomarqueurs nécessitent un **suivi périodique** afin de détecter à temps et de gérer la potentielle toxicité des diverses expositions subies par le patient. Un des enjeux principaux dans le développement de ces biomarqueurs est de rechercher **l'équilibre entre l'innocuité et les bénéfices potentiels de la thérapie** : le biomarqueur doit pouvoir détecter précocement les risques, tout en autorisant l'apport d'un bénéfice par la thérapie. Ce point est complexe car il a déjà amené à stopper des essais cliniques sur des médicaments dès l'apparition d'un effet indésirable, supprimant alors toute possibilité thérapeutique pour la molécule étudiée.

Un autre usage pertinent des biomarqueurs d'innocuité est la **sélection des patients chez qui certaines thérapies ne doivent pas être initiées**, en raison de risques significatifs pour leur santé. Par exemple, des déficiences enzymatiques peuvent entraîner l'accumulation d'un métabolite toxique, et provoquer des chocs ou des réactions d'hypersensibilité.

À l'échelle d'une population, les biomarqueurs d'innocuité interviennent dans le cadre de la **santé publique**. Ils permettent de surveiller les populations lors d'une exposition à un risque environnemental ou après cette exposition, et d'identifier les groupes d'individus les plus fragiles vis-à-vis de cette exposition. Ainsi les pouvoirs publics peuvent prendre des décisions pour limiter ces risques, rechercher la source de l'exposition, mettre en place des mesures préventives ou curatives pour les personnes à risque.

Exemples :

- Lors de **chimiothérapie**, les molécules utilisées peuvent être assez agressives et avoir des effets secondaires importants sur les organes vitaux. Ainsi, la **doxorubicine**, largement utilisée en oncologie humaine et vétérinaire (notamment pour le traitement des lymphomes, hémangiosarcomes et ostéosarcomes), présente une **cardiotoxicité** non négligeable chez le chien. Le dosage de la **cTnI** (*cardiac Troponin I* : troponine cardiaque I) sérique permet de mettre en évidence une cardiotoxicité débutante, de manière beaucoup plus sensible et précoce que l'échocardiographie. En effet, sa concentration va augmenter de manière significative et proportionnelle à la dose de doxorubicine cumulée administrée [74]–[76].
- Le **comptage des neutrophiles** en médecine humaine peut être utilisé comme biomarqueur d'innocuité chez les patients sous **chimiothérapie cytotoxique**, afin d'ajuster la dose, d'interrompre le traitement ou d'envisager l'ajout de facteurs de croissance hématopoïétiques à la thérapie [15], [77], [78].

BILAN

Les sept catégories fonctionnelles de biomarqueurs, décrites de façon consensuelle dans l'ouvrage BEST, ont toutes leur utilité dans le développement de médicaments, la mise en place de mesures préventives et curatives efficaces dans le domaine de la santé publique, le suivi clinique individualisé et adapté à chaque affection et à chaque patient (Figure 10).

De nombreux biomarqueurs existent en oncologie humaine et vétérinaire, même si beaucoup d'études publiées nécessitent des travaux de recherche supplémentaires pour développer des tests sensibles et spécifiques pour identifier les biomarqueurs et prouver leur plausibilité.

Malgré la révision de ces catégories en 2016, certaines se chevauchent encore, et leurs définitions se recoupent dans certains cas. Un biomarqueur peut remplir plusieurs catégories et il est intéressant voire même nécessaire de combiner les biomarqueurs pour prédire un résultat clinique avec précision et exactitude.

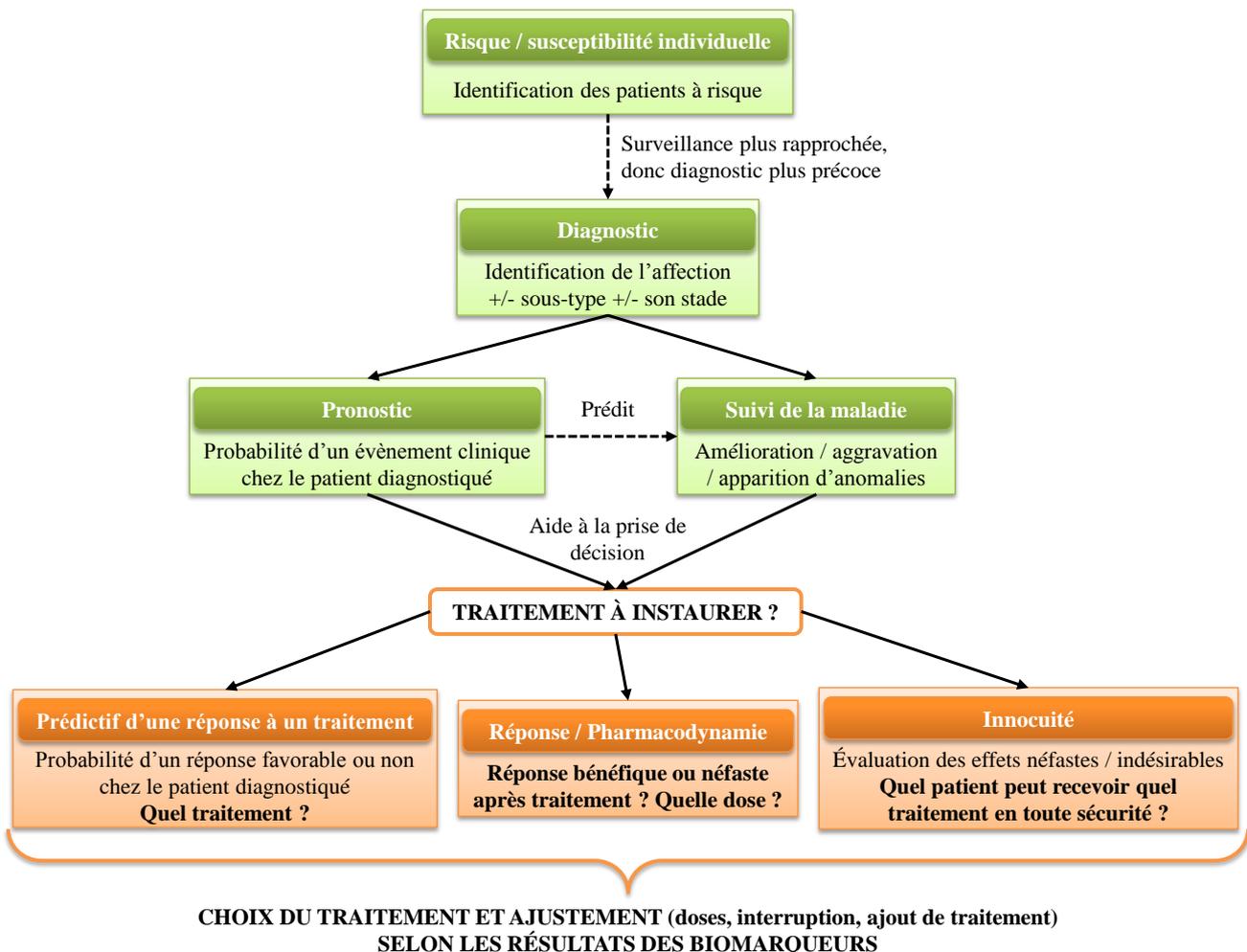


Figure 10 : Les sept catégories fonctionnelles de biomarqueurs et leur utilité en santé (réalisation personnelle).

3. Classification biologique

Comme défini ci-dessus (1.1), « *les biomarqueurs peuvent inclure des caractéristiques moléculaires, histologiques, radiographiques ou physiologiques.* [15] ». Le bulletin de 2019 du Programme de Participation des Patients à la recherche sur le cancer (PPP ou PIP : *Patient Involvement Research Program*), créé par l'Alliance Canadienne pour la Recherche sur le Cancer (ACRC ou CCRA : *Canadian Cancer Research Alliance*), précise cette information. En effet, les biomarqueurs peuvent se baser sur :

- des molécules (acides nucléiques, protéines), parfois appelées **molécules de signature**, ou des cellules ou vésicules circulantes, qui se trouvent dans le sang, des liquides ou des tissus organiques ;
- l'aspect des tissus et des cellules observés au **microscope** ;
- l'aspect des tissus et des cellules observés en **imagerie médicale** ;
- **un paramètre d'état général** comme la température ou la masse corporelle [13].

Ainsi, les biomarqueurs en cancérologie comprennent les substances produites par la tumeur (cellules, molécules au sein de la tumeur) ou libérées dans les liquides biologiques par la tumeur, l'aspect de la tumeur et de ses éventuelles métastases, mais aussi les substances produites par l'organisme en réponse à la tumorigénèse [13].

Pour découvrir et détecter ces substances, de nombreuses techniques ont été développées ces dernières années, afin d'exploiter tout potentiel biomarqueur. Ces techniques dérivent pour la majeure partie des études menées en médecine humaine. Ainsi, les analyses sanguines standard (hématologique, biochimie) sont utilisées depuis longtemps pour détecter précocement des maladies rénales, cardiovasculaires, ou même parfois des cancers ; de même que les tests enzymatiques. Parallèlement, les nanosciences et les **plateformes « omiques »** ont émergé et se sont ajoutées au panel des outils de découverte des biomarqueurs. Ces technologies englobent l'analyse multivariée, à grande échelle, au niveau de **l'ADN, de l'ARNm et autres ARN, des protéines, des lipides et des métabolites**. Elles permettent de rendre compte des cellules, tissus et fluides biologiques à un instant donné, et trouvent le meilleur biomarqueur représentatif de l'état d'intérêt. La plupart de ces techniques ont permis de nombreuses découvertes, mais des essais cliniques doivent encore être réalisés pour pouvoir utiliser ces tests en routine en médecine vétérinaire, contrairement à la médecine humaine, où l'utilité clinique a déjà été confirmée pour plusieurs de ces biomarqueurs [19], [22].

3.1. Biopsies liquides

Selon le NCI (*National Cancer Institute*), le terme « biopsie liquide » se définit ainsi : « **un test de laboratoire effectué sur un échantillon de sang, d'urine ou un autre liquide corporel** pour rechercher des **cellules cancéreuses ou de petits morceaux d'ADN, d'ARN ou d'autres molécules**, libérées par les cellules tumorales dans les liquides biologiques. La biopsie liquide permet de prélever plusieurs échantillons au fil du temps, ce qui peut aider les médecins à comprendre quels types de changements génétiques ou moléculaires se produisent dans une tumeur. Une biopsie liquide peut être utilisée pour aider à **détecter un cancer à un stade précoce**. Elle peut également être utilisée pour aider à **planifier le traitement** ou pour savoir si le traitement fonctionne ou si le cancer a récidivé. » [79]. Cette définition s'applique donc en particulier en oncologie, par opposition à la biopsie solide, *i.e.* la biopsie de la tumeur elle-même. Les liquides concernés ne se limitent pas au sang et à l'urine ; la salive, le liquide céphalo-rachidien, le liquide synovial peuvent notamment également être analysés [80]. Les molécules autres que les acides nucléiques peuvent se rapporter à des protéines, des ions, des lipides, des carbohydrates (ou glucides)... [81].

Les avantages majeurs de la biopsie liquide s'expliquent par sa nature **minimalement invasive**, sans le délai d'intervention, le coût et les risques associés à la biopsie tissulaire. En effet, elle demande généralement un temps plus réduit pour le prélèvement (simple prise de sang ou prise d'urines par exemple). Elle permet aussi une **détection plus précoce** d'une tumeur qu'avec les techniques d'imagerie classiquement utilisées [80]. Ainsi, en médecine humaine, quelques tests sont aujourd'hui proposés en routine, comme c'est le cas à l'hôpital Lyon Sud, par le CIRCAN (CIRCulating CANcer), pour le cancer bronchique à petites cellules [82]. Cependant, la biopsie liquide ne permet pas toujours d'éviter la biopsie tissulaire, souvent indispensable pour le diagnostic de certitude, la stadification du cancer, et l'étude de l'environnement tumoral.

A) L'ADN tumoral circulant : un biomarqueur prometteur et non invasif

a) L'ADN circulant ou cfDNA

L'ADN circulant dans les liquides biologiques, aussi appelé **cfDNA** pour *cell-free DNA*, rassemble tout l'**ADN relâché par les cellules**, tumorales ou non, dans les liquides corporels (sang, urine, salive, liquide pleural, fèces, liquide céphalo-rachidien, liquide synovial, sperme, fluides endométriaux...) (Figure 11). Cette libération d'ADN se fait de diverses manières : **apoptose ou nécrose** des cellules, libération d'**exosomes** (petites vésicules extracellulaires, mesurant environ 100 nm de diamètre), ou **libération active** d'ADN par les cellules [2], [19], [83]–[85]. Le processus principal en œuvre dans la libération d'ADN est l'apoptose. En effet, la plupart des fragments d'ADN sont composés d'environ 160 à 180 paires de bases (pb), ce qui correspond à la longueur d'ADN s'enroulant autour d'un nucléosome, longueur également majoritaire en cas de destruction d'une cellule par apoptose. Ces fragments peuvent mesurer jusqu'à 1000 pb ; tandis que les fragments issus de mort cellulaire par nécrose sont généralement plus grands : environ 10 000 pb [2], [83], [84], [86].

L'ADN circulant est composé à la fois d'**ADN nucléaire (ou génomique)**, issu des noyaux des cellules mortes, mais aussi d'**ADN mitochondrial**. Pour deux copies d'ADN génomique, il y aurait proportionnellement jusqu'à plusieurs centaines de copies d'ADN mitochondrial [87]. Des altérations de l'ADN mitochondrial peuvent causer un dysfonctionnement mitochondrial et conduire au développement

d'un cancer [80]. Un autre type d'ADN peut également être libéré, dans le sang notamment : l'**ADN viral**, comme c'est le cas pour le carcinome nasopharyngé humain (associé à l'ADN du virus d'Epstein-Barr détectable dans le plasma) ou pour le virus de l'hépatite B humain [80], [87].

La **quantité d'ADN circulant chez des patients cancéreux serait significativement plus élevée** que chez les patients sains, bien que les quantités entre ces deux groupes puissent se chevaucher : ainsi, les concentrations d'ADN circulants chez les individus atteints vont de 0 à 1000 ng par mL de sang avec une moyenne de 180 ng par mL ; tandis que les individus sains ont des concentrations allant de 0 à 100 ng par mL avec une moyenne de 30 ng par mL [83], [87]. Ainsi, trois études en oncologie vétérinaire, comparant la concentration d'ADN circulant chez des chiens sains ou avec tumeurs (sarcomes [88], tumeurs mammaires [89], tumeurs variées [90]), ont démontré que celle-ci était plus élevée dans le groupe des individus atteints que dans le groupe des individus sains. Cette concentration d'ADN serait également **augmentée proportionnellement selon le stade clinique** de la maladie, tel que la présence ou non de métastases [90].

Cependant, ce constat n'est **pas applicable dans tous les cas et à tous les types de cancers**, d'où l'intérêt de confirmer ces premières données avec davantage de travaux de recherche. En effet, la littérature la plus récente rapporte une absence de différence significative entre les concentrations d'ADN circulant chez des patients cancéreux et chez des patients sains, en ce qui concerne le sarcome histiocytaire canin, le mélanome buccal malin canin, et le lymphome multicentrique canin. De plus, un stade clinique avancé n'est pas toujours associé avec une concentration plus élevée de cfDNA dans cette étude [2].

D'autre part, une augmentation de l'ADN circulant peut être la conséquence d'un certain nombre d'affections : inflammations, septicémie, traumatisme tissulaire, néoplasies bénignes ou malignes... Elle n'est donc **pas spécifique d'un cancer**, une modification de l'ADN circulant plus précise doit donc être recherchée [83], [88], [91], [92]. C'est alors qu'intervient l'**ADN tumoral circulant** (ou **ctDNA** pour *circulating tumor DNA*) (Figure 11).

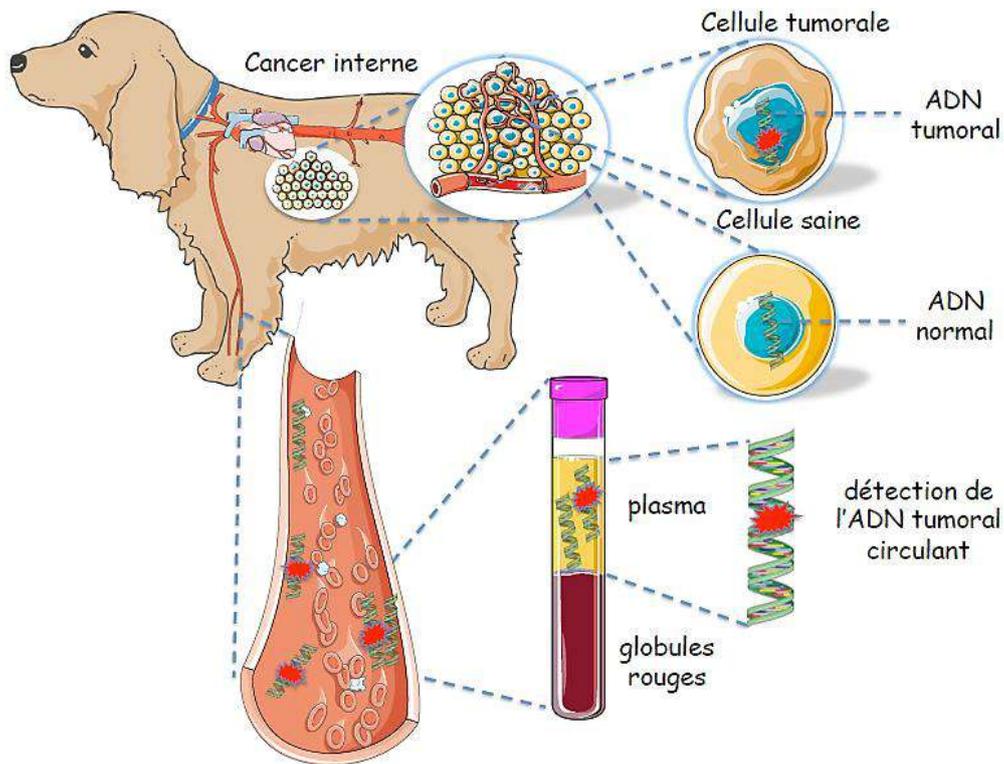
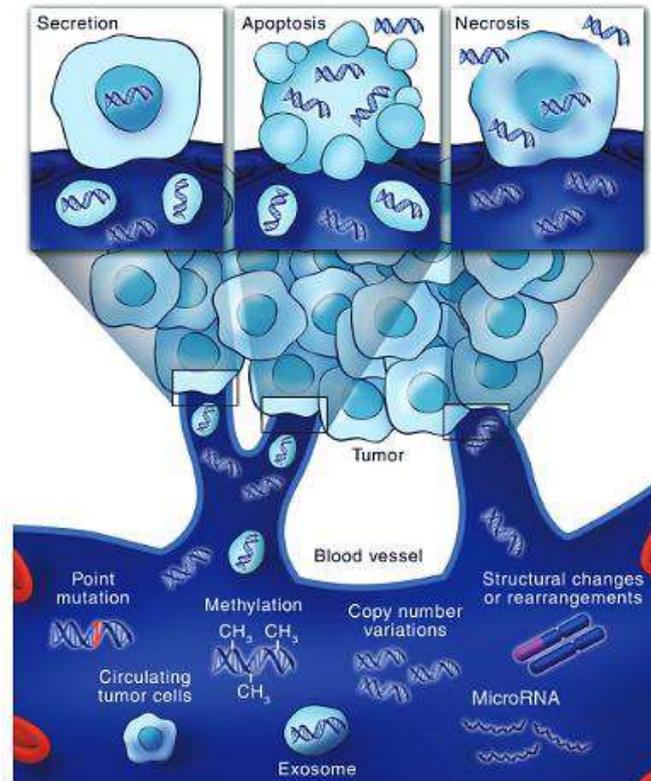


Figure 11 : Schéma simplifié de la circulation de l'ADN tumoral. D'après Hédan *et al.*, 2022. [83]

b) L'ADN tumoral circulant ou ctDNA

L'ADN tumoral circulant ou *ctDNA* ou **ADNct** peut être relâché par la **tumeur primaire**, les **cellules tumorales circulantes** se détachant de cette tumeur et circulant dans le sang, ou par des micro- ou macro-métastases [85]. Il est dilué dans l'ADN circulant (*cfDNA*) issu des cellules saines, et représente en général moins de 1% de l'ADN circulant total [93]. Les fragments d'ADN tumoraux sont souvent plus courts que le reste des fragments d'ADN, issus des cellules saines. Leur taille varie selon le type histologique de la tumeur, le stade clinique et la charge tumorale à un instant donné [83].

Pour identifier l'ADN tumoral au sein de l'ADN circulant, plusieurs altérations génétiques vont être recherchées (Figure 12) : des **mutations ponctuelles** de gènes suppresseurs de tumeur ou d'oncogènes (substitution, insertion ou délétion d'un ou plusieurs nucléotides ; STR : *Short Tandem Repeats* : répétition d'un nombre limité de base en tandem, ou SNP : *Single Nucleotide Polymorphism* : polymorphisme d'un seul nucléotide), **réarrangements** chromosomiques (délétion, duplication, inversion ou translocation de segments chromosomiques), **variation du nombre de copies** d'un gène (amplification en cas d'augmentation), **aneuploïdie** (nombre anormal de chromosomes), **épigénétique** (dont en particulier le degré de méthylation). Il est à noter que le profil de méthylation du ctDNA permettrait, avec d'autres paramètres, de déterminer le tissu d'origine de l'ADN. Une modification fréquente de l'ADN tumoral va consister en la perte de matériel génétique, appelée perte d'**hétérozygotie**, retrouvée aussi bien dans le plasma que dans la tumeur primaire. Une autre modification fréquemment recherchée, en particulier ces dernières années, est la **perte d'intégrité des séquences non codantes** de l'ADN génomique, telles que les LINE (*Long Interspersed Nuclear Elements* : éléments nucléaires dispersés longs) [81], [86], [87].



**Figure 12 : Altérations génétiques détectables dans l'ADN tumoral circulant.
D'après Diaz *et al.*, 2014.**

Les cellules tumorales libèrent de petits fragments d'ADN dans la circulation par de multiples mécanismes. Les altérations génétiques associées au cancer, telles que les mutations ponctuelles, les variations du nombre de copies, les réarrangements chromosomiques et les profils de méthylation, peuvent être détectées dans l'ADN circulant. [86]

L'intégrité des **séquences LINE-1** est par exemple touchée lors de leur **hypométhylation**, rencontrée dans les cancers du sein chez l'homme mais également dans les tumeurs mammaires chez les chiens (*cf.* 2.2, [44]).

Pour identifier les altérations génétiques de l'ADN tumoral, il est nécessaire d'avoir des techniques de séquençage de **haute précision et haute sensibilité**, étant donné que les fragments ciblés sont dilués dans l'ensemble de l'ADN circulant. Le développement du **séquençage nouvelle génération (NGS : Next Generation Sequencing**, comme le séquençage par synthèse chez Illumina ou la technologie Nanopore) a été déterminant pour cela, permettant d'analyser simultanément des millions de fragments d'ADN et donc de détecter les modifications génétiques en cause dans les processus tumoraux. Parallèlement, des études **GWAS (Genome Wide Association Study** : étude d'association pangénomique, comparant le génome d'individus sains et affectés pour identifier les mutations prédisposantes non somatiques d'une affection donnée) ont permis de préciser les altérations génétiques potentiellement en cause dans les pathologies étudiées [19].

Une fois que l'altération génétique en cause est identifiée, il s'agit de la détecter dans un liquide biologique, en isolant l'ADN circulant et en particulier l'ADN tumoral. Pour cela, les techniques de séquençage de nouvelle génération sont également utilisées, avec également des méthodes innovantes d'amplification et de quantification des altérations génétiques, entre autres :

- **ddPCR : droplet digital PCR** : l'échantillon d'ADN initial est réparti dans des puits sous forme de gouttelettes (émulsion lipidique), assurant la présence d'une copie de la molécule matrice dans chaque puits au maximum. Une PCR est effectuée dans chaque puits/gouttelette, amplifiant chaque molécule d'ADN de façon à pouvoir quantifier sa présence par la suite, par fluorescence. Les puits/gouttelettes positifs/négatifs sont ensuite comptés, et la fréquence de l'allèle mutant est ainsi déterminée (cf. 2.4.2) [84].
- **BEAMing : Beads, emulsion, amplification and magnetics** : une PCR est réalisée sur une émulsion comme pour la ddPCR, cela produit des amplicons accrochés à des billes magnétiques. Ces billes sont séparées magnétiquement, puis une hybridation fluorescente spécifique de l'allèle recherché est faite sur les billes, pour enfin lire les résultats par cytométrie de flux [84].
- **SafeSeqs : safe sequencing system** : double PCR, où chaque molécule de l'ADN matrice est marquée différemment à chaque étape, ce qui permet ensuite de distinguer les erreurs techniques des vraies mutations rares et de corriger les biais d'amplification de la PCR classique [83], [84], [94].
- **iDES : Integrated digital Error Suppression** : méthode qui permet de limiter au maximum les artefacts apparaissant dans les données de séquençage de l'ADN circulant et d'optimiser le rendement de récupération de ces molécules d'ADN circulant par hybridation [83], [84], [95].
- **Tam Seq : Tagged-amplicon deep sequencing** : permet de détecter des mutations présentes au-delà d'une fréquence de 1% dans le génome. Cette méthode de séquençage du génome entier, avec formation d'une librairie d'ADN circulant, permet aussi d'identifier des altérations génétiques sans connaissance préalable des mutations clés de la tumeur [83], [96].
- **CAPP-Seq : Cancer personalized Profiling by Deep Sequencing** : permet un séquençage en profondeur avec traitement bio-informatique des données et une quantification très sensible de l'ADN tumoral circulant, avec un seuil de détection limite de 0,2% [83], [95].
- **DREAMing : Discrimination of Rare EpiAlleles by MELT** : détecte les variants méthylés par analyse de la courbe de fusion de la PCR (courbe permettant de vérifier la spécificité de la PCR, *i.e.* qu'il n'y a qu'un seul variant amplifié), avec une grande sensibilité, le seuil étant de 0,005% de variant méthylé parmi les allèles non méthylés en excès [83].

Exemple :

Une étude menée par Flory *et al.* publiée en 2022 fait ainsi part d'un essai mené sur **plus de 1000 chiens**, consistant à réaliser des **biopsies liquides** pour séquencer l'**ADN circulant** et détecter la présence d'altérations génétiques signant la présence de certains cancers canins. Il s'agit de l'étude de détection des cancers chez le chien, **CANDiD** (*CANcer Detection in Dogs*), un des premiers tests de diagnostic précoce multi-cancer (**MCED** : *Multi-Cancer Early Detection*) utilisant une technique de séquençage nouvelle génération (**NGS**). Ainsi, ce test s'avère avoir une sensibilité de 54,7% et une spécificité de 98,5%, avec un taux de détection de 85,4% pour trois des cancers les plus agressifs (**lymphome, hémangiosarcome, ostéosarcome**) et de 61,9% pour huit des cancers canins les plus

fréquents (les trois déjà cités ainsi que le sarcome des tissus mous, le mastocytome, le carcinome mammaire, l'adénocarcinome du sac anal et le mélanome malin). De plus, le cancer a été **déecté, avant l'apparition des signes cliniques**, par le biais des altérations génétiques, chez quatre individus. Ces résultats sont donc très prometteurs pour une solution de détection précoce du cancer chez les chiens par la technique non invasive de la biopsie liquide [3].

B) Cellules tumorales circulantes

Les **cellules tumorales circulantes (CTCs)** sont issues d'une **tumeur solide primaire ou secondaire** ; elles ont perdu leur capacité d'adhérence (*i.e.* elles ont une expression réduite de marqueurs épithéliaux notamment les molécules d'adhésion et ont subi une transition de cellule épithéliale à cellule mésenchymateuse [85]), autorisant ainsi leur circulation dans le sang. On estime que parmi 10^6 à 10^7 leucocytes circulants, seule une CTC est présente, ce qui nécessite des **techniques d'enrichissement, d'isolement et de détection très sensibles** pour analyser ces cellules. Les techniques d'enrichissement sont basées sur leurs propriétés biologiques (marqueurs de surface cellulaire) et / ou physiques (taille, densité, déformabilité, ou charges électriques). Leur détection se fait grâce à des tests utilisant des techniques immunologiques, moléculaires (RT-PCR pour la détection de l'ARN spécifique des CTCs), ou fonctionnelles (cultures ou lignées cellulaires, ou xénotreffes permettant de tester la sensibilité aux médicaments sur des modèles *in vivo* ou *in vitro* ; techniques de moins en moins utilisées aujourd'hui) [81], [85].

En médecine **humaine**, **seule une méthode** pour identifier, isoler et dénombrer les CTCs a été **approuvée par la FDA** en 2004 : elle inclut une étape d'enrichissement suivie d'une identification basée à la fois sur une utilisation d'anticorps spécifiques et des techniques d'imagerie de haute résolution. Ainsi, le phénotype recherché pour identifier les CTCs est : EpCAM+ (*Epithelial Cell Adhesion Molecule* : molécule d'adhésion des cellules épithéliales) / CK+ (*Cytokeratins* : cytokératines) / DAPI+ (40,6-diamidino-2-phenylindole) / CD45- (Cluster de Différenciation 45). La plupart des études en oncologie humaine ont donc été menées avec cette méthode ; **chez les chiens, la RT-PCR a été le plus souvent utilisée pour détecter les ARNm spécifiquement exprimés par les CTCs** dans le sang. Par exemple, parmi les seize ARNm marqueurs des CTCs dans le cancer du sein, six sont surexprimés dans le sang des chiennes présentant un carcinome mammaire, et aucun ne l'est chez les chiennes saines, tels que les produits de **CRYAB et ATP8B1** (cf. 2.3, [52], [53], [81]). Cela permet de détecter les CTCs et donc de suivre le potentiel métastatique des carcinomes mammaires chez ces chiennes.

La méthode approuvée par la FDA a cependant été récemment testée chez les chiennes (Marconto *et al.*, 2019). Ainsi, les **CTCs de phénotype EpCAM+/CK+/DAPI+/CD45-** ont été identifiées dans le sang de **chiennes** ayant un **carcinome mammaire métastaté** avec une sensibilité de 44% ; leur présence serait de plus corrélée à un impact négatif sur le pronostic [81], [97].

D'autres techniques sont en développement, comme la cytométrie de flux pour détecter les CTCs par marquage du collagène I et de l'ostéocalcine (biomarqueur de la minéralisation osseuse), chez des chiens atteints d'ostéosarcome. Ainsi, selon Wright *et al.* en 2019, les CTCs ont considérablement diminuées dans le sang après amputation du membre atteint de l'ostéosarcome, et une augmentation a été observée quatre semaines avant la mise en évidence de métastases et/ou la mort du patient. Les CTCs pourraient donc servir de biomarqueurs de suivi de l'évolution de la maladie pour l'ostéosarcome canin [81], [98].

L'analyse des CTCs peut remplacer ou compléter l'analyse de l'ADNct. En effet, l'ADNct peut être issu des CTCs, et les CTCs apportent une information supplémentaire grâce à l'analyse des marqueurs de surface cellulaire (permettant de phénotyper les cellules concernées) en plus de l'analyse de l'information génomique (Tableau III) [80], [87].

Tableau III : Comparaison des avantages et inconvénients de l'analyse de l'ADN tumoral circulant (ADNct) par rapport aux cellules tumorales circulantes (CTCs) (réalisation personnelle).

	AVANTAGES [80]	INCONVENIENTS [80]
ADNct  [99]	<ul style="list-style-type: none"> - Fragments d'ADNct 50 fois plus nombreux que les CTCs dans le sang (si les deux sont présents) : quantité absolue plus importante  Délai d'analyse pouvant aller jusqu'à 5 jours si sang prélevé sur stabilisant 	<ul style="list-style-type: none"> - Dilution très importante de l'ADNct dans l'ADN libre circulant relâché par les cellules hématopoïétiques → quantité très faible de fragments mutés  - Seule l'information génomique est analysée
CTCs  [99]	<ul style="list-style-type: none"> -CTCs plus nombreuses parmi les cellules circulantes que l'ADNct parmi l'ADN libre circulant : quantité relative plus importante (ensemble cellules circulantes vs ensemble ADN circulant) -Plus d'informations : analyse des marqueurs cellulaires ET de l'information génétique contenue dans la cellule (protéines, ARN, génome) [80], [85]  	<ul style="list-style-type: none"> - CTCs 50 fois moins nombreuses dans le sang que les fragments d'ADNct - Nécessité d'analyser les CTCs dans la demi-journée suivant leur prélèvement 

Les CTCs peuvent être utilisées comme biomarqueurs pour les différentes catégories fonctionnelles décrites ci-dessus : **diagnostic précoce** du cancer, **pronostic** (rechute ou généralisation du cancer du sein ou de la prostate en oncologie humaine), identification de **cibles thérapeutiques** ou de mécanismes de **résistance** (par exemple, utilisation de thérapies hormonales pour les carcinomes mammaires ou le cancer de la prostate), **suivi** en temps réel de la **réponse au traitement** (comme la surveillance des résultats de la chimiothérapie chez des patients atteints d'un cancer du sein métastasé) [85]. Ce sont donc de potentiels biomarqueurs **dynamiques**, qui évoluent avec l'avancée du cancer.

Les CTCs ne sont **pas toujours le reflet génétique des cellules cancéreuses** retrouvées dans la tumeur solide, des essais doivent donc être rigoureusement menés avant de conclure à une corrélation entre un profil génétique et protéique d'une cellule circulante et la nature de la tumeur primaire [80].

Un autre type de cellules qu'il est intéressant d'étudier dans le cadre des biomarqueurs en oncologie correspond aux **cellules tumorales disséminées dans la moelle osseuse** (ou **DTCs** : *Disseminated Tumour Cells*). L'ADN tumoral circulant peut aussi être issu de l'apoptose ou la nécrose de ces cellules dans la moelle osseuse. Des recherches doivent encore être conduites pour éprouver leur utilité en tant que biomarqueur en oncologie, aussi bien humaine que vétérinaire [81], [87].

C) Micro-ARN circulants et autres ARN

Tout comme les fragments d'ADN, les ARN circulent aussi dans le sang et sont de potentiels biomarqueurs en oncologie. Aussi appelé **transcriptome**, l'ensemble des ARN regroupe les **ARN codants** (ou ARN messenger ou ARNm, 1 à 4% du transcriptome) et les **ARN non codants**, représentant plus de 95% du transcriptome : ARN ribosomal, de transfert, nucléaire, interférent, micro-ARN (miARN), ARN longs non codants. L'**ARNm** a été le premier type d'ARN à être étudié en profondeur ; il permet de quantifier l'absence ou la présence d'un transcrit, de prédire les isoformes protéiques qui vont être formées [19], [81].

Le **micro-ARN (miARN)** s'avère, lui, être le principal type d'ARN circulant dans le sang. Il agit comme régulateur post-transcriptionnel, sur la base d'une complémentarité partielle ou complète avec l'ARNm correspondant. En cancérologie, les micro-ARN jouent un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération, la différenciation et la mort cellulaires. Ils peuvent être **suppresseurs de tumeurs ou au contraire oncogènes**. Ainsi, les profils d'expression des miARN sont différents selon les cellules, et peuvent donc permettre de faire la distinction entre des individus atteints de cancer et des individus sains. Ces miARN peuvent être relâchés directement dans les fluides corporels par les cellules, ou bien ils peuvent se retrouver dans de petites vésicules extracellulaires d'environ 100 nm de diamètre, les exosomes [19], [81].

Exemples :

- Pour reprendre l'exemple cité dans les paragraphes 2.22.4 dans le cadre des **carcinomes mammaires** chez les chiennes, les **miARN 19b, 21 et 29b** sont surexprimés dans le sérum des chiennes atteintes de cancer et ont donc une valeur diagnostique, tandis que la surexpression du **miARN 18a** dans le sérum a une valeur pronostique (concentration plus élevée pour le grade III, le plus avancé) [26]–[29], [71].
- Concernant des miARN provenant **d'exosomes**, beaucoup d'études ont porté leur attention sur les **miARN 214 et 126**. Ils sont connus comme ayant un rôle dans l'angiogénèse et la tumorigénèse. Leur expression serait augmentée dans le sang de chiens ayant un **hémangiosarcome** par rapport à des chiens sains ; et cette expression diminue significativement après exérèse chirurgicale de l'hémangiosarcome [81], [100]. De la même façon, leur expression est augmentée dans le sérum de chiennes atteintes de **carcinome mammaire** [36], [37]. De plus, dans le cas des **ostéosarcomes** canins, la concentration élevée de miARN 214 serait associée à une durée de survie plus courte tandis qu'une concentration augmentée de miARN 126 serait associée à une durée de survie plus longue et à une plus longue rémission après amputation du membre atteint et chimiothérapie adjuvante [66], [81].

Dans l'utilisation diagnostique des miARN en oncologie, une **limite majeure** à prendre en compte est le potentiel **manque de spécificité des miARN**. En effet, parfois certains miARN ne permettent pas de distinguer une tumeur d'une inflammation d'un organe, comme par exemple le miARN 122 dont la surexpression dans le sang permet d'affirmer qu'il y a une « maladie » hépatique, sans pouvoir préciser s'il s'agit d'un **processus inflammatoire, néoplasique ou fibrosant** [81], [101]. Dans tous les cas, les miARN permettent d'avoir une information **précoce** sur la santé d'un organe.

Par ailleurs, l'analyse des ARN circulants doit se faire avec encore plus de précautions que lors de l'analyse de l'ADN circulant. En effet, **l'ARN est plus instable** en raison de sa nature simple brin, et il est donc plus sujet à des dégradations par oxydation, trans-estérification ou par **contamination** avec des RNAses. De plus, en raison de l'hétérogénéité des échantillons recueillis en clinique, notamment liée à des changements physiologiques, de **grands volumes de liquides** biologiques sont nécessaires afin de détecter avec une **bonne sensibilité** les variations d'expression liées à un processus tumoral [19]. Des volumes importants peuvent aussi permettre de lisser les différences de rendement d'extraction d'ARN d'un échantillon à l'autre et d'assurer ainsi la **reproductibilité** des manipulations [87].

D) Protéines circulantes

Les protéines sont l'aboutissement de la traduction et transcription du code génétique. Ce sont les acteurs principaux de la réalisation des fonctions biochimiques et métaboliques nécessaires à la survie des cellules et des tissus. Ils reflètent les **états physiologiques variés** des cellules mais aussi leur **réponse à la maladie**. Les technologies développées dans le domaine de la **protéomique**, *i.e.* la **spectrométrie de masse**, permettent de dresser les profils protéiques (ou protéomes, ensemble de protéines) de cellules, tissus ou fluides spécifiques. De nombreuses avancées ces dernières années ont permis de combiner plusieurs techniques et d'améliorer la sensibilité et spécificité de la spectrométrie de masse. En parallèle, les méthodes avec **anticorps** sont souvent plus accessibles lors de la recherche d'une protéine spécifique, déjà identifiée comme biomarqueur.

Comme illustré dans la partie 2, de nombreuses protéines ont déjà été étudiées en oncologie vétérinaire comme biomarqueurs de diagnostic, pour le suivi d'une maladie ou à valeur pronostique : les protéines **CEA et CA 15-3, LDH, CRP, TK1**. Selon Ployptech *et al.*, les **peptidomes sériques** peuvent servir de biomarqueur de suivi de la maladie avec prédiction d'apparition de métastases pour deux **tumeurs buccales** : le mélanome buccal à stade avancé et le carcinome épidermoïde buccal à stade avancé [55]. Concernant ces tumeurs, il est intéressant de noter qu'une étude a été menée sur le **protéome salivaire**, révélant de potentiels biomarqueurs pronostiques ou de suivi de la maladie, identifiables dans la salive des chiens atteints [102]. De la même façon, les variations observées dans les **protéomes sérique et salivaire** de chiennes présentant un **carcinome mammaire** par rapport à des individus sains constitue une piste prometteuse pour de nouveaux biomarqueurs de ce cancer [103]. L'avantage des **biomarqueurs salivaires** est leur caractère **non invasif**, contrairement au sérum qui nécessite une prise de sang. Les **biomarqueurs urinaires** sont également intéressants car non-invasifs, ils ont été en particulier explorés chez les carcinomes mammaires canins : il s'agit notamment des métabolites de la tyrosine et du tryptophane. Ces métabolites sont inclus alors non plus dans le protéome, mais dans le métabolome, c'est-à-dire toutes les molécules issues des processus biochimiques basés sur les différentes protéines (enzymes, récepteurs, et autre machinerie cellulaire) [19], [36], [104].

E) Autres biomarqueurs circulants

D'autres types de biomarqueurs circulants semblent être des pistes intéressantes en oncologie vétérinaire, bien que peu d'études aient été menées sur des cohortes animales ; il existe davantage d'études en médecine humaine, bien que ces biomarqueurs ne soient pas encore approuvés sur le marché.

Les **ions** pourraient ainsi être des biomarqueurs diagnostiques, pronostiques ou prédictifs d'une réponse à un traitement. L'ion cuivre (Cu^{2+}) serait impliqué dans la tumorigénèse, l'angiogénèse, la migration de cellules tumorales et la formation de métastases. Sa concentration sérique serait significativement **augmentée** chez les chiennes atteintes de carcinome mammaire par rapport à des chiennes saines. À l'inverse, l'ion zinc (Zn^{2+}) voit sa concentration sérique **diminuer** chez les individus atteints de carcinome mammaire comparés aux individus sains. Cela pourrait indiquer un potentiel bénéfique thérapeutique à apporter une supplémentation en zinc pour ces animaux [81].

D'autre part, l'épigénétique et les activités enzymatiques ont déjà été évoquées ci-dessus comme potentiels biomarqueurs en cancérologie. Dans ces mêmes domaines, l'intérêt de l'évaluation des télomères (régions hautement répétitives et non codantes à l'extrémité des chromosomes) peut également être mentionné. En effet, **l'activité des télomérases**, enzymes (ADN polymérases) régénérant les télomères à chaque division, est **augmentée** chez des individus cancéreux comparés à des individus sains. Cela explique la capacité de divisions illimitées des cellules cancéreuses et la croissance rapide et incontrôlée des tumeurs. Cibler les télomères pourrait donc permettre de forcer les cellules cancéreuses à rentrer en sénescence et à stopper leur prolifération [105], [106].

Enfin, des **biomarqueurs synthétiques circulants** dans les liquides biologiques sont **en cours de développement**, et permettront certainement dans le futur de diagnostiquer des cancers, potentiellement précocément, en oncologie humaine et vétérinaire. Ces biomarqueurs synthétiques peuvent être des **substrats peptidiques des protéases tumorales** dérégulées, associés à un support biocompatible (comme des nanoparticules d'oxyde de fer, du polyéthylène glycol ou des nanomères d'oxyde de fer) et à un **rapporteur clivable** par les protéases tumorales (par exemple, des peptides fluorescents) ; il peut également s'agir de **sondes comprenant un site de reconnaissance enzymatique** (pour des **enzymes associées à la tumeur**), lié à un **rapporteur clivable** (tel que des composés organiques volatils ou des marqueurs isotopiques stables). Après administration systémique des substrats peptidiques ou des sondes, les protéases ou autres enzymes associées à la tumeur vont cliver les rapporteurs. Selon la nature des ces derniers, ils seront **détectables notamment dans les urines, le plasma, ou l'haleine** (pour les composés organiques volatils). Une dernière catégorie de biomarqueurs synthétiques est décrite : les **cellules ou bactéries génétiquement programmées** pour **sécréter**, si elles sont dans un environnement tumoral, des **rapporteurs** détectables dans le sang [107].

3.2. Biomarqueurs tissulaires

3.2.1. Biomarqueurs histopathologiques ou immunohistochimiques

A) Biomarqueurs histologiques

De nombreux critères, déjà utilisés depuis plusieurs années dans différents cancers, existent pour donner des informations diagnostiques ou pronostiques (stades clinique et histologique), à partir de **biopsie de la tumeur elle-même**. L'un des plus documentés est de nouveau le carcinome mammaire chez les chiennes. Le **stade clinique** d'un carcinome mammaire, estimant l'extension du cancer dans l'organisme, se décrit sur la base du **système TNM** (Tableau IV) :

- T: taille tumorale (bilan d'extension locale)
- N: métastase ganglionnaire (bilan d'extension régionale)
- M: métastase à distance (bilan d'extension à distance) [108].

Tableau IV : Stade clinique des carcinomes mammaires canins. D'après Nguyen, 2021.

Stade	T	N	M
I	T1: < 3 cm	N0	M0
II	T2: 3–5 cm	N0	M0
III	T3: > 5 cm	N0	M0
IV	Tout T	N1 (N+)	M0
V	Tout T	Tout N	M1

[101]

Le **grade histologique** peut également permettre de donner des informations sur l'agressivité de la tumeur et donc son **pronostic**. Pour les carcinomes mammaires canins, le grade histologique d'Elston et Ellis se base sur trois critères : la formation de tubes, l'importance du pléomorphisme nucléaire, l'index mitotique. **D'autres critères histopathologiques** viennent préciser ces informations, comme la taille tumorale pathologique, l'invasion lymphovasculaire, le stade ganglionnaire pathologique [36], [108].

Beaucoup d'autres éléments peuvent également être détectés directement dans le tissu tumoral, comme c'est le cas dans une biopsie liquide (cf. ci-dessus) : profils d'expression de certains gènes, protéines, micro ARN [36], [104], [108]. L'**Annexe 1** rassemble plusieurs biomarqueurs des **carcinomes mammaires canins**, analysables dans le tissu tumoral ou dans les fluides biologiques [36].

De la même façon, l'**Annexe 2** regroupe de nombreux biomarqueurs tissulaires des **ostéosarcomes canins** : récepteurs protéiques, cellules avec marqueurs de surface particuliers, micro ARN, cytokines [66].

Enfin, des informations apportées par **l'immunohistochimie** servent également de biomarqueurs : index de prolifération Ki67, protéine p53, récepteurs HER2, EGFR, ER (récepteur aux estrogènes), PR (récepteur à la progestérone), cytokératines 5 et 6 [36], [104], [108]. La technique d'immunohistochimie est décrite ci-après.

B) Biomarqueurs immunohistochimiques

L'immunohistochimie est une technique communément employée pour la détection de biomarqueurs en cancérologie. Cela permet **d'identifier le type et l'origine des cellules**, d'estimer leur morphologie et la morphologie globale du tissu. Aujourd'hui, des lames histologiques peuvent être **scannées en routine** pour être **analysées** par des logiciels de haute performance, contenant des algorithmes capables de **quantifier** les biomarqueurs d'intérêt. Les lames et leurs résultats sont ainsi numérisés et rapidement accessibles, tout en garantissant une bonne **reproductibilité** des analyses (Figure 13) [36], [109].

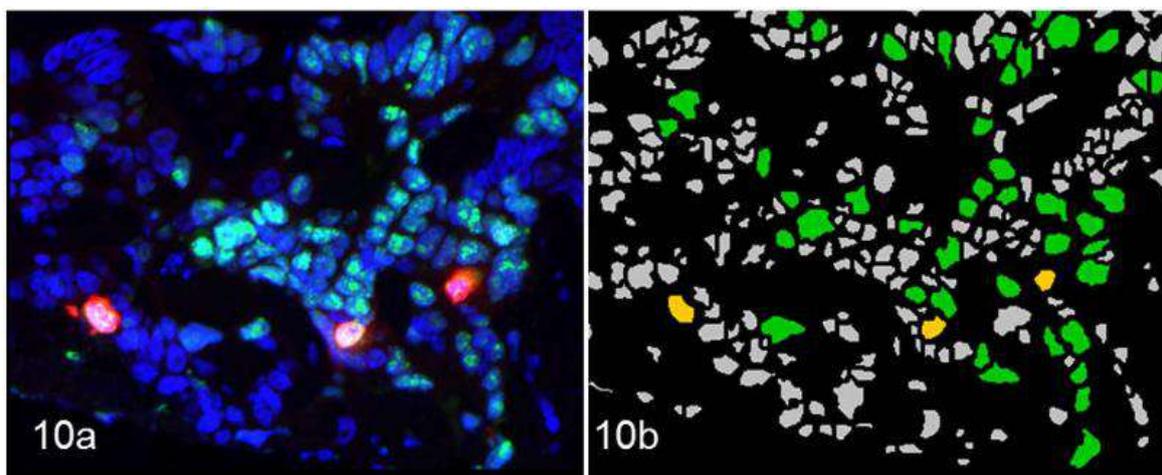


Figure 13 : Analyse de biomarqueurs pharmacodynamiques sur des biopsies de tumeurs humaines, basée sur le logiciel MetaMorph. D'après Schinde *et al.*, 2014.

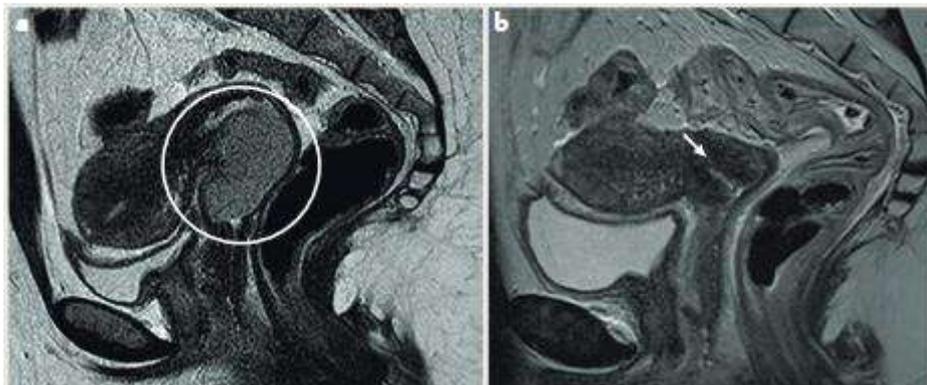
(10a) Biopsie d'une tumeur humaine, colorée par une double méthode d'immunofluorescence : Ki67 (vert) et pH3 (rouge). (10b) Superposition d'analyse d'images de la figure 10a : noyaux (gris), cellules Ki67-positives (vertes) et cellules Ki67- et pH3-positives combinées (jaunes).[109]

Ces biomarqueurs rejoignent d'autres marqueurs décrits ci-dessus, notamment les protéines de surface cellulaire ou cytoplasmiques, l'idée est ici de mettre en avant les progrès des technologies actuelles pour la détection de ce type de biomarqueurs.

3.2.2. Biomarqueurs tissulaires en imagerie médicale

Les biomarqueurs d'imagerie médicale sont aujourd'hui intégrés à la **routine** de gestion des patients cancéreux, notamment pour déterminer le **stade TNM**, identifier la présence de **métastases** ou d'un foyer primaire (Figure 14), estimer **l'efficacité d'un traitement** anticancéreux ou ses complications. Ce sont des outils assez peu coûteux, peu invasifs, et souvent facilement accessibles. Ils permettent de voir **l'hétérogénéité** tissulaire au sein d'une tumeur, ou bien les **lésions** entraînées par la tumeur elle-même sur les autres organes. Ils apportent également une plus-value aux travaux de recherche clinique, permettant une approbation réglementaire rapide de nouveaux médicaments. Une **cartographie de l'état de la tumeur** dans l'organisme peut en effet être obtenue, par injection d'un isotope radioactif, de fructose par exemple, dans le sang, qui va venir se fixer sur les cellules cancéreuses, plus consommatrices en énergie que les cellules saines. La réponse au traitement et son efficacité sont donc décelables quasiment en instantané (Figure 14). Les **thérapies peuvent aussi être ajustées** grâce à des biomarqueurs d'imagerie : adaptation des marges de la zone de délivrance des rayons de radiothérapie, élargissement des marges d'exérèse chirurgicale de la tumeur [110].

Pour améliorer l'efficacité des techniques de diagnostic clinique non invasives, une piste intéressante en recherche est l'élaboration **d'algorithmes combinant plusieurs examens d'échographie** avec la détection de biomarqueurs spécifiques. Cela permettrait notamment de distinguer les tumeurs mammaires canines bénignes des malignes [36].



[110]

Figure 14 : (a) Une femme atteinte d'un cancer du col de l'utérus présentait une tumeur primaire volumineuse au départ, mais (b) a présenté une réponse complète et une reconstitution du col de l'utérus à la suite d'un traitement par chimio-radiothérapie. D'après O'Connor *et al.*, 2017.

Les biomarqueurs tissulaires ne seront pas davantage détaillés ici, l'objet de cette thèse portant sur des biopsies liquides. La **Figure 15** ci-dessous permet de replacer rapidement les avantages des techniques traditionnelles de biopsie tissulaire utilisées largement aujourd'hui en oncologie vétérinaire, en regard des bénéfices non négligeables apportés par les biopsies liquides.

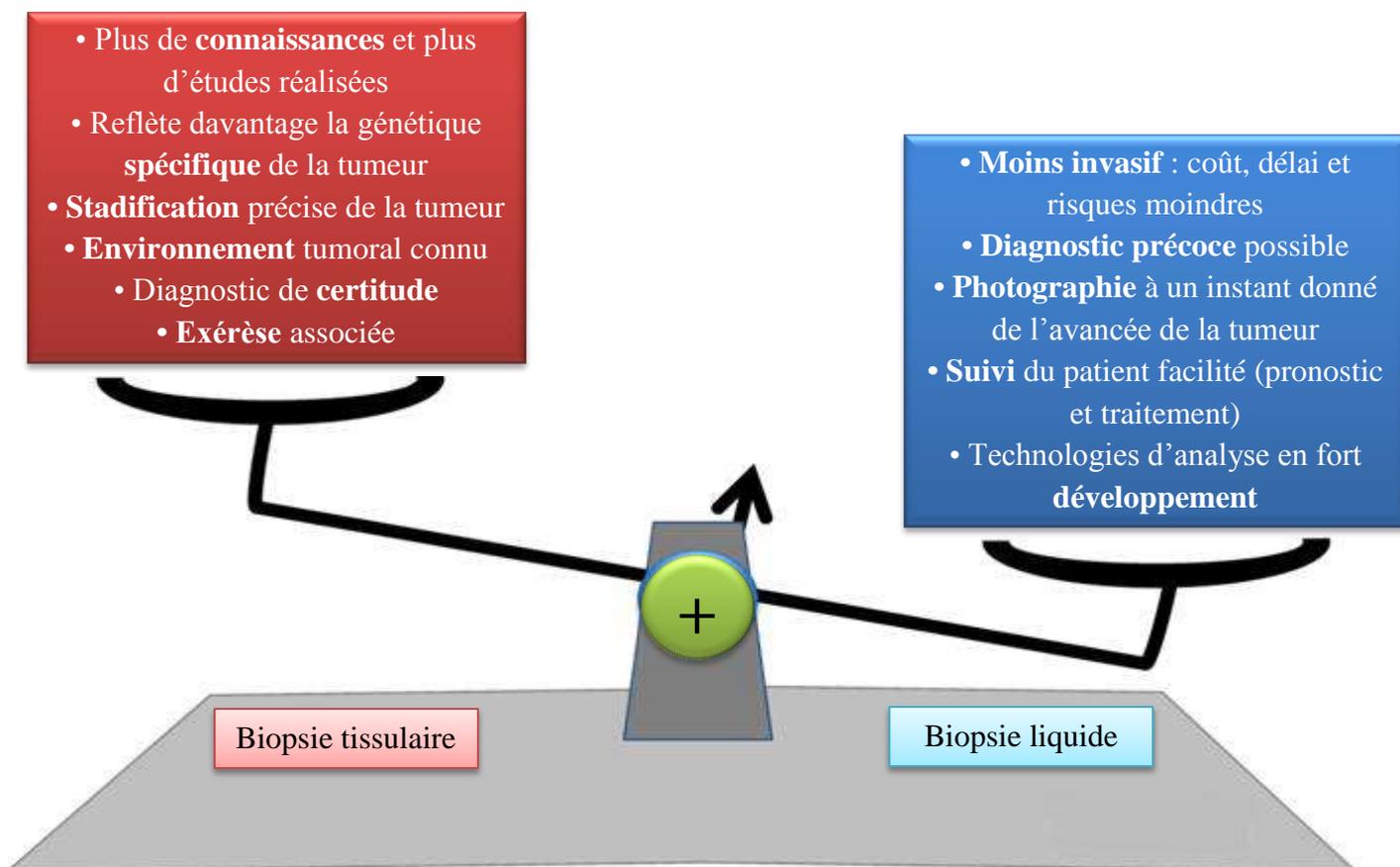
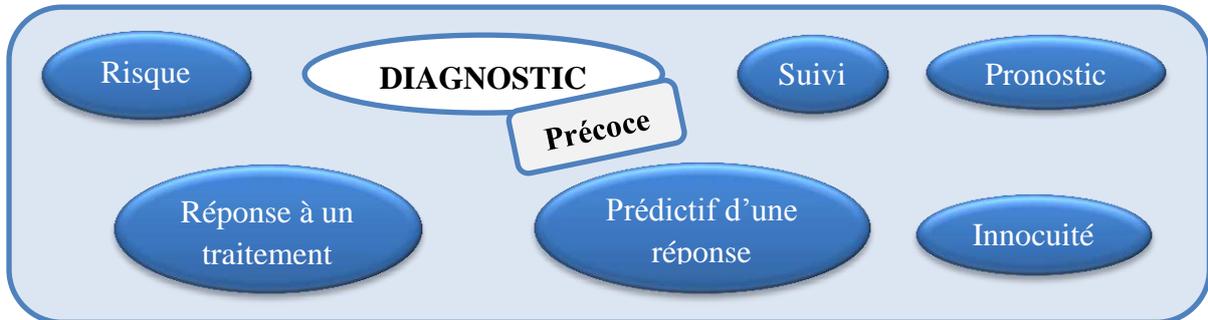


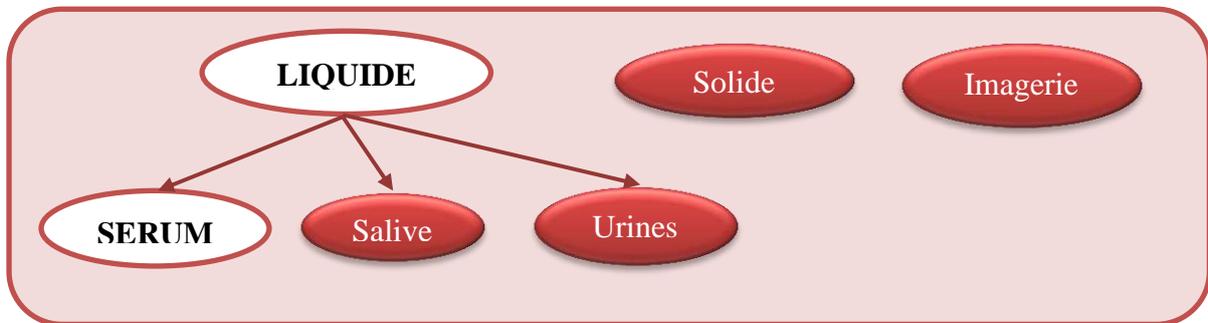
Figure 15 : Comparaison des avantages de la biopsie liquide et de la biopsie tissulaire en oncologie vétérinaire (réalisation personnelle).

BILAN

CATEGORIES FONCTIONNELLES



TYPES DE PRELEVEMENTS



OBJETS DE RECHERCHE

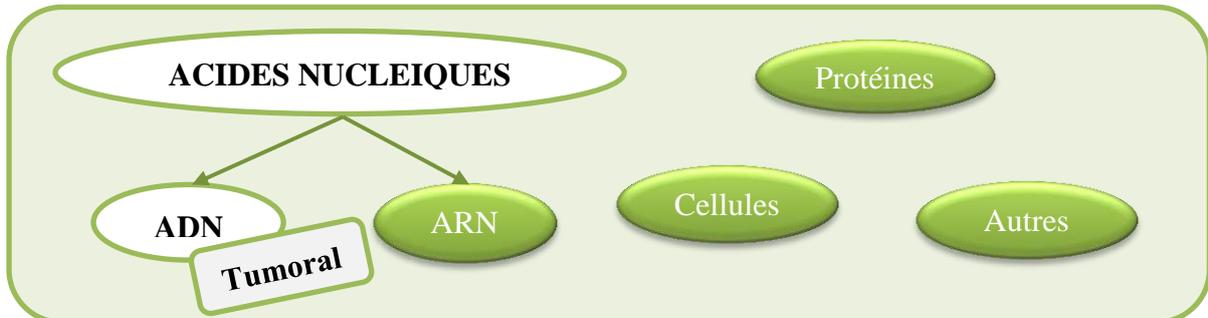


Figure 16 : Résumé des différentes classifications des biomarqueurs en cancérologie ; les écritures sur fond blanc sont l'objet de ce travail de thèse : une mutation de l'ADN tumoral, détectée dans le sérum pour un diagnostic précoce d'un cancer (réalisation personnelle).

Partie 2 : Étude des biomarqueurs circulants appliquée au sarcome histiocytaire chez le Bouvier Bernois

1. Les maladies histiocytaires canines

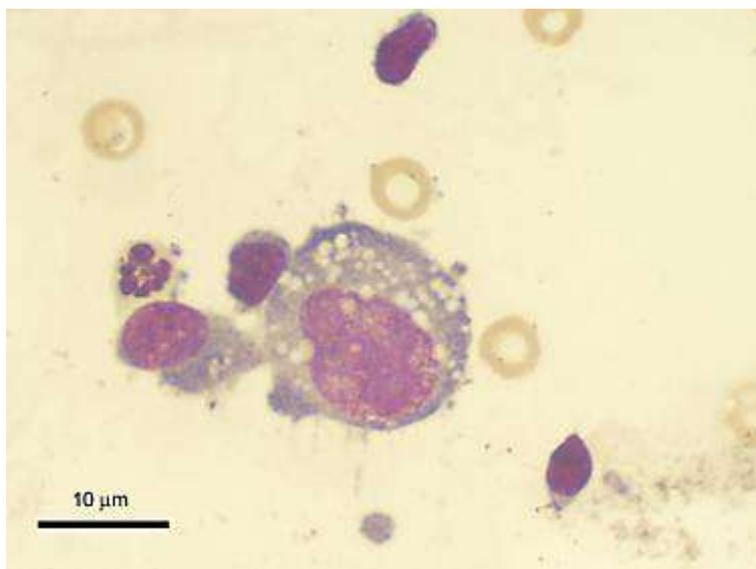
1.1. Définition et origine des lignées cellulaires histiocytaires

1.1.1. Définition et description des histiocytes

Le terme histiocyte a évolué au fil des années. Il est aujourd'hui utilisé pour décrire les cellules de la lignée des cellules dendritiques (CD) ou de la lignée des macrophages (Figure 17).

Tous les histiocytes sont issus de précurseurs de cellules souches **CD34+** et se différencient en **macrophages ou cellules présentatrices d'antigènes**, correspondant à la lignée des cellules de Langerhans ou la lignée des cellules dendritiques interstitielles [4], [111] :

- Les **macrophages** font partie du système des **phagocytes mononucléés**, dérivés des monocytes, forme circulante du macrophage dans le sang après libération par la moelle osseuse. Les monocytes viennent ensuite se localiser dans les tissus sous forme de macrophages matures. Ce sont des cellules permettant d'initier la **réaction immunitaire innée**, dont le processus inflammatoire, par la **phagocytose** de cellules étrangères à l'organisme notamment. Elles favorisent également la diapédèse d'autres cellules, venant alors s'accumuler dans le foyer inflammatoire, amplifier le phénomène et permettre la transition vers une réponse immunitaire adaptative. Les macrophages ont des noms différents selon l'organe où ils se situent : macrophages cutanés, spléniques, macrophages alvéolaires dans les poumons, cellules de Kupfer dans le foie. L'appellation histiocyte fait communément référence aux macrophages résidents du tissu conjonctif, mais ce terme est reconnu aujourd'hui comme désignant la plupart des macrophages résidents [112], [113].
- Les **cellules présentatrices d'antigènes** sont les principales cellules capables d'induire une réponse immunitaire **adaptative** spécifique par stimulation des lymphocytes T naïfs.
 - Les **cellules de Langerhans** sont présentes dans les épithéliums de la peau et des tractus digestif, respiratoire et reproducteur.
 - Les **cellules dendritiques interstitielles** sont présentes en région péri-vasculaire de nombreux organes, y compris dans le derme, à l'exception du cerveau (bien qu'elles soient présentes au niveau des méninges et des plexus choroïdes). Les cellules dendritiques présentes dans les organes lymphoïdes sont soit résidentes, soit migratrices dans les vaisseaux lymphatiques. Les cellules interdigitantes migratrices proviennent des cellules de Langerhans ou des cellules dendritiques interstitielles [4], [111], [113].



**Figure 17 : Histiocyte large et rond avec aspect vacuolaire typique.
D'après Fulmer *et al.*, 2007.**

Photographie d'une lame cytologique obtenue après cytoponction sur une masse cutanée d'un Rottweiler âgé de deux ans. La masse a été diagnostiquée comme étant un histiocytome cutané. [113]

Les différents désordres histiocytaires décrits ci-dessus impliquent donc ces cellules, notamment les cellules dendritiques. La **forme hémophagocytaire du sarcome histiocyttaire** est la seule maladie histiocyttaire pour laquelle il a été prouvé qu'elle avait pour origine les **macrophages** [4], [111], [114].

1.1.2. Différenciation et caractérisation des lignées histiocytaires : clé pour la reconnaissance et le diagnostic de certitude des sarcomes histiocytaires

Ces différentes lignées cellulaires se distinguent grâce à des **marquages en immunohistochimie** des différentes glycoprotéines membranaires ou **clusters de différenciation (CD)**. Cette différenciation se fait grâce à plusieurs cytokines et facteurs de croissance (Figure 18) :

- Pour les **cellules dendritiques**, la différenciation implique le ligand de la fms-like tyrosine kinase (**FTL3**), le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (**GM-CSF** : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), le facteur de cellules souches, le facteur de nécrose tumorale alpha (**TNF- α** : Tumor Necrosis Factor α), l'interleukine 4 (**IL-4**) et le facteur de croissance transformant bêta 1 (**TGF- β 1** : Transforming Growth Factor β 1). Les cellules de Langerhans se développent notamment grâce à la stimulation par le TGF β 1.
- Les **macrophages** se développent grâce au GM-CSF et au facteur de stimulation des colonies de macrophages (**M-CSF** : Macrophage Colony-Stimulating Factor).

Les monocytes sanguins peuvent devenir soit des macrophages sous l'influence du M-CSF, soit des cellules dendritiques sous l'influence du GM-CSF et de l'IL4 (Figure 18) [4], [111], [113].

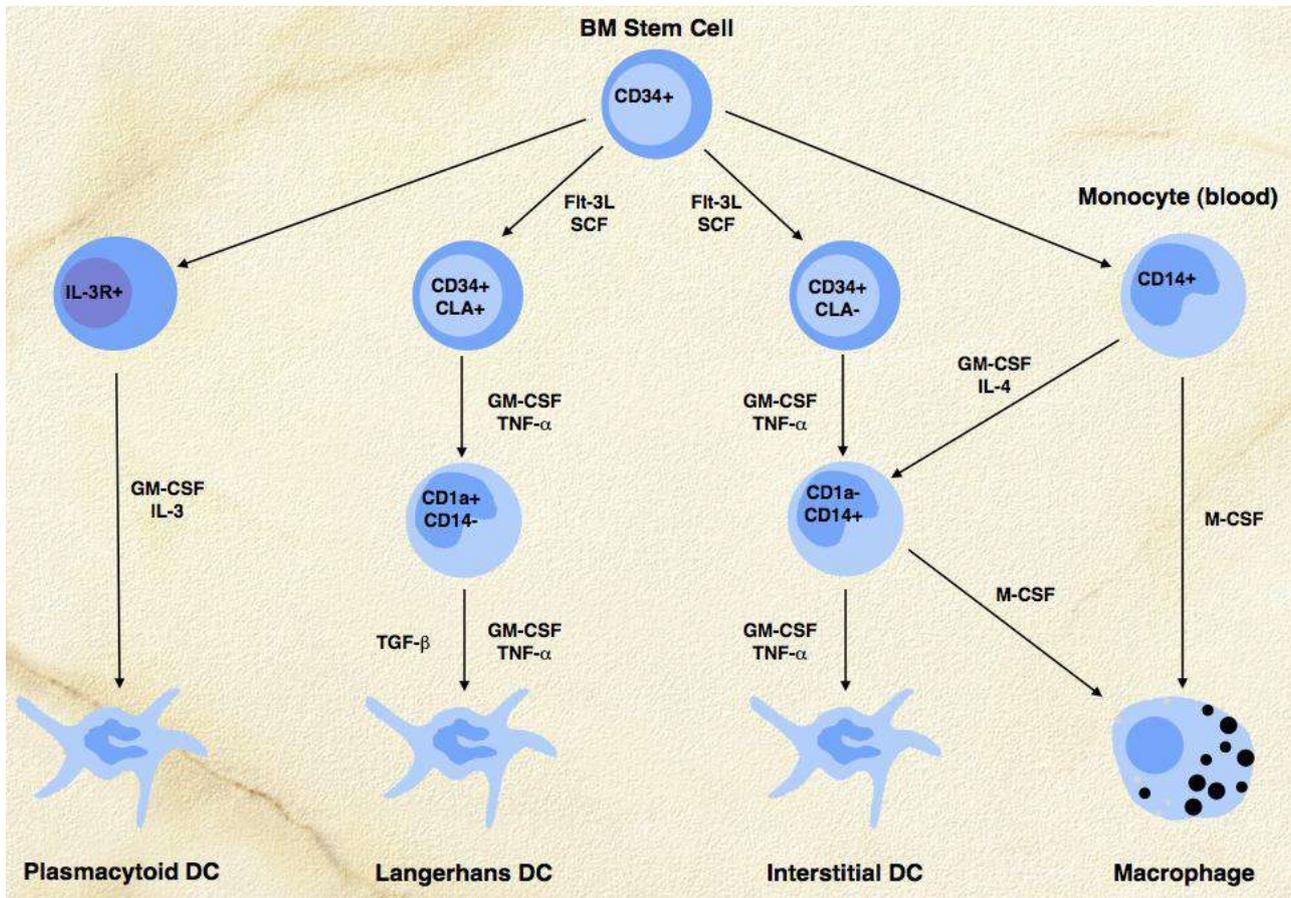


Figure 18 : Facteurs de croissance et cytokines impliqués dans la différenciation des macrophages et des cellules dendritiques. D'après Gardiner, 2019.

Les facteurs des cellules souches (SCF et Flt-3 Ligand) amplifient la différenciation histiocytaire - en particulier vers les cellules dendritiques. Le GM-CSF et le TNF- α induisent une différenciation vers les cellules dendritiques (interstitielles et de Langerhans) ; le TGF- β influence les étapes terminales de la différenciation des cellules de Langerhans. Le M-CSF induit la différenciation des macrophages. [111]

Suite à cette stimulation par différents facteurs, les cellules vont exprimer des **glycoprotéines** sur leur surface **en lien avec leur fonction**. Ainsi, les macrophages ont des récepteurs « scavenger » aussi dits récepteurs « poubelles », permettant la dégradation et l'élimination des molécules **phagocytés** : **CD163** et **CD204**. Parallèlement, les cellules dendritiques présentent des molécules nécessaires à leur fonction de cellules **présentatrices d'antigènes** : le **CMH** (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) **I et II** pour la plupart (CMH II étant régulé à la hausse par les cellules migratrices), la protéine **CD1** pour les cellules dendritiques de la peau. Une interaction défectueuse entre les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T, dans un contexte de régulation immunitaire désordonnée, peut contribuer au développement des histiocytoses réactionnelles canines (cutanée ou systémique). Concernant les sarcomes histiocytaires, que ce soit pour ceux issus de populations de cellules dendritiques ou ceux issus de macrophages, le **potentiel migratoire** de ces cellules participe considérablement à leur pronostic défavorable [4], [111], [115].

Une autre molécule intéressante pour identifier les **cellules de la lignée monocyte-macrophage** et possiblement au moins quelques cellules présentatrices d'antigènes est la protéine **Iba-1** (*Ionized calcium-binding adapter molecule 1*: molécule adaptatrice 1 se liant au calcium ionisé). Elle est impliquée dans les mouvements de la cellule et sa capacité de **phagocytose** via les réarrangements de l'actine, partie du cytosquelette. En revanche, elle **ne permet pas de distinguer incontestablement les macrophages des cellules dendritiques** présentatrices d'antigène, et donc ne peut distinguer l'origine cellulaire d'un désordre histiocytaire [116].

Il existe également des **molécules d'adhésion** fondamentales, exprimées de façon différentielle par tous les leucocytes : les **intégrines $\beta 2$ (CD11/CD18)**. Ce sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité α (CD11 a, b, c ou d) et d'une sous-unité β (CD18 aussi nommé $\beta 2$). L'expression de CD11 et CD18 est fortement régulée dans les cellules dendritiques, qui présentent le **CD11c**, et dans les macrophages, caractérisés par l'expression du **CD11b** ou le **CD11d** dans les tissus hématopoïétiques (pulpe rouge de la rate et moelle osseuse). Le **CD11a** serait, lui, présent sur tous les leucocytes [117]. De la même façon, les histiocytes de la peau (cellules de Langerhans et cellules dendritiques interstitielles dermiques) expriment d'autres molécules d'adhésion de manière différentielle : **E-cadhérine** (LCs+) et **Thy-1** (CD90) [4], [111], [113], [118], [119].

Dans les **maladies histiocytaires** canines, les intégrines $\beta 2$ sont **exprimées aussi de manière différentielle** par rapport aux cellules saines. Une forte expression de CD11c est en faveur d'un sarcome histiocytaire issu de cellules dendritiques interstitielles ; tandis qu'une expression de **CD11d** est associée à la différenciation macrophagique du **sarcome histiocytaire hémophagocytaire**. Le développement d'anticorps monoclonaux de CD11 et CD18, spécifiques de l'espèce canine ou féline, a permis de grandes avancées dans la connaissance sur les syndromes histiocytaires [4], [111].

Ainsi, lors **d'analyse immunohistochimique** de prélèvements tissulaires réalisés sur des chiens susceptibles d'être atteints d'un désordre histiocytaire, les marqueurs recherchés pour confirmer les hypothèses diagnostiques peuvent être les suivants (Figure 19) :

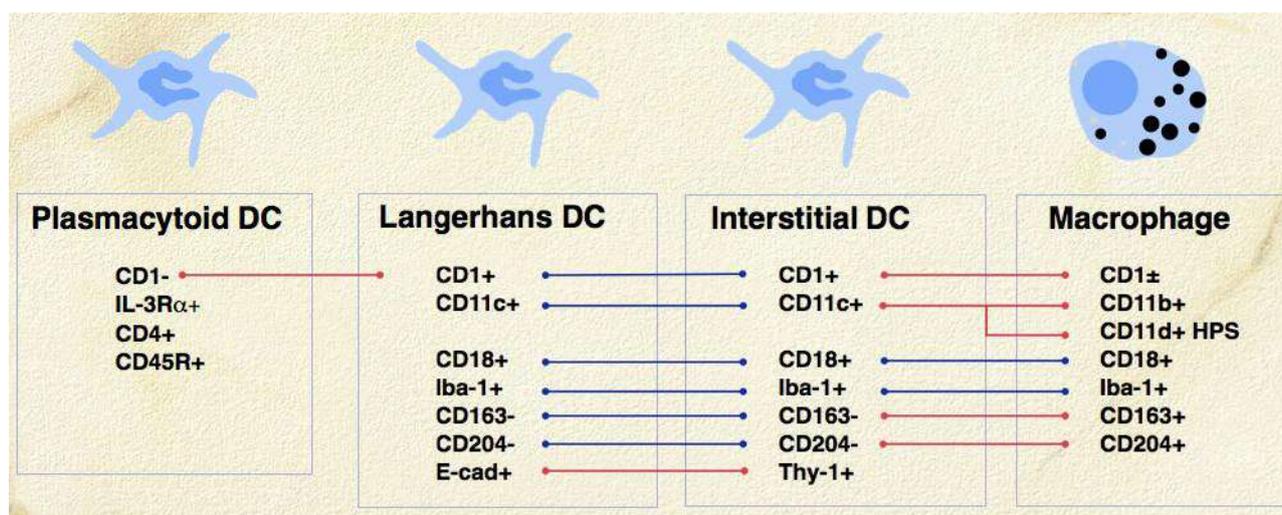


Figure 19 : Immunophénotype des lignées cellulaires macrophagiques et dendritiques : molécules de surface cellulaire utilisées dans l'identification des lignées histiocytaires. D'après Gardiner, 2019.

Les lignes rouges mettent en évidence les marqueurs discriminants. Les lignes bleues indiquent les marqueurs en commun. « HPS » fait référence aux sites hématopoïétiques : moelle osseuse, rate, sinus médullaires. [111]

L'aspect morphologique histologique des cellules de sarcome histiocytaire sera décrit plus tard ([Partie expérimentale, 2.1.3](#)). Ces **caractéristiques morphologiques** des histiocytes tumoraux associées au **phénotype CD18 positif** (origine hématopoïétique, équivalent au marqueur **CD45**, marqueur pan-leucocytaire), **CD3 et CD79 négatifs** (excluant respectivement les lymphocytes T et B) permettent en général de poser le **diagnostic de certitude de sarcome histiocytaire** ([Figure 20](#)) [118], [120], [121]. Pour la plupart des sarcomes histiocytaires, étant issus de cellules dendritiques, trois autres marqueurs permettent de compléter et d'augmenter la fiabilité du diagnostic immunohistochimique : **CD1 et CD11c** (cellules de la lignée dendritique) et **CMH II** (marqueur des cellules présentatrices d'antigènes) [122]. Selon Moore *et al.*, le phénotype complet d'échantillons biopsiés et congelés de sarcome histiocytaire est **CD1+, CD4-, CD11c+, CD11d-, CMH II+, ICAM-1+** (*Intercellular Adhesion Molecule* : molécule d'adhésion intercellulaire), **Thy-1+/-**, les cellules étant le plus souvent d'origine dendritique [118]. Aujourd'hui toutefois, la **positivité au simple marqueur Iba1** serait une alternative intéressante au panel ci-dessus, car elle semble **observée pour la totalité des sarcomes histiocytaires canins**, avec toutefois une intensité et une proportion cellulaire variable (données laboratoire LabOniris).

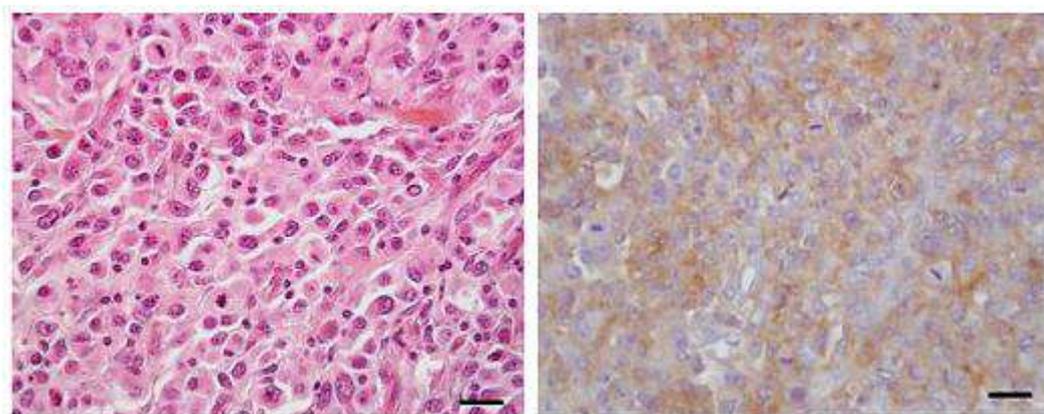


Figure 20 : Caractéristiques histopathologiques et immunohistochimiques du sarcome histiocytaire. D'après Abadie *et al.*, 2009.

À gauche : prolifération néoplasique d'une population pléomorphe de grandes cellules rondes uni- ou multinucléées, avec des atypies marquées et un indice mitotique élevé ; coloration à l'hémalum-éosine ; barre = 30 μ m. À droite : cellules néoplasiques exprimant le **marqueur leucocytaire CD18** (réaction immunoperoxydase, diaminobenzidine comme chromogène, contre-coloration à l'hématoxyline) ; barre = 30 μ m. [120]

1.2. Brève nosologie des désordres histiocytaires canins

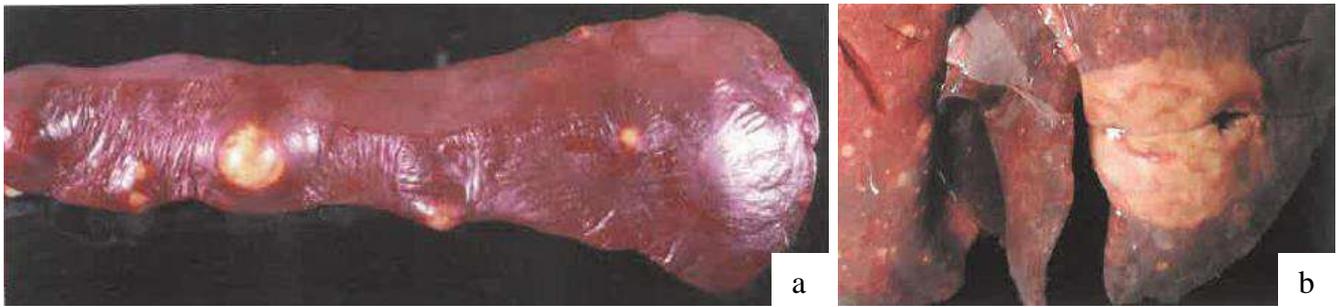
Le sarcome histiocytaire (SH) se réfère à une néoplasie **très agressive et fréquemment disséminée**, appartenant à la famille des désordres histiocytaires canins. Ce cancer représente moins de 1% des cancers canins du système hématopoïétique, le chien étant une espèce où il est surreprésenté par rapport aux autres espèces. Chez les chats, c'est un cancer rare et peu étudié [4], [123].

Les désordres histiocytaires canins, décrits pour la première fois à la fin des années 1970 dans la littérature scientifique, rassemblent plusieurs syndromes caractérisés par des proliférations néoplasiques ou réactionnelles des **cellules dendritiques et / ou des macrophages**.

Au moins cinq de ces désordres sont bien décrits chez le chien [4], [112], [113], [117], [124] :

- **L'histiocytome ou langerhansome cutané canin** : une néoplasie bénigne ayant pour origine des cellules dendritiques et qui se manifeste généralement en une lésion unique, en particulier chez les jeunes chiens. Cette lésion régresse spontanément dans la plupart des cas.
- **L'histiocytose cutanée à cellules de Langerhans** : de multiples lésions cutanées sont observées, avec parfois des métastases ganglionnaires ou systémiques. Une lésion prise individuellement ressemble à un histiocytome cutané. Une régression spontanée des lésions peut avoir lieu. Cette entité est rare.
- **Les histiocytoses réactionnelles** : ce ne sont pas des proliférations néoplasiques clonales, mais des réactions exacerbées du système immunitaire, regroupant les histiocytoses cutanées et systémiques. Elles n'ont pas d'équivalents chez le chat. Ces maladies inflammatoires sont causées par des proliférations de cellules dendritiques interstitielles activées et les lésions sont riches en histiocytes et en lymphocytes. La persistance des lésions est favorisée par un certain degré de dysfonctionnement immunitaire.
 - **Histiocytose cutanée** : elle est caractérisée par des lésions cutanées uniques ou multiples, qui s'étendent ou se résorbent de façon variable, voire même qui régressent spontanément. Certains individus répondent bien aux corticostéroïdes, d'autres nécessitent des traitements immunosuppresseurs plus agressifs.
 - **Histiocytose systémique** : c'est une maladie familiale du Bouviers Bernois, pouvant aussi se rencontrer de manière sporadique chez d'autres races. Les manifestations cliniques incluent celles rencontrées dans l'histiocytose réactionnelle cutanée, avec une intensité souvent plus importante, mais d'autres organes sont également touchés, comme les muqueuses, oculaire et nasale, les organes lymphoïdes, les poumons ou la moelle osseuse. En début d'évolution, les lésions peuvent fluctuer, cependant cette maladie est progressive et nécessite généralement un traitement immunosuppresseur continu.
- **Le complexe Sarcome Histiocytaire (SH, anciennement appelée histiocytose maligne)** : très fréquent notamment chez les Bouviers Bernois, les Flat Coated Retrievers, les Rottweilers, les Golden Retrievers, et sporadiquement chez de nombreuses autres races. Il se manifeste par des lésions **localisées** à la rate, les nœuds lymphatiques, les poumons, la moelle osseuse, la peau et le tissu sous-cutané, le cerveau et les tissus péri-articulaires des articulations des membres (Figure 21). Il existe également sous forme **disséminée**, c'est-à-dire présentant au moment du diagnostic des lésions sur plusieurs organes (le plus souvent rate, poumons, foie, et nœuds lymphatiques). L'épidémiologie, la pathogénie et les signes cliniques du sarcome histiocytaire seront détaillés ci-dessous.

Les sarcomes histiocytaires disséminés sont difficiles à distinguer de l'histiocytose maligne, qui était décrite comme une maladie multiorganique à progression rapide, avec une atteinte simultanée de plusieurs organes tels que la rate, les ganglions lymphatiques, les poumons, la moelle osseuse, la peau et les tissus sous-cutanés. C'est pourquoi le terme SH disséminé a remplacé celui de histiocytose maligne dans la littérature [4], [117], [124].



**Figure 21 : Photographies d'un sarcome histiocytaire localisé sur la rate (a) et sur les poumons (b).
D'après Hédan *et al.*, 2015.**

Photographies réalisées par Jérôme Abadie, ONIRIS. [5]

- **L'histiocytome malin fibreux** : c'est un sarcome des tissus mous souvent confondu avec le sarcome histiocytaire. En effet, à l'examen histologique, les cellules ont l'apparence de fibroblastes, avec de larges infiltrations de monocytes et macrophages réactifs. En revanche, l'immunohistochimie a montré, aussi bien chez l'homme que chez le chien, que le phénotype de ces cellules n'est pas le même que dans le cas des sarcomes histiocytaires, révélant ainsi une origine différente pour les cellules des histiocytomes malins fibreux (avec notamment l'absence d'expression du marqueur CD18). Cette maladie « histiocytaire » est donc souvent amenée à être reclassée en d'autres tumeurs. Ce terme manque de précision et ne devrait donc plus être utilisé [4], [112], [113].

Deux autres entités existent dans l'espèce **féline**, sans équivalents chez le chien :

- **l'histiocytose progressive féline** : maladie histiocytaire la plus commune chez le chat caractérisée par des nodules et des plaques cutanées
- **l'histiocytose pulmonaire à cellules de Langerhans** : maladie des chats âgés (10-15 ans), provoquant une insuffisance respiratoire progressive en raison d'une oblitération du parenchyme pulmonaire par des infiltrats de cellules de Langerhans [4], [125].

BILAN

Le sarcome histiocytaire canin fait donc partie de la **famille des désordres histiocytaires canins**, qui comprend aussi bien des maladies **bénignes** – histiocytome cutané canin et histiocytoses réactionnelles (cutanée et systémique) – que **malignes** – histiocytose cutanée à cellules de Langerhans, histiocytome malin fibreux, et bien sûr les tumeurs du complexe du sarcome histiocytaire.

Toutes ces affections sont issues de populations **d'histiocytes**, terme qui rassemble les cellules de la lignée des **macrophages** et des **cellules dendritiques** (cellules de Langerhans et cellules dendritiques interstitielles notamment). Toutes ces cellules participent activement au processus **immunitaire**, les macrophages dans la réaction innée grâce à leur capacité de phagocytose ; les cellules dendritiques dans la réaction adaptative grâce à leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes dans les organes lymphoïdes.

La différenciation des **cellules souches CD34+** en histiocytes se fait grâce à différents facteurs de croissance et cytokines. Grâce à ce mécanisme, les cellules histiocytaires acquièrent des **glycoprotéines membranaires** spécifiques, utilisées comme **marqueurs en immunohistochimie** afin d'identifier le type cellulaire observé dans un processus néoplasique.

Les cellules du sarcome histiocytaire, le plus souvent d'origine dendritique, présentent donc majoritairement le **phénotype CD1+,CD4-, CD11c+, CD11d-, MHC II+, ICAM-1+, Thy-1+/-**. En revanche, les **marqueurs nécessaires et suffisants** les plus utilisés en pratique pour distinguer l'origine histologique de ces tumeurs sont les suivants : **CD18+, CD3- et CD79-, ou le marqueur Iba-1** associé évidemment aux **caractéristiques morphologiques** des cellules visibles au microscope. L'ensemble de ces éléments définissent le « *gold standard* » ou **diagnostic de certitude** pour le sarcome histiocytaire.

2. Le sarcome histiocytaire canin

2.1. Epidémiologie du sarcome histiocytaire

Le sarcome histiocytaire (SH), comme décrit précédemment, est un **cancer rare** chez le chien, issu de la transformation tumorale de populations d'histiocytes, le plus souvent ayant le phénotype de **cellules dendritiques**. Quelques races de chiens y sont **prédisposées** : les **Bouvier Bernois**, les **Rottweilers** et les **Retrievers**, en particulier le **Flat Coated Retriever** [5], [113], [117]. Les premiers cas de SH ont été décrits en **1986** par Moore *et al.* chez treize Bouvier Bernois, sous le terme d'histiocytose maligne. Ceux-ci présentaient alors des **signes cliniques variés**, avec parfois une anémie et/ou des signes neurologiques. La progression de la maladie était **rapide**, impliquant souvent les **poumons, les nœuds lymphatiques, la rate et le foie** [126]. Toutes ces caractéristiques ont été par la suite étudiées plus en profondeur ce qui a permis de mieux comprendre la pathogénie du sarcome histiocytaire canin, mais aussi celle des désordres histiocytaires, rares, rencontrés chez l'homme.

Le sarcome histiocytaire est aujourd'hui connu sous trois formes :

- **Localisée** à un seul organe : le plus souvent (environ deux tiers) en localisation péri-articulaire chez les chiens, [123], [127]. La forme localisée est **majoritaire chez les Flat Coated Retriever** : dans une étude de 2017 de Dervisis *et al.*, 40% (21 cas sur 52 chiens) des SH localisés sont présents chez cette race ; et le SH représente jusqu'à 36% des cancers de cette race [128]. Une étude de 2022 (Erich *et al.*) comparant l'incidence et la clinique du sarcome histiocytaire dans une cohorte de Bouvier Bernois et de Flat Coated Retrievers, montre de nouveau que le SH localisé est majoritaire chez les Flat Coated Retrievers (60,6%) comparé aux Bouvier Bernois [129].
- **Disséminée** : les lésions sont retrouvées dans plusieurs organes, notamment la rate, les poumons et les nœuds lymphatiques. Cette forme est **majoritaire chez les Bouvier Bernois** : dans l'étude de 2017 de Dervisis *et al.*, 47% (22 cas sur 47) des SH disséminés se retrouvent chez des Bouvier Bernois [127]. L'étude de 2022 d'Erich *et al.* indique également que le SH disséminé est majoritaire chez les Bouvier Bernois (60,8%) par rapport aux Flat Coated Retrievers [129].
- **Hémophagocytaire** : parfois inclus dans la forme disséminée, comme dans l'étude de Dervisis *et al.* où la forme hémophagocytaire représente 12,8% (6 cas sur 47) des SH disséminés. Cette forme est la plus **agressive** et présente le **pronostic le plus défavorable** en raison de la rapidité de son évolution. Elle procède de la transformation tumorale de populations macrophagiques, notamment dans la pulpe rouge splénique ou dans la moelle osseuse [119], [127].

2.2. Prédilection familiale de la race Bouvier Bernois pour le sarcome histiocytaire

2.2.1. Le Bouvier Bernois : une race à risque de développer un sarcome histiocytaire

La prédisposition du Bouvier Bernois pour le SH est particulièrement marquée, comme le montre les différentes études sur les causes de mortalité des Bouviers Bernois ou sur le SH lui-même :

- Selon Shaiken *et al.* (1991), les Bouviers Bernois auraient **225 fois plus de risque** de développer un SH que les autres races canines [130].
- D'après Padgett *et al.* en 1995, sur un échantillon de **500 tumeurs** diagnostiquées chez des Bouviers Bernois sur une dizaine d'années, un quart (**25,4%**) correspond à des **histiocytoses malignes** [6].
- Le travail de Nielsen *et al.* (2010) sur les causes de mortalité des Bouviers Bernois danois a montré que dans l'ensemble des 812 Bouviers Bernois étudiés, **10,7%** ont développé une **histiocytose maligne** (deuxième cause néoplasique de décès), parmi les **42,1%** étant décédés d'un cancer [131].
- Selon Erich *et al.* en 2013, **64% des cancers chez les Bouviers Bernois sont des SH disséminés**. De plus, dans la population de Bouviers Bernois néerlandais étudiés, **l'âge médian au décès** est de huit ans, soit trois ans plus tôt que la population globale des chiens au Pays-Bas. Sachant qu'au sein de la cohorte de Bouviers Bernois étudiée, l'âge médian au décès est de 9,2 ans pour les individus sans tumeurs, et qu'il est de **6,3 ans pour les chiens avec SH**, cela montre bien l'impact défavorable du SH sur l'espérance de vie globale de cette race [122], [132].
- L'étude menée entre 2003 et 2013 par l'équipe « Génétique du Chien » du CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) de Rennes confirme ces constats précédents : parmi 390 cas de **sarcomes histiocytaires canins**, **73%** des cas sont de la race **Bouvier Bernois** [5].
- Dans l'étude rétrospective menée entre 2007 et 2017 sur les causes de mortalité des chiens à l'école nationale vétérinaire de Toulouse, les résultats montrent que concernant les décès causés par des néoplasies, les Bouviers Bernois ont plus de risque que les autres races de mourir d'un SH. En effet, parmi les **chiens mourant d'un SH**, **40% sont des Bouviers Bernois** [133].

Ainsi, le Bouvier Bernois, en plus d'être une race particulièrement à risque concernant les cancers, par rapport aux autres races [133], est davantage susceptible d'être atteint d'un sarcome histiocytaire, et plus probablement sous sa forme agressive disséminée.

2.2.2. Une transmission oligogénique en cause dans la prédisposition des Bouviers Bernois au sarcome histiocytaire

Cette très forte prédisposition à développer un sarcome histiocytaire a motivé les scientifiques à formuler l'hypothèse d'une **transmission familiale du sarcome histiocytaire chez la race Bouvier Bernois**. Plusieurs travaux de recherche vont en effet dans ce sens :

- La première publication mentionnant une histiocytose maligne canine, en 1986, rapporte cette affection chez treize Bouviers Bernois, dont dix appartiennent à la **même lignée familiale** que des chiens affectés par une histiocytose systémique. Les désordres histiocytaires semblent donc avoir une transmission génétique chez cette race [126].
- Selon les résultats de l'étude de Padgett *et al.*, le sarcome histiocytaire n'est pas dû à un unique gène autosomal récessif, ni à un unique gène dominant, deux parents sains ayant donné naissance à un chiot atteint. L'hypothèse d'un chromosome sexuel en cause est également écartée, étant donné qu'aucune différence significative n'est observée entre les mâles et les femelles atteintes. Les résultats observés sont donc davantage en faveur d'un **mode de transmission polygénique** [6].
- Dans l'étude menée par Abadie *et al.* et publiée en 2009, **65%** (58 cas sur 89) des Bouviers Bernois affectés par le SH ont des **proches parents** au premier et deuxième degré ayant un **diagnostic confirmé de SH**. Ces observations infirment l'hypothèse d'un modèle récessif de transmission, mais sont en faveur d'un mode de **transmission oligogénique** [120].
- L'enquête menée par Nielsen *et al.* en 2010 révèle également un lien génétique en cause dans l'apparition du SH chez les Bouviers Bernois. En effet, parmi les treize individus diagnostiqués avec cette affection, onze sont **issus du même pedigree** (c'est-à-dire de la même famille, avec le même ensemble d'ascendants) [131].
- Cette transmission génétique est confirmée par les travaux de recherche de l'équipe « Génétique du Chien » du CNRS de Rennes, qui a construit des pedigrees mettant en évidence la transmission familiale de plusieurs cancers dont le SH. En effet, la maladie est **récurrente sur plusieurs générations**. De plus, il est intéressant de remarquer que dans ces familles, d'autres cancers sont également fréquemment rencontrés, comme le lymphome. Cela laisse supposer qu'il existe des **facteurs génétiques communs et prédisposants associant ces différents cancers** (Figure 22) [5].

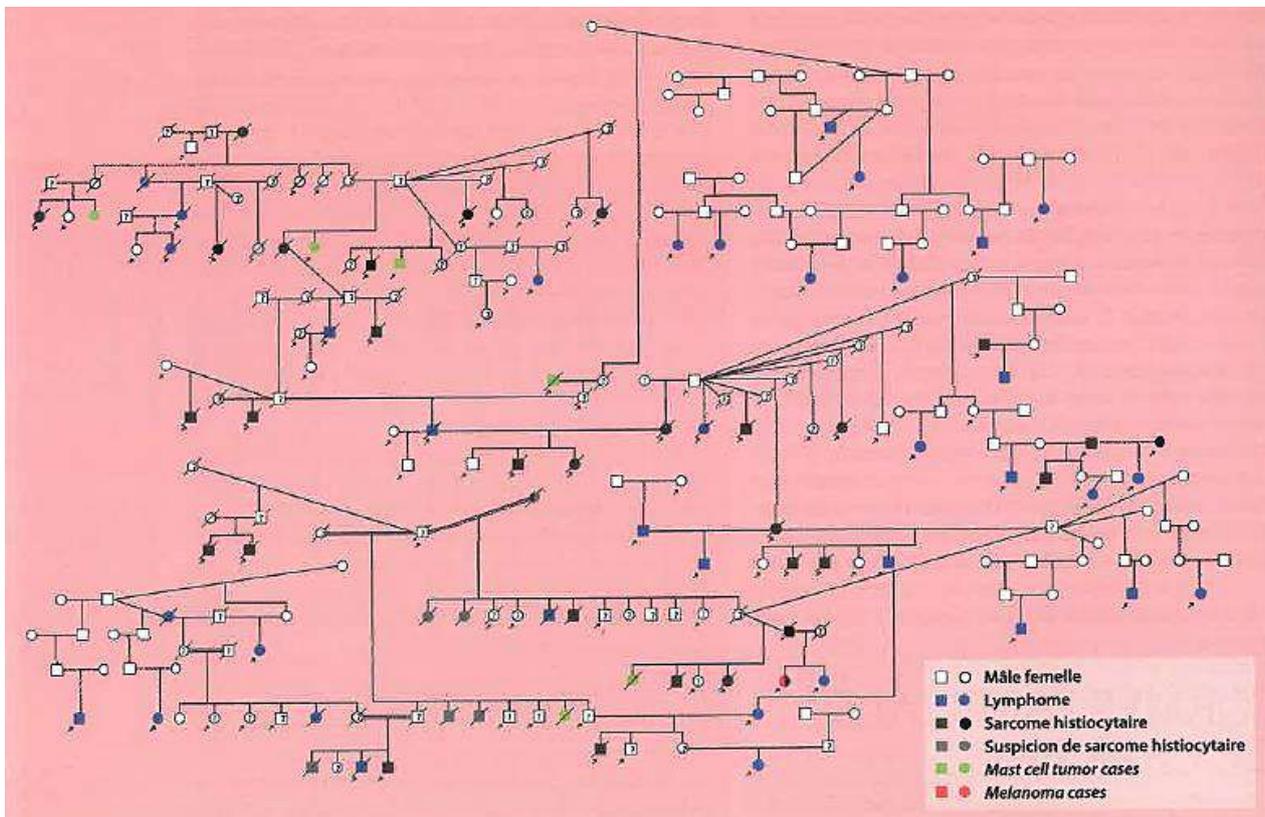


Figure 22 : Pedigrees de Bouviers Bernois mettant en évidence la transmission familiale du sarcome histiocytaire et d'autres cancers. D'après Hédan *et al.*, 2015.

Les individus dont le sigle est barré sont ceux dont la mort a été confirmée ; les individus indiqués par une flèche sont ceux qui ont été prélevés dans le cadre de la recherche. [5]

Suite à ces études épidémiologiques et généalogiques, un **mode de transmission oligogénique de la maladie a été retenu** : seul un petit nombre de gènes serait impliqué, ces gènes dits « de prédisposition » sont nécessaires mais pas suffisants pour le développement de la tumeur (implication d'autres gènes et/ou de facteurs environnementaux) [134]. Par conséquent, plus un chien possède de mutations sur ces gènes, plus il est à risque de développer un SH.

2.2.3. Indice génétique utilisé pour la prédisposition aux sarcomes histiocytaires chez les Bouviers Bernois

A) Travaux de recherche précurseurs dans l'identification des marqueurs génétiques associés au sarcome histiocytaire chez le Bouvier Bernois

Dans l'objectif **d'identifier les gènes** liés à l'hérédité du sarcome histiocytaire, l'équipe de « Génétique du Chien » du CNRS de Rennes a collecté, en plus des informations généalogiques, des **prélèvements sanguins et tumoraux** sur tous les chiens étudiés et atteints de SH, mais aussi sur des chiens sains, sur une dizaine d'années. L'ensemble de ces prélèvements ont été enregistrés et stockés dans la **bio-banque ou Centre de Ressources Biologiques (CRB) Cani-DNA**. Cette bio-banque d'échantillons canins regroupe des prélèvements de sang et de tissus de chiens de toutes races, accompagnés de leurs données généalogiques, phénotypiques et cliniques [135]. Ainsi les génomes des chiens atteints de SH et ceux des chiens sains ont pu être comparés, selon le principe du **GWAS** (Genome

Wide Association Study) : un certain nombre de marqueurs, les **SNPs** (*Single Nucleotid Polymorphisms* : polymorphisme d'un seul nucléotide) sont étudiés. Si un SNP se trouve plus fréquemment chez les individus affectés, il peut être associé à la maladie [24]. Cela permet d'identifier les régions chromosomiques impliquées dans le cancer ainsi que potentiellement les mutations causales associées.

Ainsi, la **première étude** d'association pangénomique (**GWAS**) pour le sarcome histiocytaire, toutes espèces confondues, a été publiée en **2012**. Des **échantillons plasmatiques** de Bouviers Bernois malades et sains ont été collectés en Europe et en Amérique du Nord. Puis, l'**ADN génomique a été extrait** de ces échantillons et **comparé** pour identifier les régions chromosomiques en cause. Ces régions ont ensuite été **séquencées** afin de définir les mutations associées à la prédisposition au SH chez les Bouviers Bernois. Ces travaux ont permis de mettre en évidence un locus en particulier sur le chromosome 11, de 9,7 Mb (mégabase : représente une longueur d'un million de paires de bases d'ADN ou d'ARN), associé au SH et présent chez 96% des chiens affectés : le **locus CFA11** (Figure 23). Au sein de ce locus, différents SNPs ont été génotypés, ce qui a permis de révéler un haplotype de **trois SNPs** en lien avec le SH. Cet haplotype (groupe d'allèles de différents gènes situés sur le même chromosome et habituellement transmis ensemble), situé sur le chromosome 11 canin, comprend le gène **MTAP** (méthylthioadénosine phosphorylase) et les gènes inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes 2A (**CDKN2A**) et 2B (**CDKN2B**). Ces gènes seraient donc des contributeurs importants dans la prédisposition au SH chez les Bouviers Bernois [33].

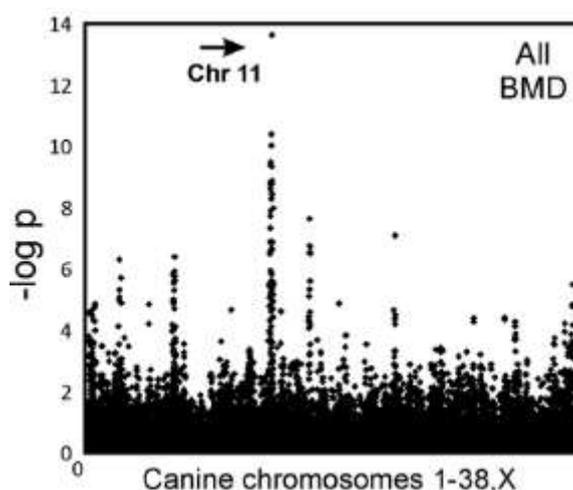


Figure 23 : Analyse pangénomique (GWAS) du sarcome histiocytaire dans deux populations de Bouviers Bernois identifiant une association sur le locus CFA11. D'après Shearin *et al.*, 2012.

Les cohortes américaine et européenne ont été combinées pour un total de 474 chiens avec une association maximale sur CFA11, à la position 47,179,346. L'axe des ordonnées indique le log négatif de la valeur p non corrigée (p-value). L'axe des abscisses indique la position du marqueur (SNP) depuis CFA1 jusqu'à CFAX. [33]

Le graphique illustrant un GWAS représente donc, en abscisses, la position des SNPs sur les chromosomes canins, en ordonnées le log négatif de la p-value ou valeur p. Plus l'ordonnée est élevée, plus la probabilité que le SNP concerné soit associé à la maladie est forte.

Cette première étude a été une **étape importante** dans la compréhension des mécanismes génétiques du SH chez les Bouviers Bernois, bien que les mutations causales n'aient pas pu être identifiées.

Aujourd’hui, de nombreuses **mutations associées à un risque plus élevé de développer un sarcome histiocytaire** sont connues chez les deux principales races prédisposées, le Bouvier Bernois et le Flat-Coated Retriever. La plupart des gènes mutés sont impliqués dans la **voie de signalisation des MAP-kinases** (*Mitogen-Activated Protein kinases* : ensemble des protéines nécessaires à l’induction de la division cellulaire) ou dans la voie **PI3K** (*Phosphoinositide 3-Kinase*)-**AKT**. Les mutations identifiées sont des mutations somatiques acquises, gain de fonction, consistant en des altérations du nombre de copies (CNA : *Copy Number Alterations*) dans des locus d’oncogènes ou de gènes supresseurs de tumeur. Ces mutations se situent notamment dans les gènes suivants : **TP53** (gène très important dans le contrôle du cycle cellulaire, répare s’il y a des erreurs ou conduit à l’apoptose si les erreurs ne sont pas réparables), **PTPN11** (*Tyrosine-Protein Phosphatase Non-receptor type 11*), **KRAS** (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), **BRAF** (B-Raf proto-oncogène), **PTEN** (*Phosphatase and TENsin homolog*), **CDKN2A/B**, **RB1** (rétinoblastome) [7], [8], [33], [123], [136]–[138].

Par la suite, d’autres GWAS ont été réalisés et ont permis de mettre en évidence **plusieurs marqueurs génétiques** associées à la prédisposition des Bouviers Bernois au SH ; cela a abouti à l’élaboration d’un **indice génétique** commercialisé aujourd’hui par le laboratoire **ANTAGENE**.

B) Le test génétique ANTAGENE permet de limiter l’incidence du sarcome histiocytaire dans la race Bouvier Bernois

L’identification, grâce aux différents GWAS de marqueurs génétiques associés au risque de développer et de transmettre le sarcome histiocytaire, a permis l’élaboration d’un test (**test SH** = Sarcome Histiocytaire) commercialisé par la société **ANTAGENE**, délivrant un **indice génétique** [32], [139]. Cet indice s’appuie sur **l’analyse statistique** des marqueurs génétiques. Il constitue un **outil de sélection pour les éleveurs** de Bouvier Bernois, mais ce n’est pas un test prédictif de l’apparition du cancer. Son utilisation permet **d’orienter les accouplements** afin de diminuer l’incidence du sarcome histiocytaire dans la population de Bouvier Bernois (en limitant les génomes trop à risque) [32].

Un indice peut donc être élaboré pour chaque chien, grâce à une **prise de sang**. L’indice est **calculé** à partir de **neuf marqueurs génétiques** (panel SH0912) : un sur le chromosome 2, deux sur le chromosome 5, trois sur le chromosome 11, deux sur le chromosome 14 et un sur le chromosome sexuel X. On obtient alors un **index entre 0 et 1**, qui détermine la **note** attribuée au chien : A, B ou C (Tableau V).

Tableau V : Explications des notes attribuées suite au calcul de l’indice génétique pour le sarcome histiocytaire chez un Bouvier Bernois. D’après ANTAGENE.

Note	Explication
A	Les individus ont 4 fois plus de chance de ne pas développer de sarcome histiocytaire.
B	Indice neutre
C	Les individus ont 4 fois plus de risque de développer le sarcome histiocytaire. Le risque de transmission des marqueurs associés à la maladie est accru

[32]

Les éleveurs ont intérêt à **privilégier les individus avec les meilleurs indices** comme futurs reproducteurs. Cependant, il reste essentiel de **maintenir suffisamment de diversité génétique** lors des accouplements. Aussi, les chiens C ayant d'autres qualités, ils ne doivent pas être retirés de la reproduction mais accouplés avec des chiens A ou B, afin d'éviter l'apparition d'autres tares héréditaires [32].

Les marqueurs génétiques utilisés dans ce test n'ont **pas une sensibilité assez forte** pour détecter tous les sarcomes histiocytaires. En effet, ce cancer est caractérisé par son **instabilité génétique**, car il dépend de **plusieurs gènes**, pour lesquels la présence des mutations n'est pas constante d'un individu à l'autre. De plus, des **changements génétiques** peuvent avoir lieu lors de l'évolution des cellules cancéreuses au cours du temps. L'étude génomique de cette maladie se poursuit donc, avec le séquençage de l'ADN de nouveaux prélèvements de tumeurs, pouvant préciser l'impact des mutations connues ou trouver d'autres mutations. Ces nouvelles données augmenteraient la sensibilité pronostique de ce test génétique actuel, ou permettraient d'élaborer un nouveau test diagnostique, ainsi que nous cherchons à le faire avec ce travail de thèse.

2.3. Description clinique du sarcome histiocytaire

2.3.1. Signes et formes cliniques

Le sarcome histiocytaire (SH) est le plus souvent diagnostiqué chez des Bouviers Bernois d'âge moyen à avancé, avec un **âge moyen au diagnostic de 6,5 ans**. Aucune prédisposition sexuelle n'a été rapportée [120], [123], [134]. En revanche, les **affections orthopédiques et les états inflammatoires** seraient des **facteurs prédisposants** à l'apparition du SH chez le Bouvier Bernois ; de même que des traitements médicamenteux à long terme, à prédominance anti-inflammatoire, diminueraient le risque d'émergence de ce cancer dans cette race [140].

Les signes cliniques communément rencontrés chez un chien atteint de sarcome histiocytaire sont peu spécifiques : **léthargie, faiblesse, dysorexie, perte de poids, distension abdominale, lymphadénopathie**. D'autres signes cliniques peuvent être observés, selon la localisation du SH : boiterie lors d'un SH localisé aux articulations ; **dyspnée et toux** lors d'une masse tumorale thoracique ; **ataxie, parésie** ou paralysie des membres lors de lésions tumorales osseuses notamment intravertébrales ; **convulsions**, nystagmus, syndrome de Schiff-Sherrington ou de Bernard-Horner ; **pâleur des muqueuses** ou ictère ; syndrome **fébrile** ; bruits cardiaques et/ou respiratoires assourdis ; pétéchies ; signe du flot en raison d'une ascite ; signes digestifs (diarrhée, méléna, vomissements, dysphagie) ; polydipsie ou adipsie [4], [113], [118], [123], [129]. Afin de donner une idée de la fréquence de chaque signe clinique, un tableau résumant l'ensemble des signes cliniques dans une cohorte de 365 Bouviers Bernois atteints de SH est présenté en [Annexe 3](#). Ce tableau permet également une comparaison avec les signes retrouvés chez les Flat-Coated Retriever, davantage touchés par la forme localisée du SH [127].

Les localisations des lésions tumorales vont dépendre également de la forme clinique du sarcome histiocytaire. Ainsi, certains signes vont être plus spécifiques d'un type clinique en particulier. Comme décrit dans la partie 2.1, le sarcome histiocytaire existe sous trois grandes formes :

- **Forme localisée** : une lésion primaire est retrouvée dans la **peau ou dans le tissu sous-cutané** des extrémités, mais aussi dans les tissus **péri-articulaires** des grosses articulations des membres ou parfois dans la rate, les nœuds lymphatiques, les poumons ou la moelle osseuse, ou plus rarement

dans le tronc cérébral ou la cavité nasale. En général, le signe clinique d'appel est un **gonflement articulaire** au niveau d'une extrémité ou simplement une **boiterie**, la masse étant découverte dans un second temps par les propriétaires. Cette forme de SH est **localement invasive**, s'étendant dans le derme profond et dans les muscles et fascias sous-jacents ; et des **métastases aux nœuds lymphatiques drainants** sont communément observées [113], [117], [118].

- **Forme disséminée** : des lésions sont observées d'emblée dans **divers organes**. Le plus fréquemment, la **rate**, les **poumons** et la **moelle osseuse** sont atteints, mais également le **foie** et les **nœuds lymphatiques**. L'interrogation restant en suspens pour cette forme est sa pathogénie : apparition initiale d'une lésion sur un unique organe entraînant rapidement les autres lésions ; ou apparition simultanée de l'ensemble des lésions sur les différents organes [113], [117], [118]. Les signes cliniques retrouvés sont ceux, peu spécifiques, cités ci-dessus (plus souvent retrouvés dans cette forme que dans la forme localisée), additionnés de **signes variables** selon les organes atteints. Cette forme, envahissant plusieurs organes lors du diagnostic, est de **pronostic plus défavorable** que la forme localisée, étant donné **l'agressivité** et la **rapidité** d'évolution de ce cancer [113], [118].
- **Forme hémophagocytaire** : c'est la forme **la plus agressive** du sarcome histiocytaire. Des populations de **macrophages** prolifèrent initialement dans un organe unique hématopoïétique, pulpe rouge de la **rate ou moelle osseuse**, sous forme d'infiltrats histiocytaires causant, si la rate est impliquée, une **splénomégalie** (retrouvée aussi dans les autres formes cliniques, selon la localisation tumorale) ; puis des métastases sont fréquemment observées dans le foie, où les cellules tumorales se concentrent dans les sinus. Des embolies dans les poumons sont aussi souvent observées. Les signes cliniques caractéristiques de cette forme sont une pâleur des muqueuses marquée associée à une **anémie hémolytique régénérative** et une **thrombocytopenie** (entraînant une coagulopathie), mimant le syndrome d'Evans (coexistence d'une anémie hémolytique auto-immune et d'un purpura thrombopénique immunologique [141]), bien que le test de Coombs soit négatif. D'autres anomalies du bilan sanguin classique sont également souvent retrouvées : **hypoprotéïnémie**, **hypoalbuminémie**, **hypocholestérolémie**, et parfois **hyperbilirubinémie et augmentation des paramètres hépatiques**. Il est à noter qu'une anémie modérée et une hypoalbuminémie peuvent être mis en évidence aussi dans les formes non hémophagocytaires, alors que l'hypocalcémie est plus rare [4], [117], [119], [123], [129]. Les anomalies hémato-biochimiques rencontrées sont détaillées en [Annexe 4](#), la différence étant faite également selon les races (Bouvier Bernois ou Flat-Coated Retrievers) et selon le type de SH (localisé ou disséminé).

2.3.2. Méthodes de diagnostic utilisées

A) Diagnostic lors de sarcome histiocytaire clinique

Les signes cliniques manifestés par les Bouviers Bernois atteints de sarcome histiocytaire étant peu spécifiques, des examens complémentaires sont nécessaires afin de poser un diagnostic de certitude et de donner le stade du cancer.

L'analyse histologique (ou cytologique) reste le **diagnostic définitif de certitude**, le « *gold standard* ». Comme expliqué précédemment, les caractéristiques **morphologiques** des cellules (Partie expérimentale, 2.1.3) ainsi que leurs caractéristiques **immunohistochimiques** (notamment CD18+, CD3-, CD79- et/ou Iba-1 ; 1.1.2) permettent de s'assurer que l'échantillon prélevé (biopsie ou cytoponction d'une masse) est bien constitué principalement d'histiocytes tumoraux.

Par la suite, pour préciser la forme clinique du SH, et donc le pronostic du chien, puis pour guider les choix thérapeutiques, la **stadification** du cancer est nécessaire. Pour cela, les recommandations actuelles conseillent de réaliser un **bilan d'extension ainsi qu'un bilan sanguin complet**, idéalement : une numération formule sanguine, un bilan biochimique, une analyse d'urines ; des radiographies thoraciques en 3 vues (une de face et les deux profils), des radiographies et/ou une échographie abdominale, particulièrement importante chez les Bouviers Bernois pour détecter une tumeur viscérale ; une biopsie de la moelle osseuse si cela est possible et disponible ; ainsi qu'un scanner ou une IRM (Imagerie par Résonance Magnétique). Des cytoponctions des nœuds lymphatiques régionaux doivent également être réalisées pour déterminer la généralisation métastatique régionale [113], [123], [129].

Sur les **radiographies** thoraciques, une atteinte pulmonaire par le SH peut se caractériser par un **infiltrat interstitiel diffus**, des plages de consolidation, ou des **lésions multifocales**, avec effet de masse. Le **lobe pulmonaire moyen droit** est la localisation la plus fréquente du SH pulmonaire primaire. Une **lymphadénopathie** sternale et trachéobronchique peut également être observée [142], [143].

L'**échographie abdominale** peut être utilisée pour identifier les lésions des organes viscéraux. Plus précisément, on peut noter une **hépto- et/ou splénomégalie**, une marbrure du foie et de la rate, des **nodules** ou des masses discrètes dans plusieurs organes (foie, rate, reins, surrénales), une **lymphadénopathie** et un épanchement abdominal [144].

Les techniques d'imagerie plus approfondies peuvent permettre de déterminer la localisation anatomique exacte des tumeurs primaires et secondaires, ainsi que leur degré d'envahissement. Le **scanner** a davantage de sensibilité que les radiographies pour la détection des métastases **pulmonaires**, tandis que l'**IRM** a plus de sensibilité pour la détection de tumeurs viscérales dans la cavité **abdominale** [123].

B) Diagnostic précoce

Nielsen *et al.* ont publié en 2012 une étude visant à élaborer un **programme de dépistage du sarcome histiocytaire disséminé chez le Bouvier Bernois**, en utilisant des diagnostics par imagerie et des analyses sanguines ciblant onze biomarqueurs de diagnostic précoce. Trente-trois chiens ont été inclus dans cette étude. Cinq d'entre eux ont été diagnostiqués d'un SH disséminé, avant toute apparition de signes cliniques : quatre grâce aux différentes techniques d'imagerie, un grâce aux analyses sanguines.

Ces individus ont montré une médiane de survie de 226 jours après le diagnostic précoce. Seule la ferritine sérique a montré un potentiel en tant que biomarqueur de diagnostic précoce. En conclusion de cette étude, des **radiographies thoraciques combinées à une échographie abdominale tous les six mois** chez les individus de plus de quatre ans, associées à des **mesures de la ferritine sérique**, pourrait contribuer au diagnostic précoce du sarcome histiocytaire disséminé chez les Bouviers Bernois adultes [145].

Dans l'objectif d'un **diagnostic précoce** également, cette thèse vise à montrer que les études préliminaires, réalisées avec l'équipe « Génétique du Chien » du CNRS de Rennes, sont favorables à une détection du SH disséminé chez les Bouviers Bernois par une **simple prise de sang**, avant l'apparition de signes cliniques. Dans le sang prélevé, les mutations du gène *PTPN11*, spécifiques de ce cancer, sont recherchées. Le travail mené a pour but de **déterminer le délai de précocité potentiel** de ce diagnostic, et donc son intérêt dans l'allongement de la survie de l'animal après diagnostic si des thérapies sont initiées avant dégradation de l'état général.

2.3.3. Données pronostiques générales

Différents travaux de recherche ont permis de déterminer des médianes de survie pour les chiens atteints de sarcome histiocytaire :

- Selon Dervisis *et al.*, sur 180 patients, traités ou non, la **médiane de survie** était de 170 jours : **398 jours pour les cas de SH localisé, et seulement 78 jours pour les cas de SH disséminé**. Des données pronostiques sont également données en fonction du traitement administré ; ainsi, l'utilisation de **corticostéroïdes diminuerait la survie** médiane, tandis les animaux recevant un traitement dit définitif (opération chirurgicale, chimiothérapie, radiothérapie, ou une combinaison de ces trois modalités) auraient une médiane de survie allongée : 349 jours de survie après diagnostic, contre 39 jours pour les individus ayant reçu simplement un traitement palliatif (tout traitement symptomatique, excluant les trois modalités citées précédemment, mais incluant les corticostéroïdes). De plus, chez les chiens recevant un **traitement définitif**, la médiane de survie était de 406 jours pour les patients atteints de SH localisé, 85 jours pour ceux atteints de SH disséminé [127].
- D'après Abadie *et al.*, sur 77 Bouviers Bernois atteints de SH, la **médiane de survie**, de la date du diagnostic à la date de décès, est de **30 jours** ; avec une durée **moyenne de survie de 49 jours**. Ce délai, plus court que celui de 78 jours décrit par Dervisis *et al.* pour le SH disséminé (forme majoritaire chez les Bouviers Bernois, peut s'expliquer par le fait que la cohorte dans l'étude d'Abadie *et al.* n'est composée que de Bouviers Bernois, davantage prédisposés au SH et donc peut-être moins résistants à ce cancer que d'autres races de chiens présentes dans la cohorte de l'étude de Dervisis *et al.* En outre, dans cette cohorte, de nombreux chiens ont été euthanasiés à l'annonce du diagnostic de certitude, sans mise en œuvre d'un traitement, ce qui est de nature à réduire fortement la médiane de survie [120].
- D'après l'étude de Takahashi *et al.*, sur 73 chiens atteints de SH, la médiane de survie était de seulement 43 jours. Cela était drastiquement réduit en l'absence de traitement ou avec simplement un traitement symptomatique (12 jours) et doublé en cas de traitement chirurgical ou par chimiothérapie (85 jours) [146].

- Le **pronostic le plus grave** est celui de la **forme hémophagocytaire** du SH. En effet, selon Moore *et al.*, la durée de **survie médiane** est de seulement **quatre semaines**, avec une durée moyenne de 7 semaines, après diagnostic. Le développement d'une anémie sévère et de coagulopathies contribuent à cette durée de survie très réduite [4], [119].

En bref, la durée de survie est très courte, après le diagnostic, chez les Bouviers Bernois atteints de sarcome histiocytaire, cancer particulièrement agressif. Cette durée est d'autant plus réduite dans la forme disséminée, et encore davantage pour la forme hémophagocytaire, pour laquelle des traitements ne sont généralement pas initiés, l'euthanasie étant privilégiée au vu de la dégradation rapide de l'animal.

2.3.4. Traitements disponibles et pronostics associés

En raison de la nature agressive du sarcome histiocytaire, un traitement, pour montrer une efficacité, doit combiner des thérapies à la fois locales et systémiques, même pour les formes localisées. Pour les formes disséminées, en général seule une thérapie systémique est utilisée [123].

A) Thérapies locales

a) Chirurgie

Dans la plupart des cas de SH localisé, une **exérèse chirurgicale précoce de la tumeur en marges saines** est préconisée [123]. Les opérations pouvant être pratiquées sont, entre autres, l'amputation d'un membre, une lobectomie pulmonaire, une splénectomie, une lymphadénectomie ou encore une gastrectomie partielle [147]. Dans une série de 18 chiens avec un SH localisé à une articulation, la durée de survie moyenne des chiens ayant subi une **amputation** est de **6 mois** tandis qu'elle est de 5,2 mois pour l'ensemble de la cohorte [148]. Dans une étude plus récente, le bénéfice de la chirurgie est démontré sur des chiens ayant des **SH pulmonaires primaires** : les individus bénéficiant d'une chirurgie associée à une chimiothérapie ont une durée de survie sans progression de la maladie plus longue (276 jours) et une **durée de survie globale plus longue** (374 jours) que ceux ne recevant qu'une de ces deux modalités seule, un traitement symptomatique ou une absence de traitement (respectivement 79 et 131 jours) [149].

b) Radiothérapie

Les données concernant l'efficacité de la radiothérapie sur le sarcome histiocytaire canin sont limitées. Cette technique thérapeutique est indiquée lorsque l'**exérèse chirurgicale de la tumeur en marges saines n'est pas possible**, ou lorsque l'exérèse elle-même n'est pas réalisable en raison de la localisation de la tumeur ou des risques associés pour le patient. Les cellules tumorales des SH auraient une **radiosensibilité** similaire à celle des autres tumeurs à cellules rondes. Les travaux de recherche déjà réalisés vont également dans le sens d'une certaine radiosensibilité [112], [147].

D'après Fidel *et al.*, sur trente-sept cas de Flat-Coated Retrievers affectés par un SH, la **médiane de survie est de 182 jours** pour les animaux ayant reçu une radiothérapie contre **seulement 60 jours sans radiothérapie**. Cela va donc bien dans le sens d'un bénéfice de la radiothérapie. Les effets secondaires de la radiothérapie rapportés dans cette étude ont été une alopecie ainsi qu'une toxicité cutanée légère à modérée [150].

D'après les **cas cliniques** de sarcome histiocytaire rencontrés à l'école vétérinaire de Nantes – **ONIRIS**, la radiothérapie permet également de prolonger la survie de l'animal. En effet, un Bouvier Bernois avait été diagnostiqué par cytologie d'un sarcome histiocytaire pulmonaire, visible également par effet masse dans le cadran ventral gauche sur les **radiographies thoraciques**. Dix jours après la réalisation de deux séances de radiothérapie à deux jours d'intervalle, une **diminution de la masse** a été mesurée sur les radiographies thoraciques. Ce chien est décédé deux mois après le diagnostic de sarcome histiocytaire, et environ trois semaines après les séances de radiothérapie.

B) Thérapies systémiques

a) Chimiothérapie

La chimiothérapie est le traitement de choix lors de sarcome histiocytaire disséminé, ou en prévention de l'apparition de métastases dans les formes localisées.

- La molécule de chimiothérapie qui semble le plus efficace à l'heure actuelle est la **lomustine**, ou CCNU (*1-[2-chloroethyl]-3-cyclohexyl-1-chloroethylnitrosourea*). C'est une molécule nitrosourée, et un agent alkylant et réticulant de l'ADN, qui inhibe ainsi la synthèse de l'ADN et de l'ARN [151], [152]. Deux études en particulier ont testé l'efficacité de la lomustine seule sur le SH canin :
 - Selon Skorupski *et al.* (2007), sur cinquante-neuf chiens atteints de SH traités oralement avec des doses de **60 à 90 mg/m²** de lomustine toutes les **trois à quatre semaines** (quatre séances en nombre médian), le taux de **réponse** globale était de **46%**, avec une médiane de **survie de 106 jours**. Les formes cliniques des SH ne sont pas rapportées dans cette étude [153].

Deux ans plus tard (2009), une nouvelle étude est faite par la même équipe. Seize chiens atteints de SH localisé et traités avec une **thérapie locale** (chirurgie et/ou radiothérapie), reçoivent **70 mg/m² de lomustine** toutes les **trois semaines**, avec en moyenne 6,3 séances. Les résultats sont très encourageants, avec une durée de survie sans progression de la maladie de **243 jours** et une durée de **survie globale de 568 jours**, soit plus d'un an et demi [147].
 - Selon Rassnick *et al.* (2010), sur vingt-et-un chiens atteints d'un SH confirmé par histologie (quatorze SH disséminés, sept localisés), traités avec une dose orale de **90 mg/m²** de lomustine **toutes les quatre semaines** (le nombre de séances dépendant de la réponse au traitement et des choix des propriétaires), le taux de **réponse** était de **29%** avec une médiane de **survie de 96 jours** [154].

La lomustine permet donc un allongement de la durée de survie médiane des chiens atteints de SH. Cependant, les **effets secondaires** sont plus nombreux que pour la radiothérapie, et parfois bien plus sévères, ce qui nécessite une réduction des doses de chimiothérapie voire un arrêt des séances : des épisodes de **toxicité** caractérisés par une neutropénie, une thrombocytopénie, une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques, des signes digestifs (vomissements, diarrhée) ou généraux (perte de poids, léthargie) ont effectivement été rapportés [153], [154]. Une solution pour **diminuer la toxicité** liée à la chimiothérapie est de **combinaison la lomustine à la radiothérapie** (ou à la chirurgie, comme le montre l'étude de 2009 de Skorupski *et al.*, décrite ci-dessus [147]). Cela permet **d'augmenter la durée de survie médiane** par rapport à chaque thérapie prise séparément : **208 jours** contre 68 jours pour tous les autres individus recevant des traitements différents de cette combinaison [150]. En revanche, dans la forme hémophagocytaire du SH, l'effet de la lomustine reste limité, avec une durée médiane de survie de 24 jours après diagnostic [155].

D'autres molécules nitroso-urées, de la même famille que la lomustine, ont été testées dans certaines études, comme la **nimustine** (ou ACNU : 3-[(4-amino-2-méthyl-5-pyrimidinyl)méthyl]-1-(2-chloroéthyl)-1-nitrosourea hydrochloride), qui semble avoir un taux de réponse similaire à la lomustine (50% contre 55% pour la lomustine) mais une durée médiane de survie moindre (48 jours contre 111 jours pour la lomustine) [146].

- La **doxorubicine**, antibiotique cytotoxique utilisé en chimiothérapie, est une deuxième molécule intéressante dans le traitement des SH canins, en particulier en **association avec la lomustine**. En effet, quelques études rapportent son usage seule ou en combinaison avec la lomustine :
 - D'après Doka *et al.* (2022), ayant évalué l'efficacité de la **doxorubicine utilisée seule** sur trente-et-un chiens atteints de SH (sept localisés, vingt-quatre disséminés) de 2003 à 2017, par administration d'une dose moyenne de **26,9 mg/m²** par séance, **toutes les trois semaines**, avec une moyenne de **trois séances** de chimiothérapie par chien, la doxorubicine utilisée seule a un **bénéfice modeste** sur le SH. En effet, le taux de **réponse** a été de seulement **26%**, avec une durée médiane de **survie de 169 jours** et une durée médiane de survie sans progression de la maladie de 42 jours. Cette molécule ne présentant pas plus d'intérêt qu'une autre molécule de chimiothérapie utilisée seule, des recherches sont encore à mener pour connaître son intérêt en combinaison avec d'autres thérapies [156].
 - Un **protocole** de chimiothérapie combinant **doxorubicine et lomustine** a été testé sur dix-sept chiens atteints de SH (onze formes localisées, six formes disséminées) par Cannon *et al.* (2015). Ce protocole consistait en une administration orale de **70 mg/m² de lomustine** la semaine 1, **puis** une injection intraveineuse de **30 mg/m² de doxorubicine** (ou 1 mg/kg si le chien pesait moins de douze kilogrammes) la semaine 3. Ce cycle (administration de lomustine puis doxorubicine avec un intervalle de **deux semaines**) était poursuivi jusqu'à progression de la maladie ou **jusqu'à six cycles maximum**. Certains chiens (cinq) ont reçu également du cyclophosphamide, à une dose orale de 250 mg/m² divisés sur trois jours, à partir du troisième jour après administration de la doxorubicine. Ce protocole est assez prometteur, montrant un **taux de réponse global de 58%** et une durée **médiane de survie**

de 185 jours (de 18 à 402 jours), avec une durée médiane de survie sans progression de la maladie de 185 jours également (variant de 59 à 268 jours). Ainsi, cette association semble efficace et bien tolérée chez les chiens affectés de SH. Des études supplémentaires sont nécessaires pour préciser l'efficacité de ce protocole mais aussi sa potentielle toxicité. Les effets secondaires principalement rapportés dans cet article sont une **neutropénie**, une **thrombocytopénie**, ainsi que des **signes gastro-intestinaux** fréquents mais modérés [157].

D'autres molécules de chimiothérapie ont été testées sur le sarcome histiocytaire canin, mais sont **moins prometteuses** :

- **Dacarbazine** : une étude sur dix-sept chiens, traités avec 900–1000 mg/m² en intraveineuse toutes les trois semaines, montre un taux de réponse global de 17,6% avec une survie sans progression de la maladie de 70 jours chez les animaux montrant une réponse au moins partielle au traitement [158].
- **Epirubicine** : sur vingt-neuf chiens traités avec l'épirubicine seule (30 mg/m² toutes les trois semaines) ou en association avec la lomustine, le taux de réponse a été de 29%, avec une durée de survie médiane de 185 jours et une survie sans progression de la maladie d'environ deux mois [159].
- **Vinorelbine** : cette molécule a été testée sur neuf chiens atteints de SH. Quatre ont montré une absence de progression de la maladie sur deux mois (valeur médiane) ; et deux des chiens ont montré une réponse partielle ou complète à la radiographie (diminution ou disparition de métastases pulmonaires) pendant, respectivement, 2,1 ans (individu atteint de SH localisé au coude avec suspicion de métastases pulmonaires non confirmée par histologie) et 5,4 mois (SH splénique primaire retiré chirurgicalement, puis apparition de métastases pulmonaires [123], [160]).

Un espoir se place dans la **chimiothérapie métronomique** en utilisant la **lomustine** (2,84 mg/m²/jour oralement [161]) ou le **chlorambucil** (4 mg/m²/jour oralement [162]). Cela consiste en des administrations d'une **dose diminuée** de la molécule concernée, mais de manière **plus fréquente** et régulière. L'administration métronomique induirait la mort cellulaire différemment que celle obtenue avec l'administration conventionnelle à dose maximale tolérée. En effet, l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est le mécanisme induit par la chimiothérapie classique, tandis que la chimiothérapie métronomique peut induire l'**apoptose** mais aussi la **sénescence**, la **mort cellulaire non apoptotique** et la **mort cellulaire immunogène** (les cellules cancéreuses jouent le rôle d'antigènes et induisent une réponse immunitaire spécifique à la tumeur) [163]. La chimiothérapie métronomique avec la lomustine serait **assez bien tolérée**, avec comme effets secondaires une toxicité gastro-intestinale, une neutropénie, une thrombocytopénie, une azotémie ou une hépatotoxicose chez 40% des chiens traités (pour différents types de cancers) [161]. Cependant, le **chlorambucil serait mieux toléré**, avec une absence d'effets indésirables hématologiques, une toxicité gastro-intestinale modérée (anorexie, nausée, diarrhée, résolues par des traitements symptomatiques), et de rares cas de dermatite [162], [164].

La **durée de survie** des chiens atteints de cancer est **variable selon la nature et le stade du cancer** à l'initiation de la chimiothérapie métronomique de lomustine ou de chlorambucil.. Tripp *et al.* ont montré, dans une étude d'administration métronomique de lomustine chez des chiens présentant un cancer, que la durée médiane de survie chez des individus atteints d'ostéosarcome primaire et non métastasé est de 237 jours ; tandis qu'elle est seulement de 74 jours chez les individus atteints d'un ostéosarcome métastasé. En parallèle, des chiens atteints d'un hémangiosarcome métastasé ont une durée de survie médiane de 120 jours [161]. Selon Leach *et al.*, qui ont évalué l'efficacité de la chimiothérapie métronomique utilisant le chlorambucil, sur deux individus atteints de sarcome histiocytaire, un a montré une progression de la maladie ; en revanche, il a été observé une réponse partielle chez le second, avec une rémission de 273 jours [162].

D'autres molécules de chimiothérapie sont parfois utilisées, mais peu ou pas d'études **ont pu prouver leur efficacité**: vincristine, carboplatine, melphalan, temozolomide, mitoxantrone, bléomycine, méthotrexate, cytosine arabino-side, cladribine, vinblastine, tocéranib [127]. Une étude menée sur des cultures cellulaires de SH d'un Bouvier Bernois a montré une réponse favorable des cellules au **dasitinib**, thérapie anticancéreuse qui est donc prometteuse pour l'avenir [165].

b) Autres traitements systémiques

Les **biphosphonates**, molécules traditionnellement indiquées pour le traitement de l'ostéoporose, semblent avoir des effets **bénéfiques** sur le sarcome histiocytaire. En effet, ces molécules, notamment le **clodronate**, **inhibe les cellules phagocytaires** (macrophages et cellules dendritiques) *in vitro* et induit leur apoptose. Une étude pilote menée sur cinq chiens, traités avec du clodronate sous forme de liposome, a révélé une **régression significative** de la tumeur chez deux chiens [123], [166]. Ces médicaments semblent aussi utiles en association avec des molécules de chimiothérapie : par exemple, le **clodronate** combiné à la vincristine ou le **zolédronate** combiné à la doxorubicine ont montré une **augmentation significative des morts cellulaires** par apoptose sur des lignées cellulaires de SH [167].

D'autres traitements symptomatiques, aussi dits **palliatifs**, peuvent être utilisés de manière systémique, notamment les **corticostéroïdes**, dont l'usage a été associé à un **facteur pronostique négatif**, mais aussi les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les opioïdes, les antibiotiques, les antiacides, les antiémétiques, ou la gabapentine. Des médecines alternatives sont parfois utilisées. [127]

2.4. Oncologie comparée avec l'homme : le Bouviers Bernois comme modèle d'étude

Les désordres histiocytaires sont décrits chez l'Homme également, bien que les **formes cliniques** soient **différentes**. Ils sont également plus rares, les études sur l'épidémiologie, la clinique et la génétique de ces maladies sont donc moins fréquentes.

Le premier cas d'histiocytose maligne a été décrit pour la première fois chez l'Homme à la fin des années 1940 [131]. La **première classification des histiocytoses** humaines a été établie en **1987** par le groupe de travail de la société des histiocytes (WGHS : *Working Group of the Histiocyte Society*). Trois catégories étaient alors décrites : les histiocytoses à cellules de Langerhans, les histiocytoses non à cellules de Langerhans, et les histiocytoses malignes. Cette classification a été **mise à jour en 1997**, en faisant une simple dichotomie entre les désordres de comportement biologiques variés (désordres bénins, de sévérité clinique variable) et les histiocytoses malignes (relatives aux cellules dendritiques, aux macrophages et aux monocytes) [168], [169]. Une **nouvelle classification** des histiocytoses a été publiée en **2016**, exposant cette fois-ci **cinq catégories**, basées sur des caractéristiques cliniques, immuno-histologiques et génétiques :

- Le groupe « **L** » pour « **Langerhans** » : la pathogénie de ce groupe est intéressante, car elle implique des **mutations activatrices de la voie des MAPK** (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), *i.e.* les mutations BRAFV600E, MAP2K1, KRAS. Plusieurs entités y sont décrites :
 - **Histiocytose à cellules de Langerhans (LCH : *Langerhans Cell Histiocytosis*)** : incidence forte **avant l'âge d'un an**, avec quelques cas chez les adultes fumeurs. N'importe quel organe peut être affecté, mais les plus fréquemment atteints chez les enfants sont les **os** (80% des cas), la **peau** (33%) (Figure 24) et la glande pituitaire ou **hypophyse** (25%). Le foie, la rate, le système hématopoïétique et les poumons peuvent également être affectés (15% chacun), ainsi que les nœuds lymphatiques ou plus rarement le système nerveux central. L'atteinte est **systémique**, avec **risque de défaillance multi-organique**, et la progression de la tumeur est rapide. Histologiquement, les cellules histiocytaires sont souvent associées à des éosinophiles et à des cellules géantes multinucléées.
 - **Maladie de Erdheim-Chester (ECD : *Erdheim-Chester Disease*)**: la moyenne d'âge au diagnostic est de 55-60 ans. Le **squelette** est impliqué dans **plus de 95% des cas**, les lésions étant caractérisés par une **ostéoclérose** corticale bilatérale et symétrique des régions diaphysaires et métaphysaires (Figure 24). Des lésions cardiovasculaires sont également présentes dans 50% des cas. Les cellules, étant négatives pour le CD1a en immunohistochimie, cette maladie se distingue de l'histiocytose à cellules de Langerhans. L'évolution clinique est très hétérogène entre les patients, certains n'ayant que quelques symptômes tandis que d'autres ont une progression rapide qui aboutit à la mort. La **mortalité** pour cette maladie est de **60%**.
 - **Histiocytose à cellules indéterminées** : maladie cutanée isolée se développant chez des adultes en bonne santé, avec généralement une évolution bénigne [169], [170].

- Le groupe « **C** » pour « **Cutané et muco-cutané** » : ensemble de **maladies bénignes principalement cutanées**, quelques-unes ayant une composante systémique, présentant souvent une régression spontanée.
 - **Famille des xanthogranulomes** : comprend les formes cliniques juvénile et adulte ; le réticulo-histiocytome solitaire ; l'histiocytose céphalique bénigne ; l'histiocytose éruptive généralisée ; l'histiocytose nodulaire progressive ; le xanthome disséminé.
 - **Famille des maladies autres que les xanthogranulomes** : la forme cutanée de la maladie de Rosai-Dorfman (Figure 24) ; le xanthogranulome nécrobiotique ; la réticulo-histiocytose multicentrique [169], [170].



Figure 24 : Exemples d'atteintes cliniques par les histiocytoses humaines. D'après Emile *et al.*, 2016.

Exemples de manifestations: à gauche, chez un enfant atteint d'histiocytose à cellules de Langerhans (LCH) multisystémique ; au milieu : chez un adulte atteint de la maladie de Rosai-Dorfman. À droite : imagerie avec marquage au fluorodésoxyglucose (^{18}F) révélant un signal bilatéral et symétrique dans les fémurs, les tibias et les humérus chez un patient atteint de la maladie de Erheim-Chester (ECD). [170]

- Le groupe « **M** » pour les **histiocytoses « Malignes »** :
 - Le **sarcome histiocytaire** : touche les adultes, avec un âge médian de 55 ans. Ce cancer affecte communément les nœuds lymphatiques, les tissus mous et le tractus gastro-intestinal. Les caractéristiques immunohistochimiques des cellules sont similaires à celles décrites chez le chien. De l'érythrophagocytose peut également être observée. Chez l'homme, ce cancer est très rare, représentant moins de 1% de tous les cancers hématopoïétiques [8]. L'évolution est **rapide et agressive**, avec un taux de **mortalité de 58%**. Il n'y a pas de consensus établi concernant son traitement. La durée médiane de **survie** globale varie selon les études, mais est assez **brève** dans tous les cas : dans une étude réalisée sur six patients affectés entre 1989 et 2014, la durée de survie médiane était de **52 mois**, soit environ 4,3 ans [171] ; dans deux autres études, l'une ayant regroupé quatre cas entre 1989 et 2001, la seconde 159 cas entre 2000 et 2014, la durée de survie médiane était de **six mois** [172], [173].

- Le **sarcome à cellules indéterminées** : maladie **rare** avec peu de cas cliniques rapportés. Il s'agit d'une atteinte systémique avec une affection cutanée secondaire (papules, plaques, nodules).
 - Le **sarcome à cellules de Langerhans** : les individus atteints ont un âge médian de 50 ans. Cette forme est, comme le sarcome histiocytaire, **agressive et de mauvais pronostic**. L'atteinte peut être localisée à un site unique ou des sites multiples : nœuds lymphatiques principalement, puis peau, poumons, foie et rate.
 - Le **sarcome à cellules dendritiques folliculaires** : les adultes sont les principaux individus touchés par cette forme aussi. Cliniquement, ce type d'histiocytose est **souvent asymptomatique**, avec une lymphadénopathie cervicale insidieuse [169], [170].
 - D'autres auteurs incluent également, dans les formes malignes d'histiocytoses, le sarcome à **cellules interdigitées** et les tumeurs à **cellules fibroblastiques réticulaires** [171].
- Le groupe « **R** » pour la **maladie de « Rosai-Dorfman »** : cette maladie affecte principalement les **enfants et les jeunes adultes** ; elle est caractérisée par une **lymphadénopathie** cervicale bilatérale non douloureuse, associée à de la fièvre, des sueurs nocturnes, de la fatigue et une perte de poids. Cette forme est en général **bénigne et auto-limitée**, même si quelques cas de mortalité sont rapportés (5 à 11%) [169], [170].
 - Le groupe « **H** » pour les **lympho-histiocytoses « Hémophagocytaires »** : ce désordre histiocytaire rappelle la forme hémophagocytaire du sarcome histiocytaire. En effet, à l'histologie, de **l'érythrophagocytose** est observée dans la rate, la moelle osseuse et les nœuds lymphatiques. Les patients présentent, par ordre décroissant de fréquence, de la fièvre, une hépatomégalie, une splénomégalie, des signes nerveux, une éruption cutanée et une lymphadénomégalie. C'est une forme **rare et souvent fatale**. Elle résulte d'un **dérèglement immunitaire** aboutissant à **l'accumulation de macrophages activés** en grande quantité dans les organes et tissus. Cette histiocytose est soit primaire (forme héréditaire) soit secondaire (ou acquise) [169], [170].

Le **sarcome histiocytaire canin** étant issu principalement des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes, il peut être **assimilé** aux sarcomes à cellules dendritiques humaines, soit **l'ensemble du groupe M des histiocytoses malignes, dont bien sûr le sarcome histiocytaire humain**, mais également à la **forme disséminée de l'histiocytose maligne à cellules de Langerhans (LCH)**, bien que seuls de rares cas de sarcomes histiocytaires canins aient pour origine des cellules de Langerhans [120]. En outre, les formes disséminées de sarcome histiocytaire canin miment d'autres cancers humains, comme le **lymphome à grandes cellules anaplasiques**. Du point de vue histologique, les cellules des désordres histiocytaires canins et humains sont similaires, avec une forme ronde ou parfois fusiformes et la nécessité d'identifier le phénotype immunohistochimique pour obtenir un diagnostic précis et fiable [118].

Ainsi, le sarcome histiocytaire canin semble être un **bon modèle pour l'oncologie humaine**, étant donné la rareté des cas et l'agressivité de ses équivalents en médecine humaine. La nosologie, l'étiologie et la pathogénie de ces affections restent largement méconnues. Le Bouvier Bernois peut donc être un modèle spontané pour le sarcome histiocytaire et ses équivalents humains, permettant l'exploration des mécanismes génétiques et des pistes thérapeutiques les plus prometteuses [120]. **L'argument génétique** vient étayer cette proposition. En effet, des **délétions de nucléotides et des altérations du nombre de copies** des gènes (ou CNA : *Copy Number Alterations*) sont rapportées pour les gènes suppresseurs de tumeurs **CDKN2A** (présent sur l'haplotype CFA11 du chien, haplotype homologue à la région chromosomique 9p21 chez l'homme), **TP53 et MDM2** (*Murine Double Minute 2* : protéine régulant négativement p53), aussi bien dans les proliférations histiocytaires **du chien et de l'homme**. La pathogénie des désordres histiocytaires étant possiblement proches entre ces deux espèces, il y a donc un grand intérêt à étudier le sarcome histiocytaire du Bouvier Bernois dans une perspective de **recherche translationnelle** chez l'homme [33], [137], [174].

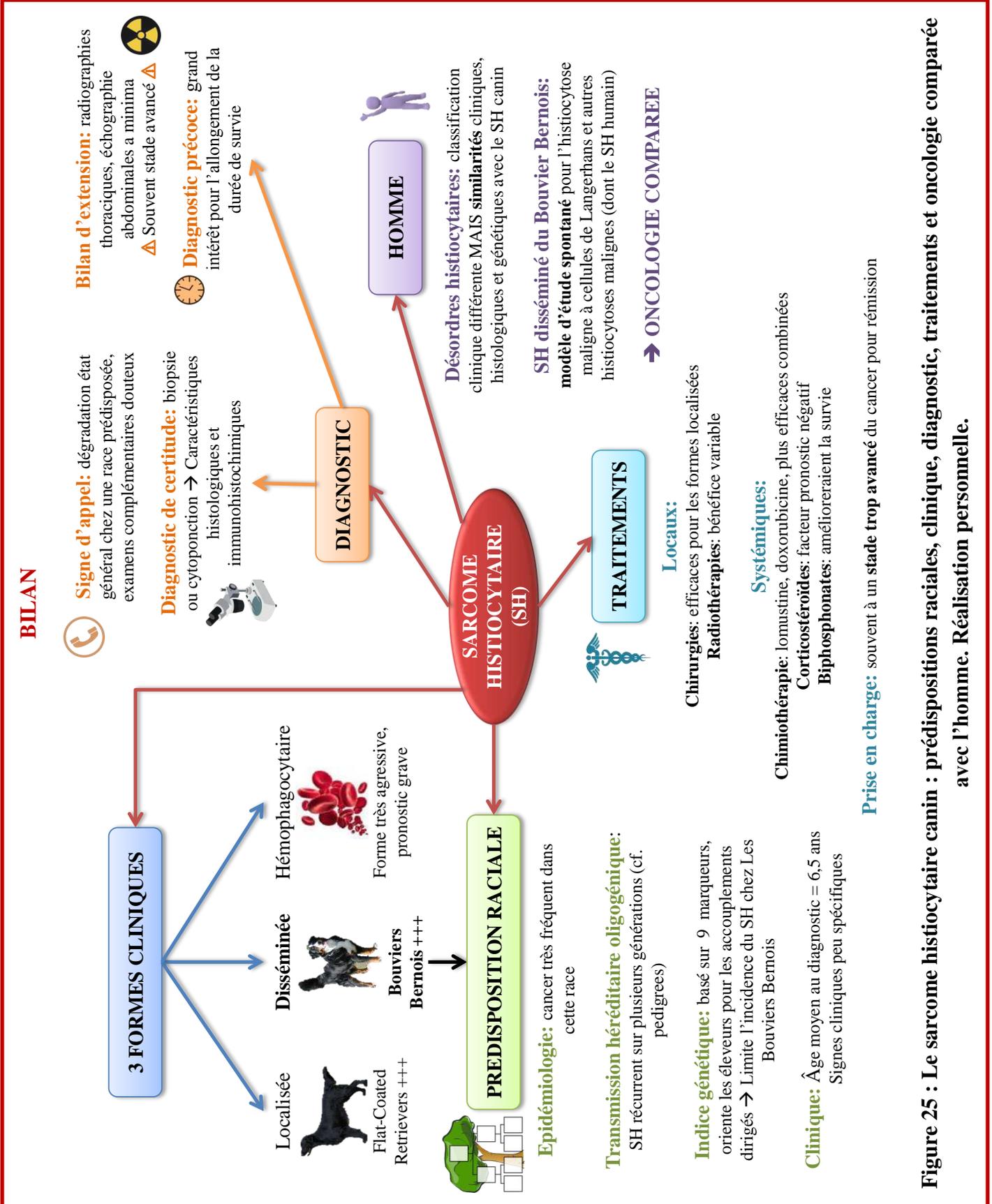


Figure 25 : Le sarcome histiocytaire canin : prédispositions raciales, clinique, diagnostic, traitements et oncologie comparée avec l'homme. Réalisation personnelle.

3. Le gène *PTPN11*, principal gène muté dans le sarcome histiocytaire

3.1. Gène *PTPN11* : structure et localisation

Pour rappel, chez le **chien** *Canis lupus familiaris*, le caryotype est constitué de 39 paires de chromosomes, soit 38 paires d'autosomes et une paire de chromosomes sexuels [175]. Le gène *PTPN11*, pour *Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type 11* (protéine tyrosine phosphatase non réceptrice de type 11), est situé sur le **chromosome 26**. Il est composé de **seize exons**, un exon étant un « *segment d'une chaîne d'ADN dont le transcrit dans le pré-ARNm subsiste après excision-épissage dans l'ARN messenger, par opposition à l'intron, segment dont le transcrit est éliminé au cours de la maturation du pré-ARNm* » [20], [176].

Chez l'homme *Homo sapiens*, le caryotype est constitué de 23 paires de chromosomes, dont une paire de chromosomes sexuels. Le gène *PTPN11* se localise sur le **chromosome 12**, et plus précisément sur le locus chromosomique **12q24.13**. Il compte également **seize exons**. L'exon 1 contient le codon d'initiation (ATG) ; le codon stop est inclus dans l'exon 15. Ainsi, l'exon 16 n'est jamais transcrit. La transcription du gène *PTPN11* aboutit à un pré-ARNm (ARN messenger) de **7 kilobases** (une kilobase correspondant à une longueur de 1000 bases d'ARN). Ce transcrit est retrouvé dans de **nombreux tissus** : cœur, poumons, foie, cerveau, muscles squelettiques, reins et pancréas ; les concentrations basales dans le **cœur** et les **muscles squelettiques** étant les plus élevées. Après excision-épissage, l'ARNm prédominant chez l'homme comporte **1779 paires de bases** dans son cadre de lecture (ou ORF : *Open Reading Frame*, portions de l'ARNm qui sont traduites en une séquence d'acides aminés afin de former une protéine). Cet ARNm, après traduction, permet la production d'une **protéine de 593 acides aminés (552 acides aminés chez le chien)**, la protéine **SHP-2** (*Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2* : protéine tyrosine phosphatase 2 contenant le domaine d'homologie *Src* 2) (**Figure 26**). Un second ARNm, comportant douze paires de bases supplémentaires issues de l'exon 11, est également connu ; néanmoins peu d'informations sont disponibles au sujet de ce transcrit [177]–[181].

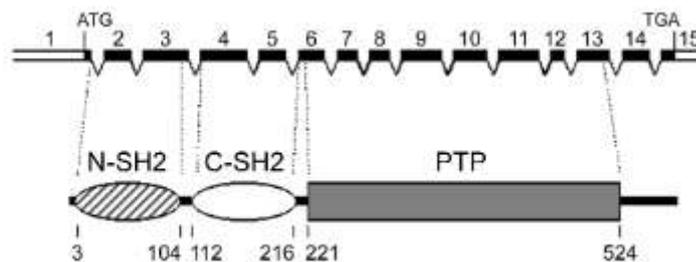


Figure 26 : Organisation du gène *PTPN11* humain et structure de la protéine SHP-2 associée. D'après Tartaglia *et al.*, 2001.

Les exons codants du gène *PTPN11* sont représentés en haut par des cases noires numérotées, et les positions des codons ATG et TGA sont indiquées. Les domaines fonctionnels de la protéine SHP-2, comprenant deux domaines SH2 disposés en tandem à l'extrémité N (N-SH2 et C-SH2), suivis d'un domaine protéine tyrosine phosphatase (PTP), sont présentés sous le gène *PTPN11*. Les numéros figurant sous la structure des domaines indiquent les limites des acides aminés de ces domaines. [182]

3.2. Le gène *PTPN11* code pour la protéine SHP-2

3.2.1. La protéine SHP-2 appartient à la famille des PTPs (Protéines Tyrosine Phosphatases)

Comme expliqué ci-dessus, le gène *PTPN11* code la protéine SHP-2, qui a été identifiée au début des années 1990. Cette protéine fait partie de la famille des protéines tyrosine phosphatases (PTPs). Les PTPs sont des **molécules de signalisation** régulant un **grand nombre de mécanismes cellulaires**, notamment la croissance cellulaire, la différenciation, la mitose, l'adhésion, la migration et la transformation oncogénique. Le premier représentant de cette famille a été découvert en 1988, c'est la protéine **SHP-1** (ou PTPN6), qui est exprimée majoritairement dans les cellules hématopoïétiques, et dans une moindre mesure dans des cellules épithéliales, dont des lignées cellulaires de cancer du sein. Aujourd'hui, cent-sept PTPs sont connues et codées par le génome humain [177], [178], [183]. Les PTPs **lysent la liaison entre le résidu phosphate et l'acide aminé tyrosine** sur les substrats cellulaires concernés. Par cette fonction, elles **s'opposent aux tyrosine-kinases**, enzymes ajoutant un groupe phosphate sur le substrat cible. En cancérologie, l'activation oncogénique des kinases est bien connue, et des thérapies anticancéreuses visant à diminuer l'activité de ces kinases ont été développées. Des études ont montré que les PTPs, par opposition aux kinases, peuvent jouer un **rôle suppresseur de tumeur**. Par exemple, PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), codant une PTP, est un des gènes suppresseurs de tumeurs le plus fréquemment muté en cancérologie humaine [184]. Parallèlement, certaines PTPs, dont SHP-2, régulent positivement la voie de signalisation des récepteurs aux facteurs de croissance, et **peuvent donc également être oncogéniques** [183].

Par ailleurs, les PTPs se divisent en deux groupes : les **protéines en forme de récepteurs**, possédant un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire, et les **protéines non réceptrices**, entièrement intracellulaires, mais situées spécifiquement à différentes localisations dans la cellule. La protéine **SHP-2 étant entièrement intracellulaire**, elle fait partie de la deuxième catégorie. De plus, elle se trouve préférentiellement proche de la membrane plasmique [183]. C'est donc une protéine cytoplasmique **ubiquitaire**, présente majoritairement dans le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau [177].

3.2.2. Structure de la protéine SHP-2

Les informations fournies par la suite sont issues essentiellement de la littérature en médecine humaine, même si la protéine SHP-2 canine est similaire dans sa structure.

La protéine SHP-2 contient **deux domaines SH2, pour Src homology 2** (Src prononcé « Sarc », pour l'abréviation de sarcome [185]) ; l'un est à l'extrémité N-terminale, le second à l'extrémité C-terminale (Figure 27). Ils correspondent aux sites de liaison aux tyrosines phosphorylées, qu'ils reconnaissent spécifiquement. Cette spécificité est plus marquée pour le **domaine C-SH2**, capable de se lier sélectivement à une unique séquence consensus, tandis que le **domaine N-SH2** peut se lier à quatre séquences différentes. Si un substrat comporte plusieurs tyrosines phosphorylées, chacune va se fixer sur un des deux domaines SH2, ce qui va contribuer à maintenir la conformation « ouverte », *i.e.* active, de SHP-2. Une protéine étant au moins bi-phosphorylée va donc entraîner un niveau d'activité plus important et plus spécifique de SHP-2. Cependant, une protéine mono-phosphorylée viendra se lier via sa tyrosine phosphorylée au domaine N-SH2, moins spécifique ; cette **liaison au domaine N-SH2 est indispensable à l'activation** de la protéine SHP-2.

Ces deux domaines SH2 sont en tandem, adjacents au **domaine catalytique PTP** (*Protein Tyrosine Phosphatase*), d'une longueur d'environ 300 acides aminés (Figure 27). Au sein de ce domaine PTP se trouve un site hautement conservé contenant un résidu d'acide aminé, la **cystéine** (position 459 sur la protéine humaine), qui est **essentielle** pour l'activité catalytique du domaine PTP.

Enfin, l'extrémité C-terminale, hydrophobe, contient **deux sites de phosphorylation de la tyrosine** (positions 542 et 580 chez l'homme, selon les sources les plus récentes), suggérant que SHP-2 peut interagir avec d'autres molécules contenant des domaines SH2, ce qui peut participer à la régulation de son activité (Figure 27) [177], [179], [183], [186]–[190].



Figure 27 : Organisation structurale des domaines de la protéine SHP-2 humaine.
D'après Matozaki *et al.*, 2009.

La SHP-2 contient deux domaines SH2 en tandem (N-SH2 et CSH2), un seul domaine de protéine tyrosine phosphatase (PTP) et une queue hydrophobe COOH-terminale qui comprend des sites de phosphorylation de la tyrosine. Les numéros de résidus des acides aminés qui délimitent les différents domaines ou qui correspondent aux sites de phosphorylation sont indiqués. [186]

3.2.3. Régulation intramoléculaire de la protéine SHP-2

Comme expliqué ci-dessus, la liaison d'un substrat phosphorylé au domaine de liaison N-SH2 est indispensable au passage de la protéine SHP-2 sous sa forme active ou « ouverte ». En effet, les différentes études biochimiques, enzymatiques et cristallographiques menées sur SHP-2 ont révélé que le **site catalytique du domaine PTP est obstrué**, dans les conditions basales, **par le domaine N-SH2** (Figure 28). Ainsi, dans une cellule saine, l'activité catalytique basale de SHP-2 est faible en raison de son inhibition par cette interaction intramoléculaire, médiée par des **liaisons hydrogène** (Figure 29). La protéine a alors une conformation inactive, auto-inhibée, dite « fermée », favorisée dans les conditions basales. Lorsqu'un **phosphopeptide se lie au domaine N-SH2**, celui-ci se déplace et **libère le site actif** du domaine PTP (Figure 28). La protéine change ainsi de conformation, ce qui **lève l'auto-inhibition** et entraîne son activation. Le domaine C-SH2, quant à lui, n'interagit pas de cette manière [186], [187], [189], [191].

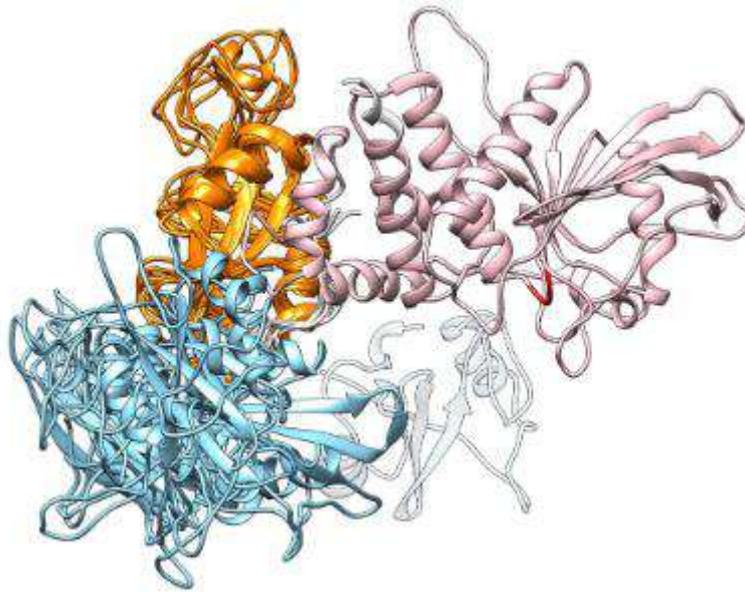


Figure 28 : Représentation de la protéine SHP-2. D'après Marasco *et al.*, 2023.

Le domaine C-SH2 est coloré en **orange**, le domaine N-SH2 en **cyan** et le domaine PTP en **rose**. Le domaine N-SH2 dans la structure auto-inhibée est représenté par un ruban **transparent**. La boucle catalytique de la PTP est indiquée en **rouge**. [187]

Bien que les phosphopeptides monovalents à haute affinité soient des activateurs de la SHP2 en raison de leur liaison à N-SH2, les **peptides bisphosphorylés** tels que les BTAM (*Bisphosphoryl Tyrosine-Based Activation Motifs* : motifs d'activation basés sur des tyrosines bisphosphorylées) **sont de loin les activateurs les plus puissants** en raison de leur interaction simultanée avec N-SH2 et C-SH2. La conformation ouverte de SHP2 est en effet mieux stabilisée dans ce dernier cas. Ce constat a été confirmé par des expériences de délétion du domaine C-SH2 : lors de mise en commun de ces protéines SHP-2 avec des peptides biphosphorylés, ceux-ci avaient une puissance moindre qu'avec des protéines SHP-2 entières. Cela suggère donc que **les deux domaines SH2** lient les complexes protéiques phosphorylés de manière **synergique** afin de **mieux stabiliser la forme ouverte** de SHP-2 [187]–[189], [191].

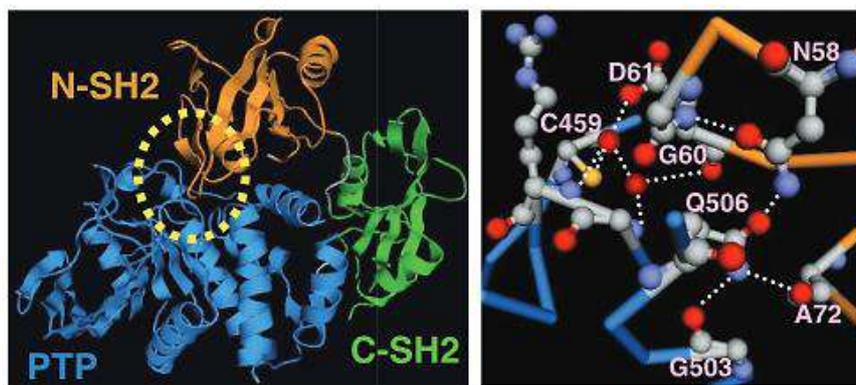


Figure 29 : Diagramme en ruban de la structure cristalline de la protéine SHP-2 humaine à gauche. L'encart à droite représente la zone encadrée en jaune sur le diagramme de gauche. D'après Matozaki *et al.*, 2009.

À *gauche* : les domaines SH2 NH₂- et COOH-terminal sont représentés en brun et en vert, respectivement. Le domaine PTP est représenté en bleu. À *droite* : sphère rouge : oxygène ; sphère blanche : carbone ; sphère bleue : azote ; sphère jaune : soufre. La **région encadrée en jaune** à gauche est représentée à droite, montrant les acides aminés qui participent à la formation de liaisons hydrogène (lignes pointillées), permettant l'interaction du domaine N-SH2 avec le domaine PTP. [186]

Il est intéressant de remarquer que plusieurs des **acides aminés participant à la formation de liaisons hydrogène** sont ceux concernés par les **mutations gain de fonction** de la protéine SHP2, impliquées dans des maladies humaines comme le syndrome de Noonan ou la leucémie myélomonocytaire juvénile, ou impliquées dans le sarcome histiocytaire canin. Ces mutations, en modifiant l'interaction intramoléculaire entre les domaines N-SH2 et PTP, entraînent un **changement de conformation permanent** de SHP2, et son **activation constitutive**. Dans la partie expérimentale de cette thèse, nous montrerons en effet que des mutations touchant les acides aminés G60, A72 et G503 ont été étudiées dans le cadre du diagnostic du sarcome histiocytaire canin (Figure 29) [186], [187], [192].

3.2.4. Rôle de la protéine SHP-2 dans les voies de signalisation intracellulaire

Comme expliqué dans la partie 3.2.1, les protéines tyrosine phosphatases (PTPs) ont un rôle important dans les **voies de signalisation cellulaire**, avec une action opposée mais complémentaire avec celle des protéines kinases. Les premières lysent le groupement phosphate des peptides intracellulaires tandis que les secondes le fixent. Par ailleurs, dans la **voie** de signalisation des **MAPK** (*Mitogen-Activated Protein Kinases* : kinases nécessaires à l'induction de la mitose), ces deux familles sont impliquées dans le contrôle de la réponse à la cascade de signalisation moléculaire : les kinases contrôlent l'amplitude, l'intensité de cette réponse, tandis que les **phosphatases contrôlent le taux et la durée de la réponse** [188].

A) Présentation de la voie MAP-Kinase

Pour mieux comprendre le rôle de la protéine SHP-2 dans les voies de signalisation cellulaire, une présentation brève de la voie MAP-Kinase s'impose.

Au commencement de cette voie, on trouve des récepteurs transmembranaires :

- les **récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs)**, se liant à des facteurs de croissance extracellulaires, peptides ou hormones peptidiques. Ils existent sous forme de dimères préformés, ou se dimérisent suite à la fixation à leur ligand (Figure 30) [193], [194],
- les **récepteurs à cytokines**.

Ces récepteurs engendrent un **signal de transduction hautement conservé** au sein de toutes les cellules mammaliennes, impliquant une cascade d'activation de différentes protéines (Figure 30, Figure 31), dont les dernières, et les plus connues en cancérologie (en raison de leurs mutations oncogéniques, déjà en partie explorées) sont, dans l'ordre chronologique d'activation [193] :

1. **La protéine Ras**, abréviation issue de « Rat sarcoma » [195], est une protéine **GTPase** (Guanosine Triphosphate phosphatase), faisant partie de la famille des protéines G, codée par le proto-oncogène c-ras et également dénommée p21. Elle peut être ancrée sur la face interne de la membrane plasmique grâce à un radical palmitoylé et à un radical farnésyl hydrophobe attachés à la protéine. Elle lie le GDP (Guanosine Diphosphate) sous sa forme inactive ou le **GTP** (Guanosine Triphosphate) sous sa forme active, **qu'elle hydrolyse en GDP** (Figure 30, Figure 31). L'activité de Ras est généralement de courte durée, en raison de son activité GTPase intrinsèque lysant le GTP en GDP et lui conférant ainsi un état inactif. Il est à noter

que la protéine mutée correspondant à l'**oncogène Ras** n'en diffère que par une **simple substitution** d'une glycine par une valine ; cette protéine mutée fixe aussi le GTP, mais **l'activité GTPase ne s'exerce pas**, maintenant ainsi le complexe Ras-GTP dans un état actif (Figure 30) [20], [193], [194].

2. La protéine **Raf** (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* [195]) est une protéine sérine/thréonine kinase. La protéine Ras active, *i.e.* liée au GTP, **se lie au domaine régulateur N-terminal de Raf**. Raf est alors **activée**. Puis Ras hydrolyse son propre groupe GTP en GDP, ce qui libère la protéine Raf activée de sa liaison avec Ras (Figure 30, Figure 31) [20], [193]. Des protéines **Raf mutées**, ne possédant plus leur domaine N-terminal, sont **activées constitutivement** et ne nécessitent pas la cascade en amont, ce qui permet aux cellules de proliférer sans stimulation par des facteurs de croissance [193].

Raf, après son activation par Ras, va **activer la MAP-Kinase en aval en la phosphorylant** à son tour. Ainsi, la cascade de signalisation de la voie MAP-Kinase se poursuit (Figure 30, Figure 31).

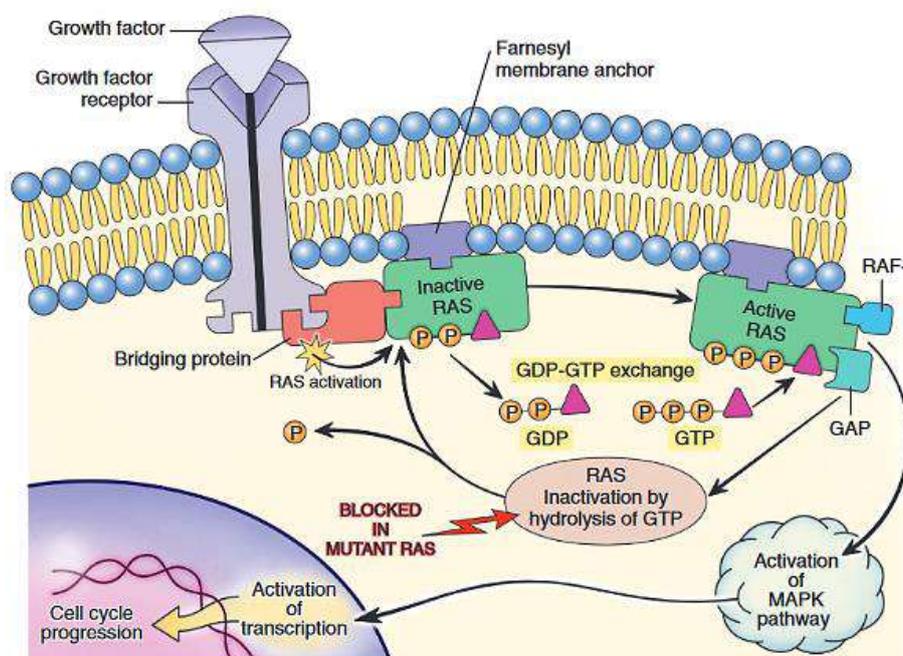


Figure 30 : Modèle d'action de la protéine RAS. D'après Newkirk *et al.*, 2017.

Lorsqu'une cellule normale est stimulée par un récepteur de facteur de croissance, la protéine RAS inactive passe à l'état actif en échangeant un groupe GDP contre un groupe GTP. La RAS activée active à son tour RAF-1 pour stimuler la signalisation par la voie de la MAP-Kinase. Cela conduit finalement à la transcription des gènes qui dirigent la progression du cycle cellulaire.

Dans les cellules normales, la protéine RAS activée est inactivée par la protéine GAP (Guanosine triphosphatase)–Activating Protein : Protéine d'Activation de l'activité Guanosine Triphosphatase, ou activité GTPase), qui stimule l'activité GTPase de RAS, mettant ainsi fin à la signalisation par la voie RAS-RAF-MAPK. Cependant, dans les cellules cancéreuses, les protéines RAS mutantes ne peuvent pas être inactivées de cette manière ; elles stimulent donc la progression continue du cycle cellulaire. L'ancrage de RAS à la membrane cellulaire par le radical farnésyl, hydrophobe, est essentiel à son action. [194]

3. **Les protéines MAP-Kinases**, qui sont toutes des protéines tyrosine/sérine et thréonine kinases, phosphorylent les résidus sérine/thréonine et tyrosine des MAPK en aval dans la cascade de signalisation (Figure 31). Ces MAPK peuvent se subdiviser, selon la chronologie de leur activation :

- Les **MAP-kinase-kinase-kinases** ou MAP3K ou protéines **MEK** (*MAPK kinase/ Extracellular-signal Regulated kinase*), phosphorylant :
- Les **MAP-kinase-kinases** ou MAP2K ou protéines **ERK** (*Extracellular signal Regulated Kinase*), phosphorylant elle-même :
- Les **MAP-kinases**. Ces dernières MAPK **phosphorylent à leur tour des MAPK intranucléaires**, dont des facteurs de transcription régulant la réponse cellulaire à un facteur de croissance, une hormone ou une cytokine. Elles peuvent également phosphoryler d'autres kinases cytoplasmiques [20], [193], [195].

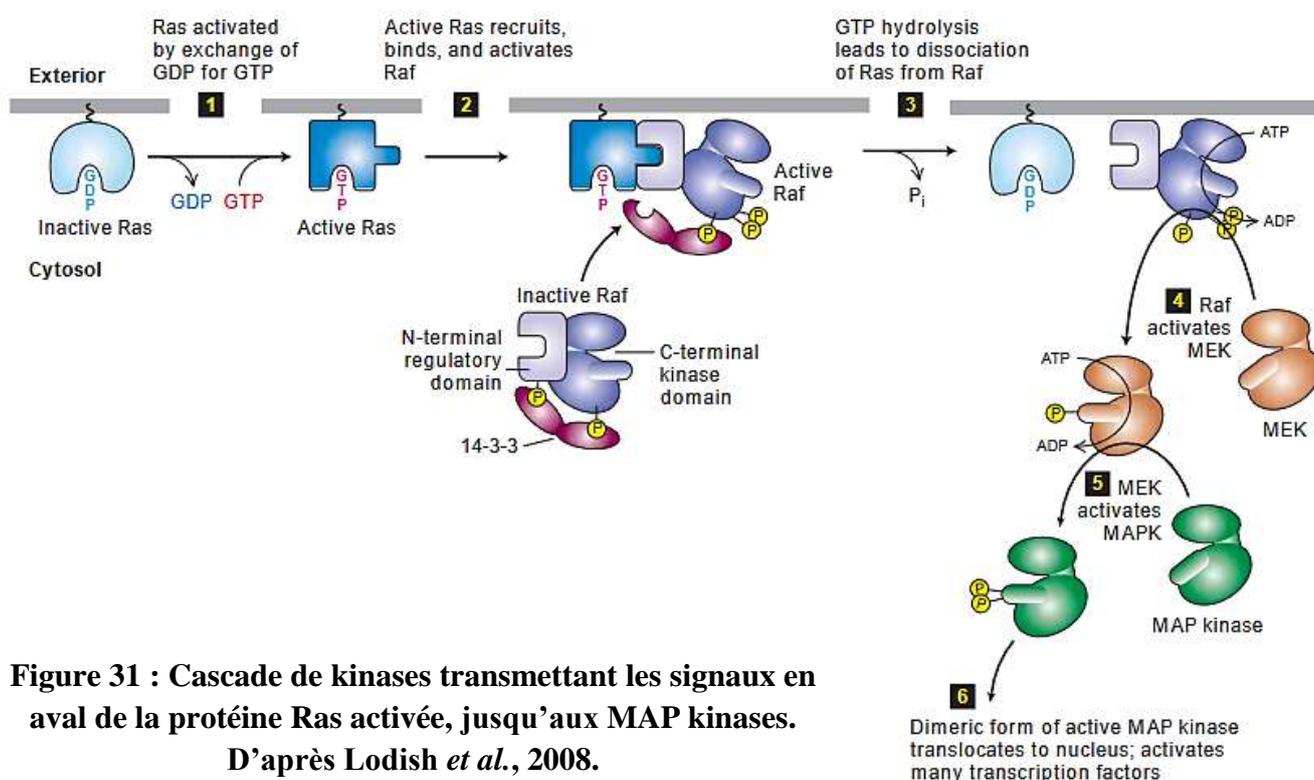


Figure 31 : Cascade de kinases transmettant les signaux en aval de la protéine Ras activée, jusqu'aux MAP kinases.
D'après Lodish *et al.*, 2008.

Dans les cellules non stimulées, la majeure partie des protéines Ras est sous forme inactive avec du GDP lié ; la liaison d'un ligand à son récepteur RTK ou à son récepteur à cytokine entraîne la formation du complexe actif Ras-GTP (étape 1). La protéine Ras activée déclenche la cascade de kinases en aval décrite dans les étapes 2 à 6, aboutissant à l'activation de la MAP-Kinase.

Dans les cellules non stimulées, la liaison de la protéine 14-3-3 à Raf la stabilise dans une conformation inactive, et la maintient dans le cytosol cellulaire. L'interaction du domaine régulateur N-terminal de Raf avec Ras-GTP lève cette inhibition, entraîne la déphosphorylation d'une des sérines qui lie Raf à 14-3-3 et conduit à la stimulation de l'activité kinase de Raf (étapes 2 et 3). Il est à noter que, contrairement à de nombreuses autres protéines kinases, l'activation de Raf ne dépend pas de la phosphorylation de la boucle d'activation. Une fois que le Ras-GDP inactif se dissocie de Raf, il peut vraisemblablement être réactivé par des signaux provenant de récepteurs activés, recrutant ainsi d'autres molécules Raf à la membrane. [193]

De **nombreux acteurs moléculaires** participent à la **voie** de signalisation des **MAP-Kinases**, centrale dans toutes les cellules, ce qui complexifie la compréhension des mécanismes la régulant. La protéine SHP-2, codée par le gène *PTPN11*, contribue au contrôle de cette voie, par des mécanismes encore aujourd'hui mal connus, mais impliquant plusieurs autres protéines.

B) Rôle de SHP-2 dans la voie MAP-Kinase

a) Ligands ou substrats de la protéine SHP-2

Au sein de la voie MAP-Kinase décrite ci-dessus, et dans d'autres voies de signalisation, la protéine **SHP-2 régule positivement** la cascade de signalisation :

- soit par **interaction directe** avec un récepteur tyrosine-kinase (**RTK**) phosphorylé, auquel elle se lie ;
- soit par **interaction indirecte** avec un RTK, en se **liant à des protéines adaptatrices**, à tyrosine(s) phosphorylée(s), **elles-mêmes fixées à un RTK**.

Les différents récepteurs RTKs auxquels la protéine SHP-2 peut se lier, sont des récepteurs à des facteurs de croissance, à des cytokines ou à des hormones (liste non exhaustive) :

- le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes, **PDGFR** (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*) ;
- le récepteur de l'insuline, **IR** (*Insulin receptor*) ;
- le récepteur du facteur de croissance analogue à l'insuline 1, **IGF1-R** (*Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*) ;
- le récepteur du facteur de croissance épidermique, **EGF-R** (*Epithelial Growth Factor Receptor*) ;
- le récepteur du facteur de croissance des fibroblastes, **FGFR** (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) ;
- le récepteur du **GM-CSF** (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor receptor*)
- le récepteur **KIT**, dont le ligand est le facteur de croissance des cellules souches ou **SCF** (*Stem Cell Factor*). Il est à noter que ce récepteur, codé par le proto-oncogène c-kit, est en cause dans plusieurs cancers, notamment les formes agressives de mastocytome canin, pour lequel des thérapies ciblées ont été développées ;
- le récepteur **FLT-3**, pour *Fms-Like Tyrosine kinase 3* (membre de la famille des récepteurs à tyrosine kinase de classe III, qui comprend KIT, FMS et les PDGFR) ;
- le récepteur de l'érythropoïétine, hormone stimulant la fabrication d'érythrocytes (**EPO-R** : *Erythropoietin Receptor*) ;
- le récepteur de l'hormone **prolactine** ;
- le récepteur à l' **α -thrombine** ;
- le récepteur glycoprotéine **gp130**, commun à plusieurs cytokines dont celles de la famille de l'**interleukine 6** ;
- les récepteurs des interleukines 1, 2, 3 et des interférons.

Une fois qu'un de ses récepteurs a **fixé son ligand** spécifique, le récepteur va **s'autophosphoryler** grâce à sa partie kinase intracellulaire, ce qui va permettre la **stimulation de la suite** de la cascade de signalisation [177], [186], [189], [193].

Comme expliqué ci-dessus, la protéine SHP-2 peut également se lier à des **protéines adaptatrices**, elles-mêmes **liées aux RTKs**. Ces protéines adaptatrices peuvent être transmembranaires, elles sont alors appelées protéines d'arrimage ou **d'ancrage** (*docking proteins*). Cette localisation permet de recruter SHP-2 au plus proche de la membrane plasmique, lieu où se trouvent les acteurs moléculaires en jeu dans la voie en aval. Elles peuvent également être cytosoliques et jouer le rôle de « protéines **d'échafaudage** » (*scaffold proteins*), protéines fournissant une plateforme pour réunir et coordonner plusieurs molécules de signalisation. Toutes ces protéines adaptatrices sont **phosphorylées** par les RTKs ou par des kinases de la famille Src (SFK : *Src Family Kinase*), ce qui **permet leur activation** [177], [186], [193], [196].

Ces protéines adaptatrices sont diverses correspondent entre autres à :

- Des **protéines cytosoliques** :
 - les substrats du récepteur de l'insuline, IRS (*Insulin Receptor Substrate*), dont **IRS-1** ;
 - la protéine **GRB2** (*Growth factor Receptor-Bound protein 2* : protéine liée au récepteur de facteur de croissance 2)
 - les protéines de liaison associées à GRB2, **GAB1** ou **GAB2** (*GRB2-Associated-Binding protein*) ;
 - le substrat du récepteur du facteur de croissance des fibroblastes, **FRS** (*Fibroblast growth factor Receptor Substrate*) ;
 - la Janus Kinase 2 (**Jak2**) ;
 - la sous-unité régulatrice **p85** de l'enzyme **PI3K** (*Phosphoinositide 3-Kinase*) ;

- Des **protéines membranaires** :
 - la protéine de mort cellulaire programmée **PD-1** (*Programmed cell Death protein 1*), récepteur CD279, de la famille des immunoglobulines, représentant un checkpoint immunitaire, en inhibant les lymphocytes T, ce qui supprime la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T [187], [197] ;
 - la protéine α régulatrice du signal, **SIRP α** (*Signal Regulatory Protein α*) ;
 - la molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires 1, **PECAM1** (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*) ;
 - le récepteur inhibiteur des cellules tueuses, **KIR** (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor*).

Ces interactions avec les RTKs directement, ou avec les protéines adaptatrices liées aux RTKs, **entraînent l'activation de SHP-2**, ce qui permet généralement de rapprocher SHP-2 de la membrane, où se trouvent ses substrats (cf. b) Fonctionnement de la signalisation en amont des MAP-Kinases, sans la participation de SHP-2) ([Figure 32](#)) [177], [186], [189].

Plusieurs de ces récepteurs ou protéines adaptatrices sont impliqués dans d'autres voies de signalisation : la **voie Janus Kinase (JAK)** - *Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT* : transducteur du signal et activateur de la transcription, protéines phosphorylées par JAK avec translocation dans le noyau afin de réguler l'expression génique) ; la **voie PI3K** (Phosphoinositide 3-Kinase) – **AKT** (ou protéine kinase B) - **mTOR** (*Mammalian Target Of Rapamycin* : cible mammalienne de la rapamycine) ; et la voie du facteur de transcription **NF- κ B** (*Nuclear Factor-kappa B*), impliquée dans la régulation du système immunitaire. De la même manière que pour la voie MAP-Kinase, la protéine **SHP-2 va jouer le rôle d'intermédiaire** entre les récepteurs ou protéines adaptatrices, et les

substrats en aval dans la cascade de signalisation. Ainsi, SHP-2 **régule positivement ou négativement différents signaux de transduction**, selon la voie et les substrats auxquels elle se lie ; en effet les études ne présentent pas toutes les mêmes observations concernant l'influence de SHP-2 (Figure 32) [179], [183], [196], [198].

D'autres substrats de la SHP2 continuent d'être identifiés, comme la protéine de voûte majeure (*vault protein*), qui pourrait servir de protéine d'échafaudage régulant également la voie Ras-MAPK [183].

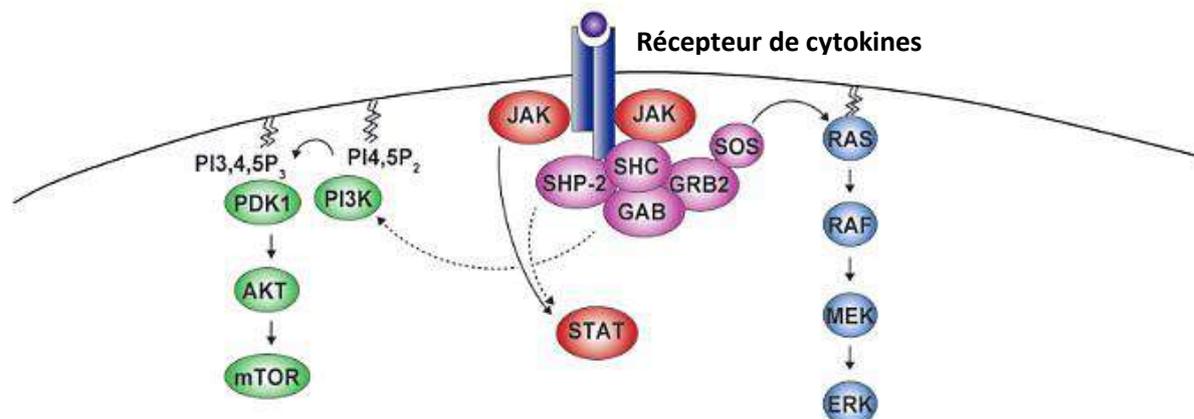


Figure 32 : SHP-2 dans les voies de signalisation des récepteurs de cytokines.
D'après Niogret *et al.*, 2019.

La liaison de la cytokine au récepteur induit la formation du complexe contenant SHP-2. Outre son rôle dans l'activation d'ERK, la SHP-2 peut moduler l'activité de la Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K). PI3K assure la médiation de la conversion du Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI4,5P₂) en Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PI3,4,5P₃), ce qui entraîne le recrutement de la Phosphoinositide-Dépendante Kinase 1 (PDK1), la phosphorylation de l'AKT et l'activation de la cible mammalienne de la rapamycine (mTOR). Les résidus phosphorylés par les Janus Kinases (JAK) dans la partie cytoplasmique du récepteur servent de sites de liaison pour les protéines STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), qui sont à leur tour phosphorylées par les JAK, ce qui permet la dimérisation et la translocation nucléaire. Cette voie peut également être modulée par la SHP-2. [196]

b) Fonctionnement de la signalisation en amont des MAP-Kinases, sans la participation de SHP-2

Dans la voie MAP-Kinase classique, sans intervention de SHP-2, suite à l'activation d'un récepteur tyrosine kinase (RTK) par autophosphorylation, la protéine GRB2 est recrutée. En effet, elle possède un domaine SH2 se liant à une tyrosine phosphorylée du RTK. Elle présente également trois domaines SH3, se liant à des séquences riches en proline. Ainsi, la protéine GRB2 activée va se lier à la séquence riche en proline C-terminale de Sos (*Son of Sevenless*) et former ainsi un complexe GRB2-Sos. Cela entraîne un recrutement et une translocation de plusieurs protéines Sos cytoplasmiques vers la membrane, résultant en une forte concentration de Sos activées à proximité de la protéine Ras, elle-même membranaire. Sos est un facteur d'échange de nucléotide à guanine permettant le remplacement d'un GDP par un GTP sur la protéine Ras. Ras est donc activée grâce à Sos. La suite de la cascade Raf/MEK/ERK/MAPK peut alors se dérouler (Figure 33) [177], [186], [193], [199], [200].

La protéine adaptatrice Gab, protéine de liaison à GRB2 (*GRB2-Associated-Binding protein*), peut jouer le rôle de protéine d'échafaudage pour GRB2, SHP-2 et Sos, facilitant ainsi la formation du complexe GRB2-Sos [183].

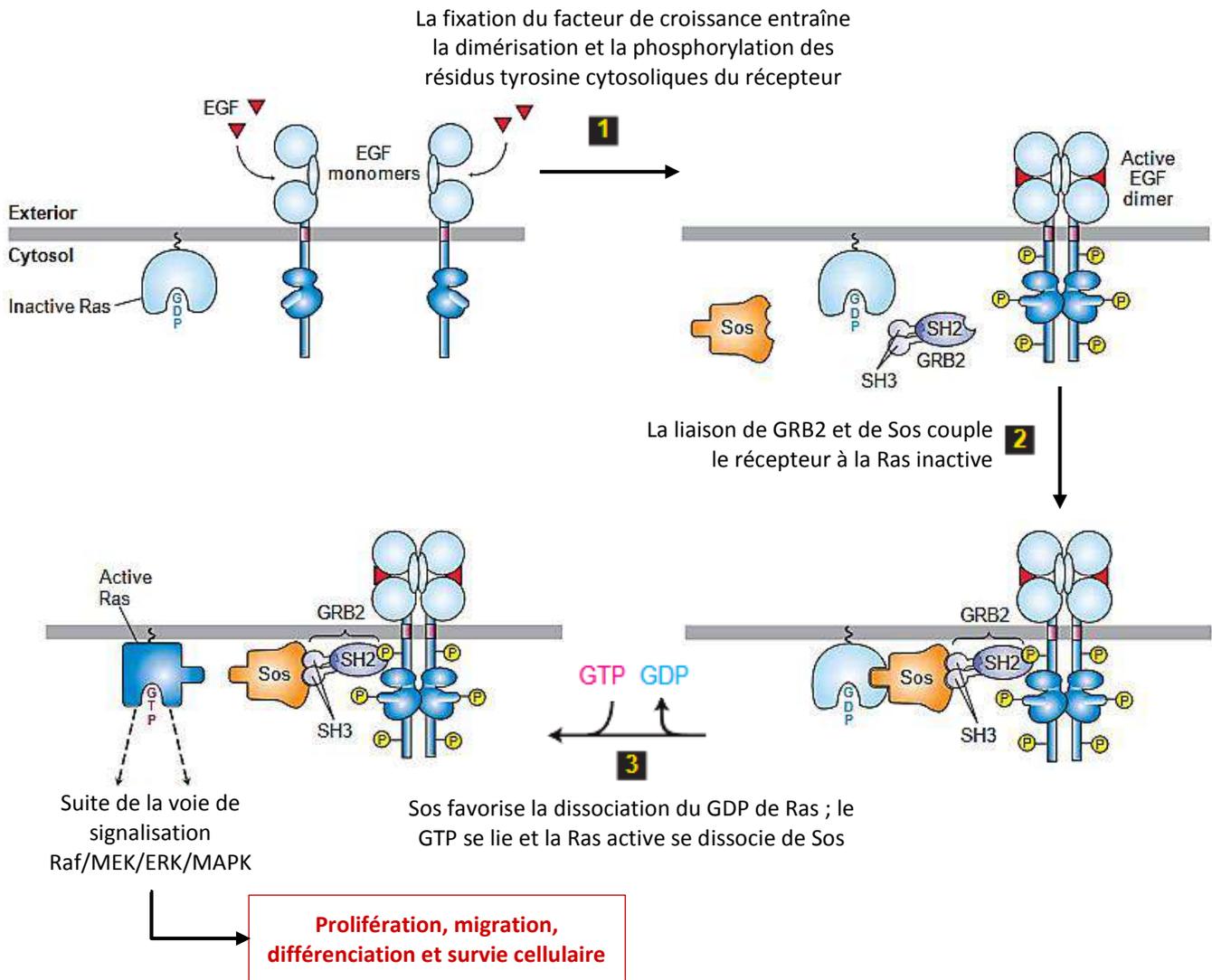


Figure 33 : Activation de Ras suite à la liaison du ligand aux Récepteurs Tyrosine Kinases (RTK). D'après Lodish *et al.*, 2008.

Les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGF) et de nombreux autres facteurs de croissance sont des RTK. La **protéine adaptatrice cytosolique GRB2** se lie à une tyrosine phosphorylée spécifique, sur un récepteur RTK activé et lié à un ligand, ainsi qu'à la **protéine cytosolique Sos**. Sos est ainsi amenée à proximité de son substrat, le Ras-GDP inactif. L'activité de facteur d'échange de nucléotide à guanine de Sos favorise alors la formation du Ras-GTP actif. [193]

c) Rôles de SHP-2 dans la signalisation, en amont des MAP-Kinases

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle de SHP-2 dans la voie des MAP-Kinases. La **majorité des substrats de SHP-2**, sur lesquels elle exerce son activité catalytique phosphatase, sont des **protéines dont la phosphorylation de la tyrosine régule négativement la voie Ras-ERK** [183]. Parmi tous les mécanismes relatés dans la littérature, trois groupes d'acteurs moléculaires se dégagent, agissant selon différentes interactions :

- **La protéine RASGAP** (*Ras-GTPase Activating Protein*, aussi dénommée GAP ou p120 RasGAP), activée par phosphorylation, **stimule l'activité GTPase de Ras** (hydrolyse du GTP lié à Ras), ce qui favorise l'état inactif de Ras. SHP-2 peut inhiber l'activité de cette protéine soit directement, soit en amont ou en aval de la protéine en elle-même :

- **En amont** de la protéine RASGAP elle-même, **SHP-2 déphosphorylerait** les sites tyrosine-phosphorylés des **récepteurs des facteurs de croissance** (tels que PDGFR et EGFR), ou ceux de la protéine d'amarrage (ou adaptatrice) **Gab-1** (protéine de liaison associée à GRB2). Ces sites, normalement phosphorylés en l'absence de SHP-2, se lient à RASGAP pour la recruter et l'activer. S'ils sont déphosphorylés, les **RTKs ou Gab-1 ne peuvent pas se lier à RASGAP** et cette dernière ne peut donc **pas être activée** et recrutée à la membrane plasmique. SHP-2 empêche donc l'inhibition de Ras par stimulation de son activité GTPase par RASGAP. Ras est ainsi maintenue active (**Figure 34 A**) [183], [186], [196], [198].
 - SHP-2 pourrait agir **sur RASGAP** elle-même, en **déphosphorylant ses sites de liaison** aux RTKs ou aux protéines adaptatrices comme Gab-1. Cette hypothèse rejoint la première mentionnée ci-dessus. SHP-2 pourrait également **déphosphoryler le site actif de RASGAP**, ce qui l'empêcherait d'inhiber Ras [186].
 - SHP-2 pourrait également agir **en aval** de la protéine RASGAP. En effet, par **déphosphorylation de la tyrosine en position 32 de Ras**, l'interaction entre Ras et RASGAP serait défavorisée. En supprimant cette phosphorylation, SHP-2 permettrait de nouveau de **maintenir l'état actif de Ras** (**Figure 34 B**) [196].
- **Les protéines CSK** (C-terminal Src tyrosine Kinase) **et SFK** (Src Family Kinases : kinases de la famille Src) seraient également régulées par SHP-2. En effet, la CSK, active, va classiquement inactiver les SFK ayant été activées par des RTKs, ce qui bloque la poursuite de la voie de signalisation vers Ras (mécanisme d'activation de Ras par les SFK encore mal connu). **SHP-2 déphosphorylerait les sites d'amarrage** de deux protéines d'échafaudage recrutant CSK : **la CbP** (*Csk Binding Protein* ; également connue sous le nom de PAG : *Phosphoprotein Associated with Glycosphingolipid microdomains* : phosphoprotéine associée aux microdomaines membranaires enrichis en glycosphingolipide) ; ou la **paxilline**. Ainsi, **CSK ne peut plus se lier à Cbp ou à la paxilline** et ne peut pas être activée. De ce fait, **CSK ne peut pas se lier aux SFK**, qui restent donc actives et **vont activer à leur tour Ras** (**Figure 34 C**) [183], [186], [196], [198].
- **La protéine Sprouty** (abréviation SPRY) et les **protéines SPRED** analogues (*Sprouty Related ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein homology 1-domain containing protein 1*), connus comme étant des **régulateurs négatifs de la voie Ras-MAPK**, peuvent aussi être inhibés par SHP-2. La **phosphorylation de la tyrosine de ces protéines est indispensable à leur effet inhibiteur** sur Ras. Par exemple, Sprouty, une fois phosphorylée, va lier GRB2, empêchant la formation du complexe GRB2-Sos induit en réponse au récepteur FRS (*Fibroblast growth factor Receptor Substrate*). Plus récemment, d'autres mécanismes agissant au niveau, en aval ou en amont de Ras ont été proposés dans la littérature. La phosphatase **SHP-2**, après avoir été activée par un récepteur à un facteur de croissance, va **déphosphoryler Sprouty et les protéines SPRED**, empêchant ainsi son effet inhibiteur sur l'activation de la voie Ras- (**Figure 34 D**) [186], [196], [198], [201].

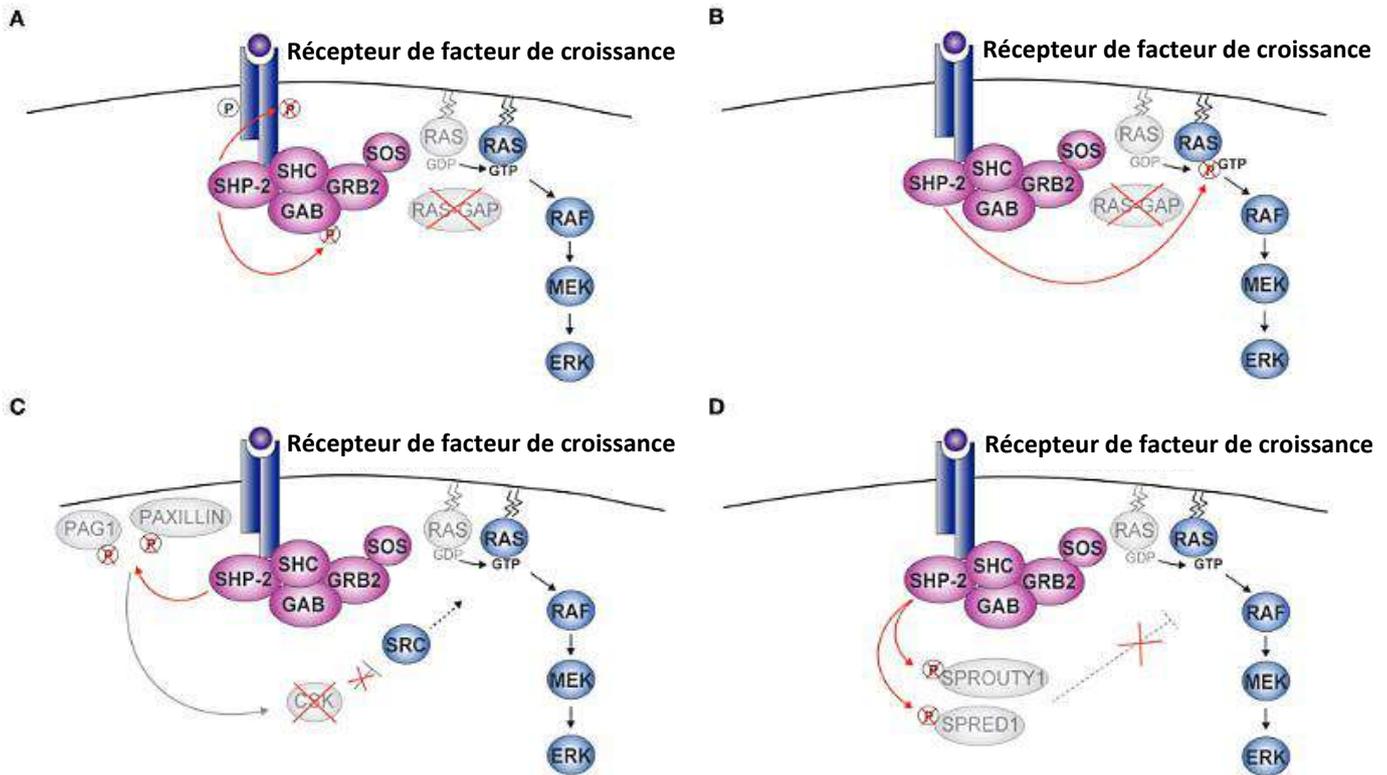


Figure 34 : Activation de la voie MAP-Kinase par la protéine SHP-2. D'après Niogret *et al.*, 2019.

Lors de la *fixation d'un facteur de croissance*, un *complexe comprenant SHP-2, GRB2 et Sos* est formé au niveau du récepteur. Quatre mécanismes moléculaires reliant l'activité phosphatase de la SHP-2 à l'activation de la voie RAS-RAF-MEK sont schématiquement illustrés ici (A-D). GRB2 : Growth factor Receptor-Bound protein ; Sos : Son of Sevenless ; CSK : C-terminal Src tyrosine Kinase ; GAB : GRB2-Associated-Binding protein ; PAG1 : Phosphoprotein Associated with Glycosphingolipid microdomains ; RAS-GAP: RAS-GTPase Activating Protein ; SHC: Src homology 2 domain containing ; SPRED1: Sprouty-Related ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein homology 1 domain-containing protein 1. [196]

D'autres modèles ont été proposés dans les publications les plus récentes, comme la **nécessité du domaine catalytique de SHP-2 dans l'assemblage du complexe Gab-GRB2** au récepteur du facteur de croissance, cela sans interaction avec des protéines inhibitrices de la voie Ras-MAPK. Cependant, les **mécanismes moléculaires sous-jacents restent encore à définir** et pourraient impliquer les acteurs décrits ci-dessus [196].

3.2.5. Autres rôles de la protéine SHP-2, hors voies de signalisation cellulaire

Comme expliqué ci-dessus, la protéine **SHP-2 participe à la transduction** de nombreux messages extracellulaires vers le noyau des cellules, via **diverses voies de signalisation** : Ras/Raf/MEK/ERK/MapK, PI3-AKT-mTOR, JAK-STAT, ou encore NF- κ B. De nombreuses cytokines et facteurs de croissance, dont ceux cités précédemment, peuvent initier les différentes voies et induire des messages variés selon les cellules et les molécules extracellulaires impliquées.

Afin de donner un aperçu de l'importance de SHP-2 au sein des cellules mammaliennes, quelques rôles sont décrits ci-dessous :

- SHP-2 se localise dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau, où elle a une place importante dans la **lutte contre la sénescence** des cellules. En effet, SHP-2 serait capable de déphosphoryler la tyrosine 707 de l'enzyme TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*), empêchant ainsi son export hors du noyau, déclenché par un stress oxydatif. Cette **enzyme, TERT**, permet de **limiter le raccourcissement des télomères** effectué à chaque division cellulaire, et donc de rallonger la durée de vie des cellules [202].
- SHP-2 régule également l'activité de **Rho**, une petite protéine se liant au GTP, impliquée dans la **migration et l'adhésion cellulaire** médiées par les intégrines. **SHP-2 inhiberait l'activité de Rho**, par un mécanisme encore mal compris [186].
- SHP-2 est fondamentale dans le **bon déroulement de l'embryogénèse**, comme ont pu le montrer les travaux réalisés avec des modèles génétiques de souris. En effet, une **délétion complète de PTPN11 entraîne une létalité embryonnaire** ; tandis qu'une suppression inductible de SHP-2 chez des souris adultes entraîne leur mort en six à huit semaines, avec aplasie médullaire et anémie. De plus, une suppression du domaine N-SH2 seul de SHP-2, provoque chez des embryons un **développement incomplet de différents tissus**, dont le système nerveux, le cœur, la glande mammaire, le rein et les intestins. La structure squelettique ainsi que le système épithélial sont retrouvés aberrants [196], [203].
- Les études menées sur des lignées cellulaires de souris ont également révélé le **rôle critique de SHP-2 dans l'hématopoïèse**. Lors de la délétion du domaine N-SH2 de SHP-2, dans des lignées de cellules souches embryonnaires, la **différenciation des lignées érythroïde et myéloïde** est bloquée. Par ailleurs, il a été montré que SHP-2 est indispensable à la **survie et au bon fonctionnement des cellules souches hématopoïétiques et des précurseurs** des cellules hématopoïétiques matures [189], [196], [203].
- SHP-2 est impliquée dans la **régulation du système immunitaire**, via les différents récepteurs transmembranaires avec lesquels elle peut interagir, stimulés par des facteurs de croissance de cellules immunitaires, ou des cytokines, dont de nombreuses interleukines. Ainsi, cette protéine, au sein des granulocytes **éosinophiles**, participe au **contrôle des réactions allergiques d'hypersensibilité**. De même, elle contribue au processus **inflammatoire** en interagissant avec l'interleukine 6 (**IL-6**). Elle joue aussi un rôle dans la réponse des lymphocytes :
 - elle est engagée dans la **réponse à l'IL-2**, essentielle pour les **cellules T régulatrices**, CD4⁺ effectrices et CD8⁺ effectrices. Cela se fait notamment via la protéine de mort cellulaire programmée **PD-1** (*Programmed cell Death protein 1*). La liaison de SHP-2 à la queue cytoplasmique de PD-1 inhibe la production d'IL-2 et donc **limite la réponse immunitaire des lymphocytes T**.
 - elle est aussi engagée dans la **réponse à l'IL-15**, nécessaire à la **survie des cellules T CD8⁺ mémoires** et au développement, à la survie et à l'**activation des cellules NK** (*Natural Killer*), deux catégories de cellules **cytotoxiques** exerçant un rôle central dans l'immunité contre les pathogènes intracellulaires et les cancers [196].

- Enfin, le rôle de **SHP-2 dans la barrière intestinale** peut également être cité. SHP-2 est exprimée dans les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale, ces cellules étant **indispensables au maintien de la barrière immunitaire** entre le milieu interne et le contenu intestinal. Lors de délétions de la protéine SHP-2 chez des souris, celles-ci développent rapidement de **l'inflammation** avec des caractéristiques histologiques similaires à celles observées dans des cas de colite ulcéreuse humaine. Cela s'accompagne également d'un changement du microbiote, entraînant un **dysfonctionnement de la flore intestinale** [204].

3.3. Mutations du gène *PTPN11* et conséquences moléculaires et biologiques

Le gène *PTPN11* et ses mutations ont été explorés en cancérologie humaine bien avant leur étude en médecine vétérinaire. Sachant que la protéine canine SHP-2 partage **98,66% à 99,33% d'homologie** au niveau de la **séquence d'acides aminés** et que le gène *PTPN11* canin la codant 92,73% à 95,98% à l'échelle des nucléotides, avec la région codante du gène *PTPN11* humain, il est reconnu que ce gène est **hautement conservé entre ces deux espèces** [138]. Leur comparaison prend donc tout son sens, étant donné que les mutations retrouvées dans les deux espèces sont similaires dans leur localisation (régions hautement conservées) et dans leurs conséquences moléculaires et biologiques, en favorisant la tumorigénèse des cellules.

Pour suivre l'historique des découvertes concernant *PTPN11*, nous allons d'abord nous intéresser aux mutations de *PTPN11* chez l'Homme, puis nous ferons le lien avec les mutations retrouvées chez le chien, en particulier dans le sarcome histiocytaire des Bouviers Bernois.

3.3.1. Les mutations de *PTPN11* chez l'homme

Comme décrit ci-dessus, la protéine SHP2, et par conséquent le gène *PTPN11*, sont d'importance critique dans le bon déroulement de l'hématopoïèse, de la stimulation des cellules souches à la maturation des précurseurs hématopoïétiques, via leur activité tyrosine-phosphatase, contrebalançant l'activité de phosphorylation par les tyrosines kinases. Un dérèglement de ce processus, tel qu'une mutation de *PTPN11*, entraîne donc des maladies ou **cancers hématopoïétiques** chez l'homme. De plus, l'implication de SHP-2 dans de nombreux mécanismes cellulaires, dont l'embryogénèse et le contrôle des processus développementaux, explique que ses mutations n'aient pas qu'un effet leucémogène mais provoquent également des **anomalies de développement** [179], [205].

A) Des mutations de *PTPN11* sont impliqués dans des désordres myéloprolifératifs et développementaux humains

Dès la fin des années 1990 et au début des années 2000, des études ont révélé une association entre des mutations de *PTPN11* et **plusieurs désordres myéloprolifératifs ou développementaux humains**. Ainsi, des **mutations germinales** de *PTPN11* peuvent causer des désordres développementaux ; les plus connus sont le **syndrome de Noonan** et le **syndrome LEOPARD**, cliniquement apparentés. Parallèlement, des **mutations somatiques** acquises de ce même gène sont **leucémogènes** et provoquent plusieurs **désordres myéloprolifératifs** ; la leucémie myélomonocytaire juvénile (**LMMJ**) étant le cancer

hématopoïétique majoritairement concerné par ces mutations. La plupart de ces mutations sont des **mutations faux-sens** (substitution d'un unique nucléotide entraînant le remplacement de l'acide aminé initial dans la séquence protéique) engendrant **un gain de fonction**, permettant d'augmenter fortement l'activité basale de *PTPN11* ; tandis que les mutations impliquées dans le syndrome **LEOPARD** entraîneraient une **perte de fonction** de la protéine SHP-2, et donc une activité moindre de la voie MAP-Kinase. Étonnamment, les signes cliniques retrouvés dans le syndrome de Noonan (caractérisé par une mutation gain de fonction) et dans le syndrome LEOPARD (caractérisé par une mutation perte de fonction) sont analogues ; cependant cette similitude clinique ne peut pas encore être expliquée, en raison des connaissances faibles sur les mécanismes découlant de ces mutations [188], [196], [198], [205], [206].

a) *Le syndrome de Noonan :*

Le syndrome de Noonan est une maladie génétique **autosomique dominante**, décrite pour la première fois comme une entité distincte en 1968. Elle est alors caractérisée par **des traits faciaux dysmorphiques**, une **petite taille** et des **anomalies cardiaques**, le plus souvent du côté du cœur droit (sténose pulmonaire et cardiomyopathie hypertrophique). Depuis, de nombreuses études ont montré que ce syndrome englobait d'autres caractéristiques telles que des anomalies squelettiques, neurologiques, endocriniennes, hématologiques et cutanées.

Les traits faciaux principaux sont : un hypertélorisme (écartement excessif des orbites [20]), des fentes palpébrales inclinées vers le bas (comme dans le syndrome de Down ou trisomie 21) avec une ptose palpébrale, un strabisme, un nez large et plat, un palais haut et arqué, une micrognathie (développement insuffisant des maxillaires), des oreilles basses à rotation postérieure, un cou court et des cheveux frisés, bruts et épars (**Figure 35**). Les **autres caractéristiques morphologiques** fréquemment rencontrées sont : des mamelons très espacés et/ou bas, un pectus excavatum ou carinatum, une scoliose, et des **signes cutanés** tels que des lentigines (macules hyperpigmentées de petite taille, de 1 à 3 mm) ou des taches café au lait (macules hyperpigmentées de taille supérieure à 5 mm). Ces signes cutanés correspondent au syndrome de la neurofibromatose. Des **atteintes de l'appareil reproducteur** sont également rapportées : cryptorchidie chez les hommes, ou ménorragie (menstruations abondantes et prolongées) chez les femmes. Enfin, ces signes cliniques sont parfois accompagnés de **retard mental**, avec un trouble du langage et de l'apprentissage. L'incidence de cette maladie serait relativement fréquente avec **un cas pour 1000 à 2500 naissances**. Une étude menée en Inde (Athota *et al.*, 2020) a permis de rassembler les caractéristiques cliniques et génétiques de 107 patients atteints du syndrome de Noonan, dont dix étaient des cas familiaux (**Figure 35**). Trente-deux mutations ont été détectées au sein de huit exons différents du gène *PTPN11*, 21% des mutations se situant sur l'exon 8 (**Figure 36**) [179], [182], [205], [207].



Figure 35 : Caractéristiques faciales typiques (face avant et latérale) chez des patients atteints du syndrome de Noonan et présentant une mutation du gène *PTPN11*. D'après Athota *et al.*, 2020.

Cheveux frisés ou clairsemés, ptose des paupières, fentes palpébrales inclinées vers le bas, hypertélorisme et oreilles basses à rotation postérieure, observés à des âges allant de 3 mois à 16 ans dans la figure d'origine. [207]

Selon les études génétiques menées dans de larges populations atteintes du syndrome de Noonan, dont l'étude d'Athota *et al.* citée ci-dessus (Inde, 2020), des **mutations faux-sens de *PTPN11*** seraient présentes dans **plus de 50% des cas**. Ce sont des mutations **gain de fonction**, concentrées sur les domaines **N-SH2** et **PTP** (les deux tiers des mutations seraient situés dans le domaine N-SH2 selon la première étude génétique réalisée en 2001 et d'autres plus récentes comme celle réalisée en Inde en 2020, (Tableau VI, Figure 37) ; les plus communes étant situés aux positions des acides aminés **G60, D61, Y62, Y63, T73, Q79, N308, et G503** (Code international des acides aminés en Annexe 5). En effet, les mutations les plus souvent rencontrées se situent dans les **exons 3, 8 et 13**, avec une majorité de mutations sur les exons 3 et 8 (Tableau VI, Figure 36). L'exon 3 code en partie le domaine de liaison N-SH2, tandis que les exons 8 et 13 codent le domaine catalytique PTP. Lorsqu'un de ces deux domaines est muté, ils n'interagissent plus pour auto-inhiber l'activité phosphatase de la protéine SHP-2, comme c'est le cas dans les conditions physiologiques. Cette **interaction auto-inhibitrice étant supprimée**, cela engendre une **activation constitutive** de la protéine **SHP-2** (conformation active permanente) et donc une activité phosphatase accrue, **stimulant** la voie de signalisation **Ras/MAP-Kinase** [179], [182], [184], [186], [205], [207].

Tableau VI : Premières mutations du gène *PTPN11*, découvertes en 2001, parmi des cas familiaux et sporadiques affectés par le syndrome de Noonan. D'après Tartaglia *et al.*, 2001. [179]

Family ID	Nucleotide substitution	Exon	Amino-acid substitution	Functional domain
N-17	A182G	3	Asp61Gly	N-SH2
N-30	A188G	3	Tyr63Cys	N-SH2
NS-C	G214T	3	Ala72Ser	N-SH2
NS-U	C215G	3	Ala72Gly	N-SH2
N-34	G228C	3	Glu76Asp	N-SH2
NS-L, NS-D	A236G	3	Gln79Arg	N-SH2
NS-F	A844G	7	Ile282Val	PTP
NS-A, NS-B, NS-V, N-7	A922G	8	Asn308Asp	PTP
NS-N	A1510G	13	Met504Val	PTP

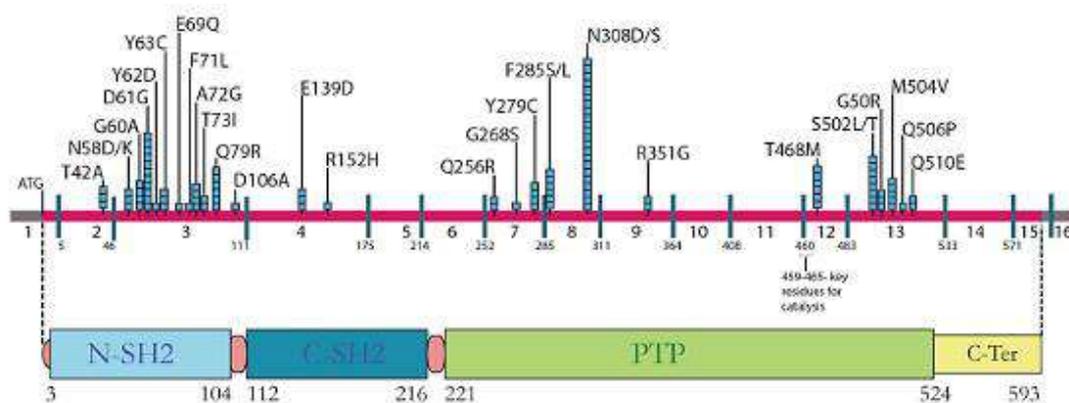


Figure 36 : Localisation des variants pathogéniques du syndrome de Noonan sur le gène *PTPN11* humain, avec ses exons et les domaines fonctionnels de la protéine SHP-2. D'après Athota *et al.*, 2020.

La barre supérieure représente les exons du gène *PTPN11*, la région codante étant en rose. Les cases bleues au-dessus de la barre représentent le nombre de patients observés avec ce variant pathogène particulier. Les domaines fonctionnels correspondants de la protéine SHP-2 sont indiqués ci-dessous et comprennent les deux domaines SH2 et le domaine de la protéine tyrosine phosphatase (PTP). [207]

Cette activation excessive de Ras cause le syndrome de Noonan, ainsi que des leucémies juvéniles comme la leucémie myéomonocytaire juvénile (LMMJ). Cela est **cohérent** avec l'observation de **mutations gain de fonction pour Ras ou pour le facteur d'échange Sos**, qui peuvent également entraîner ces types de maladies. De plus, des **modèles murins** ont permis de confirmer le lien de causalité entre les mutations de *PTPN11* et l'apparition du syndrome de Noonan associé. En effet, des souris exprimant un gène *PTPN11* avec une mutation hétérozygote ont développé les caractéristiques morphologiques du syndrome de Noonan humain (petite taille, anomalies crânio-faciales et cardiopathies) ainsi que des désordres myéloprolifératifs. De plus, des prélèvements de moelle osseuse réalisés sur ces souris ont montré que les **cellules progénitrices myéloïdes** mises en culture avaient une **sensibilité accrue à l'IL-3** (interleukine 3) et au **GM-CSF** (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*). Ces cellules présentaient alors une forte prolifération ainsi qu'une **activation plus élevée des voies de signalisation via ERK, AKT et STAT5**. L'ensemble de ces observations viennent confirmer le rôle majeur des mutations de *PTN11* dans le syndrome de Noonan et les maladies myéloprolifératives [183], [184], [186], [196].

Dans le syndrome de Noonan, certaines **caractéristiques cliniques** sont plus systématiquement **associées aux mutations** du gène *PTPN11* que d'autres caractéristiques cliniques : sténose pulmonaire, petite taille, déformations thoraciques. Les **anomalies cardiaques congénitales** sont aussi associées aux mutations de *PTPN11*, étant présentes dans **plus de 80% des cas** de la cohorte positive à une des mutations. Ainsi, le syndrome de Noonan est le deuxième syndrome après le syndrome de Down (trisomie 21) en ce qui concerne la fréquence des malformations cardiaques [207].

Beaucoup d'enfants atteints du syndrome de Noonan et positifs pour une mutation de *PTPN11* (de **25 à 50%**), sont **plus susceptibles de développer des désordres myéloprolifératifs** modérés, qui sont limités et se résolvent sans séquelles. Dans des **cas plus rares**, une tumeur maligne sous une forme modérée peut se développer, la principale étant la **leucémie myéomonocytaire juvénile (LMMJ)**. Ainsi, des **mutations germinales hétérozygotes** de *PTPN11* (sur l'exon 3 correspondant au domaine N-SH2, comme T73I, ou sur l'exon 13 codant le domaine PTP, comme C218T) ont été retrouvées chez des individus atteints du syndrome de Noonan et de la LMMJ [198], [205], [208]. Il a été observé dans différentes études que chez les patients présentant un syndrome de Noonan associé à une JMML ou chez ceux présentant une JMML seule, **l'activité de la protéine SHP-2 est bien plus importante** que chez les

patients présentant seulement un syndrome de Noonan [186], [198], [208]. De plus, certaines études, moins étayées, suggèrent que les patients atteints du syndrome de Noonan seraient aussi plus à risque de développer un **neuroblastome** ou une **leucémie lymphoblastique aiguë à cellules B** [184].

b) *Le syndrome LEOPARD :*

Le syndrome LEOPARD est assimilé au syndrome de Noonan dans sa présentation clinique, et est même parfois considéré comme une sous-catégorie du syndrome de Noonan. LEOPARD est l'**acronyme** des principales caractéristiques cliniques rencontrées dans ce syndrome, et a été introduit en **1969** :

- **Lentigines multiples**,
- **EKG abnormalities** (anomalies de l'ECG),
- **Ocular hypertelorism** (hypertélorisme oculaire),
- **Pulmonary stenosis** (sténose pulmonaire),
- **Abnormalities of the genitalia** (anomalies des organes génitaux),
- **Retardation of growth** (retard de croissance),
- **Deafness** (surdité) [209], [210].

Les **anomalies faciales et les cardiopathies**, rencontrées dans le syndrome de Noonan, se retrouvent également dans le syndrome LEOPARD. En outre, **des taches café au lait** s'ajoutent aux signes cutanés déjà présents dans le syndrome de Noonan. Ces taches apparaissent généralement dans la petite enfance, et **augmentent en nombre et en intensité de pigmentation avec l'âge** ; de même que le syndrome LEOPARD généralisé (avec les signes cliniques autres que cutanés) qui apparaît plutôt chez les patients **âgés de plus de 5-6 ans**. Ces signes cutanés sont aussi caractéristiques de la **neurofibromatose**, et le **diagnostic différentiel** doit être fait avec cette maladie également. En effet, des patients suspectés d'être atteints du syndrome de LEOPARD et génotypés, se révélaient avoir une **mutation du gène NF1** (gène responsable de la fibromatose) et pas de mutations de *PTPN11*, pouvant causer le syndrome LEOPARD [209], [210].

Selon les premières études génétiques réalisées sur des individus touchés par le syndrome LEOPARD, ceux-ci présentent, comme pour le syndrome de Noonan, des **mutations germinales du gène PTPN11**. Les deux mutations rapportées dans ces cas, souvent familiaux (mutations retrouvées chez certains parents), sont des mutations **faux-sens**, aboutissant à la substitution d'acides aminés : **Y279C** sur l'**exon 7**, mutation la plus retrouvée dans les cas étudiés ; et **T468M** sur l'**exon 12** (Figure 37). Ces mutations n'ont été retrouvées ni chez des individus sains (témoins négatifs) ni chez des patients atteints du syndrome de Noonan [179], [209]–[211].

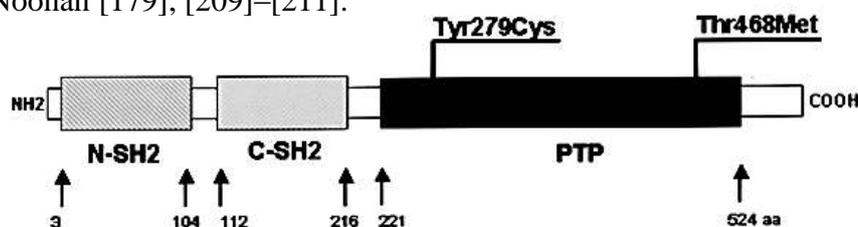


Figure 37 : Structure de la protéine PTPN11 et localisation des deux mutations faux-sens signalées chez les patients atteints du syndrome LEOPARD. D'après Digilio *et al.*, 2002.

N-SH2 et C-SH2 sont les domaines SH2 disposés en tandem en N-terminal et en C-terminal, suivis d'un domaine PTP protéique en C-terminal, où sont localisées les deux mutations névralgiques. Les limites des acides aminés des domaines fonctionnels sont indiquées. [209]

Des études génétiques ultérieures sur le syndrome LEOPARD ont permis de mettre à jour les connaissances sur les mutations associées au syndrome LEOPARD. Ainsi, six mutations du domaine PTP ont été montrées comme étant spécifiques du syndrome LEOPARD : **Y279(C/S)**, **T468M**, **A461T**, **G464A**, **Q506P**, **Q510P** (Figure 38).



Figure 38 : Structure cristalline de Shp2 (Protein Data Bank 2SHP), présentée sous forme de diagramme en ruban, et montrant les mutations associées au syndrome LEOPARD. D'après Kontaridis *et al.*, 2006.

Les positions des mutations associées au syndrome LEOPARD sont colorées en rouge, dans la fente catalytique. Les domaines N-SH2 (jaune), C-SH2 (vert) et PTP (bleu) sont représentés. La boucle catalytique de la PTP est représentée en blanc. [206]

Ces mutations de *PTPN11* impliquées dans le syndrome LEOPARD sont des **mutations perte de fonction**, contrairement à celles du syndrome de Noonan et des autres maladies humaines présentant une mutation de ce gène. Ces mutations perte de fonction **dominantes** produisent une protéine SHP-2 défectueuse sur le plan catalytique. En effet, cette mutation entraîne une **déformation du domaine catalytique PTP** (en particulier de la boucle catalytique contenant l'acide aminé cystéine, essentiel pour l'activité phosphatase) ce qui aboutit à une **forme ouverte et inactive de SHP-2**. Cette forme **empêche l'intervention de SHP-2** dans la voie de signalisation **ERK/MAP-Kinases** [184], [188], [205], [206].

c) Désordres myéloprolifératifs :

Contrairement aux désordres développementaux où des mutations germinales de *PTPN11* ont été observées, des **mutations somatiques leucémogènes de *PTPN11*** sont impliquées dans les désordres myéloprolifératifs.

Ainsi, le cancer hématopoïétique où les mutations de *PTPN11* sont les plus fréquentes est la **LMMJ (Leucémie Myélomonocytaire Juvenile)**. Cette maladie représente **30% des cas de leucémie chez les enfants**, et 2% de tous les cas de leucémie confondus. C'est un trouble myéloprolifératif persistant chez les jeunes enfants, caractérisé par une **surproduction de cellules myéloïdes qui infiltreront les tissus hématopoïétiques et non hématopoïétiques** [208], [212].

Chez les patients atteints de **LMMJ** sans syndrome de Noonan (ceux avec syndrome de Noonan présentent les mutations germinales de *PTPN11* exposées ci-dessus), **33 à 34%** (selon les études) présentent des **mutations somatiques de *PTPN11*** ; 40% présentent d'autres mutations, sur les gènes RAS (25%) ou NF1. Les mutations de *PTPN11* sont ainsi les **mutations les plus fréquentes** dans cette forme de leucémie. Plusieurs études sont d'ailleurs en faveur de l'hypothèse selon laquelle les mutations des différents gènes dans les désordres myéloprolifératifs seraient mutuellement exclusives. D'autre part, les mutations germinales décrites pour le syndrome de Noonan et provoquant la LMMJ seraient suffisantes pour provoquer des désordres développementaux mais seulement des troubles myéloprolifératifs modérés ; tandis que les **mutations somatiques** causent des **troubles myéloprolifératifs bien plus sévères** qui seraient également associées à de la **létalité embryonnaire** [186], [208], [212].

Pour la LMMJ, au moins **douze mutations gain de fonction** différentes peuvent l'engendrer : dont 95% sont situés dans **l'exon 3** et le reste dans l'exon 13. Des exceptions sont cependant notées, une mutation ayant été rapportée dans l'exon 4. Les mutations **les plus fréquentes, chacune représentant au moins 25%** de l'ensemble des mutations retrouvées et favorisant la prolifération cellulaire, provoquent une substitution d'acides aminés dans le domaine N-SH2, aux positions suivantes : **D61Y** (Asp61Tyr) et **E76K** (Glu76Lys). Le **codon 76** en particulier peut être qualifié de « **hotspot mutationnel** », pouvant présenter trois substitutions d'acides aminés différentes (Tableau VII). De la même façon que pour les mutations précédentes, ces mutations **augmentent** l'activation de la voie **RAS/ERK/MAPK** [208], [212].

Tableau VII : Mutations de *PTPN11* détectées chez des patients atteints de LMMJ (Leucémie Myélomonocytaire Juvénile). D'après Loh *et al.*, 2004.

Les quatre substitutions d'acides aminés surlignées en jaune sont identiques à celles retrouvées dans le sarcome histiocyttaire du chien, et ont été recherchées dans notre partie expérimentale ; à l'exception de l'alanine en position 72 qui est remplacée par une proline chez le chien, et non par une thréonine comme indiqué ici chez l'homme. [212]

Nucleotide	Substitution	Amino acid
178	G>C	Gly60Arg
181	G>T	Asp61Tyr
	G>A	Asp61Asn
205	G>A	Glu69Lys
214	G>A	Ala72Thr
215	C>T	Ala72Val
218	C>T	Thr73Ile
226	G>A	Glu76Lys
	G>C	Glu76Gln
227	A>G	Glu76Gly
417	G>C	Glu139Asp
1517	A>C	Gly506Pro

Les **conséquences moléculaires sur la protéine SHP-2** humaine ont été étudiées pour la mutation E76K. Il a été montré que cette mutation induit une **rotation de 120 degrés du domaine C-SH2** par rapport au domaine PTP adjacent, ce qui expose complètement le site actif de PTP et positionne le domaine N-SH2 sur une surface du domaine PTP opposée à la poche catalytique. Ainsi, la protéine est dans une **conformation active permanente**, le **site catalytique étant complètement exposé** et le domaine N-SH2 positionné de façon à lier de façon optimale les susstrats de SHP-2 (Figure 39) [192]. Cela entraîne une activité enzymatique constitutive anormale et une prolifération cellulaire incontrôlée [187].

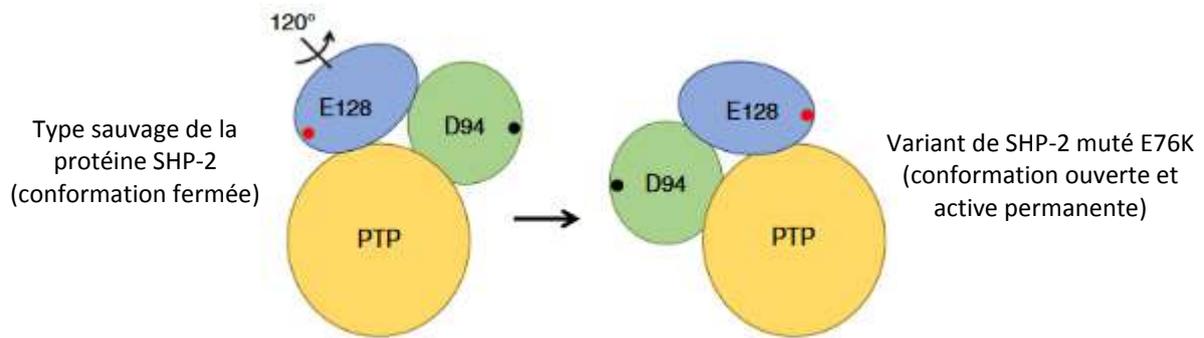


Figure 39 : Schéma illustrant les rotations des domaines dans le variant muté SHP-2 E76K.
D'après LaRochelle *et al.*, 2018.

Dans le variant muté SHP-2 E76K, la rotation de 120 degrés du domaine C-SH2 par rapport au domaine PTP entraîne le domaine N-SH2, qui se retrouve sur la face de PTP opposée à la poche catalytique de PTP. La protéine SHP-2 adopte alors une conformation ouverte. E128 et D94 sont choisis comme points de référence arbitraires pour illustrer l'effet de la rotation de 120 degrés. [192]

Des mutations faux-sens, somatiques et gain de fonction de *PTPN11* sont retrouvées, dans une moindre mesure, dans d'autres désordres myéloprolifératifs :

- **Le syndrome myélodysplasique** : environ **10%** des cas comportent des mutations de *PTPN11*. Les mutations de *PTPN11* sont retrouvées principalement dans les stades avancés de syndrome myélodysplasique, qui sont caractérisés par une incidence élevée d'évolution vers la leucémie myéloïde aiguë et une courte durée de survie. Ce constat suggère que les mutations de *PTPN11* favoriseraient l'évolution des syndromes myélodysplasiques de stade avancé vers des leucémies myéloïdes aiguës [208].
- **La leucémie myéloïde aiguë**, en particulier pédiatrique, avec **5%** de mutations de *PTPN11*.
- **La leucémie lymphoblastique aiguë à précurseurs B**, avec environ **7%** des patients présentant une mutation de *PTPN11*, dans l'**exon 3 principalement** et dans l'exon 13. Cependant, aucun patient atteint de leucémie lymphoblastique aiguë à précurseurs T ne présentait de mutation de *PTPN11*. De plus, comme pour la LMMJ, cette leucémie est parfois associée au syndrome de Noonan. Les **principales mutations** rencontrées dans cette maladie, et qui comptent pour **87%** de toutes les mutations de *PTPN11* retrouvées, sont situées sur les acides aminés suivants : **D61, E69, A72, E76, P491**. Comme pour la LMMJ, le **codon 76** est un « *hotspot mutationnel* », rassemblant **35% des mutations** avec trois substitutions d'acides aminés différentes (Tableau VIII) [186], [213].

De nouveau, comme dans les différents troubles décrits antérieurement, les mutations somatiques touchent les **acides aminés des domaines N-SH2 et PTP**, interagissant pour auto-inhiber l'activité de la protéine SHP-2. Plusieurs de ces mutations sont retrouvées parmi celles impliquées dans la LMMJ. Une **conformation active permanente de la protéine** est ainsi constituée, et augmente la stimulation de la **voie RAS/MAPK**. Ces mutations contrôlent donc **positivement la prolifération et la survie des cellules hématopoïétiques** [208], [212], [213]. Des mutations activatrices de RAS sont également retrouvées dans les causes de ces maladies, en cohérence avec l'augmentation de l'activité de la voie RAS/MAPK permise par les mutations de *PTPN11* [213].

Tableau VIII : Les mutations de *PTPN11* dans la LMMJ (Leucémie Myéломonocytaire Juvénile), le syndrome myéلودysplasique et la leucémie aiguë myéлоide. D'après Tartaglia *et al.*, 2003.

Les cinq substitutions d'acides aminés différentes surlignées en jaune sont identiques à celles retrouvées dans le sarcome histiocytaire du chien, et ayant été recherchées dans notre partie expérimentale ; à l'exception de l'alanine en position 72 et de la glycine en position 503, qui sont remplacées respectivement par une proline et une valine chez le chien, et non pas, respectivement, par une thréonine et une alanine, comme indiqué ici chez l'homme. [208]

Désordre	Nombre de cas	Substitution de nucléotides	Substitution d'acides aminés
Syndrome de Noonan / LMMJ	5		
	1	184T→G	Y62D
	4	218C→T	T73I
	2		
Retard de croissance et sténose pulmonaire/LMMJ	1	218C→T	T73I
	1	1507G→C	G503R
LMMJ	62		
	5	181G→T	D61Y
	1	182A→T	D61V
	3	205G→A	E69K
	2	214G→A	A72T
	1	215C→T	A72V
	5	226G→A	E76K
	1	227A→T	E76V
	1	227A→G	E76G
	1	227A→C	E76A
	1	1508G→C	G503A
	Syndrome myéلودysplasique	50	
1		179G→T	G60V
1		182A→T	D61V
1		205G→A	E69K
1		213T→A	F71L
1		227A→C	E76A
Leucémie myéлоide aiguë	26		
	1	211-213TTT→AAA	F71K

L'ensemble de ces résultats s'accordent pour pouvoir dire que la protéine **SHP-2 mutée** agit comme une **oncoprotéine** dans les tumeurs malignes lymphoïdes et myéлоides [205].

d) Tumeurs solides

Une étude réalisée en 2004 (Bentires-Alj *et al.*, 2004) a révélé que des mutations du gène *PTPN11* se retrouvaient également dans certaines tumeurs solides humaines (Figure 40) :

- Le **neuroblastome** principalement, déjà connu comme pouvant se développer chez des patients atteints du syndrome de Noonan. Il s'agit de la **tumeur maligne solide la plus fréquente chez les jeunes enfants** ; elle prend son origine dans les neuroblastes (cellules nerveuses immatures) du système nerveux orthosympathique. Elle peut régresser spontanément mais est souvent déjà métastasée au moment du diagnostic dans la plupart des cas, et l'évolution est souvent rapide et fatale. Les **mutations** se retrouvent de nouveau à **l'interface des domaines N-SH2 et PTP** [214]–[216].

- **Les cancers pulmonaires** : une mutation de *PTPN11* a été trouvée parmi des échantillons tumoraux d'**adénocarcinomes pulmonaires**, dans le « *hotspot* mutationnel » du **codon 76** ; deux autres ont été identifiées dans des lignées cellulaires de **cancer pulmonaire non à petites cellules**. Toutes ces mutations se trouvent dans le domaine **N-SH2**, parmi les acides aminés interagissant physiologiquement avec le domaine PTP [215].
- **Le cancer du colon** : une mutation de *PTPN11*, déjà rencontré dans les maladies humaines précédemment décrites, a été identifiée dans le **codon 76** : **E76G**. Cette mutation est particulièrement intéressante car elle fait partie du panel de mutations **recherché dans notre étude** expérimentale sur le sarcome histiocyttaire des Bouviers Bernois [215].
- **Le mélanome** : une mutation a été identifiée dans le **domaine C-SH2**, dans la poche de liaison de ce domaine à une tyrosine phosphorylée. Cependant, cette mutation n'impactant pas l'interaction des domaines N-SH2 et PTP, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour étudier l'importance de cette mutation dans le fonctionnement de SHP-2 [215].

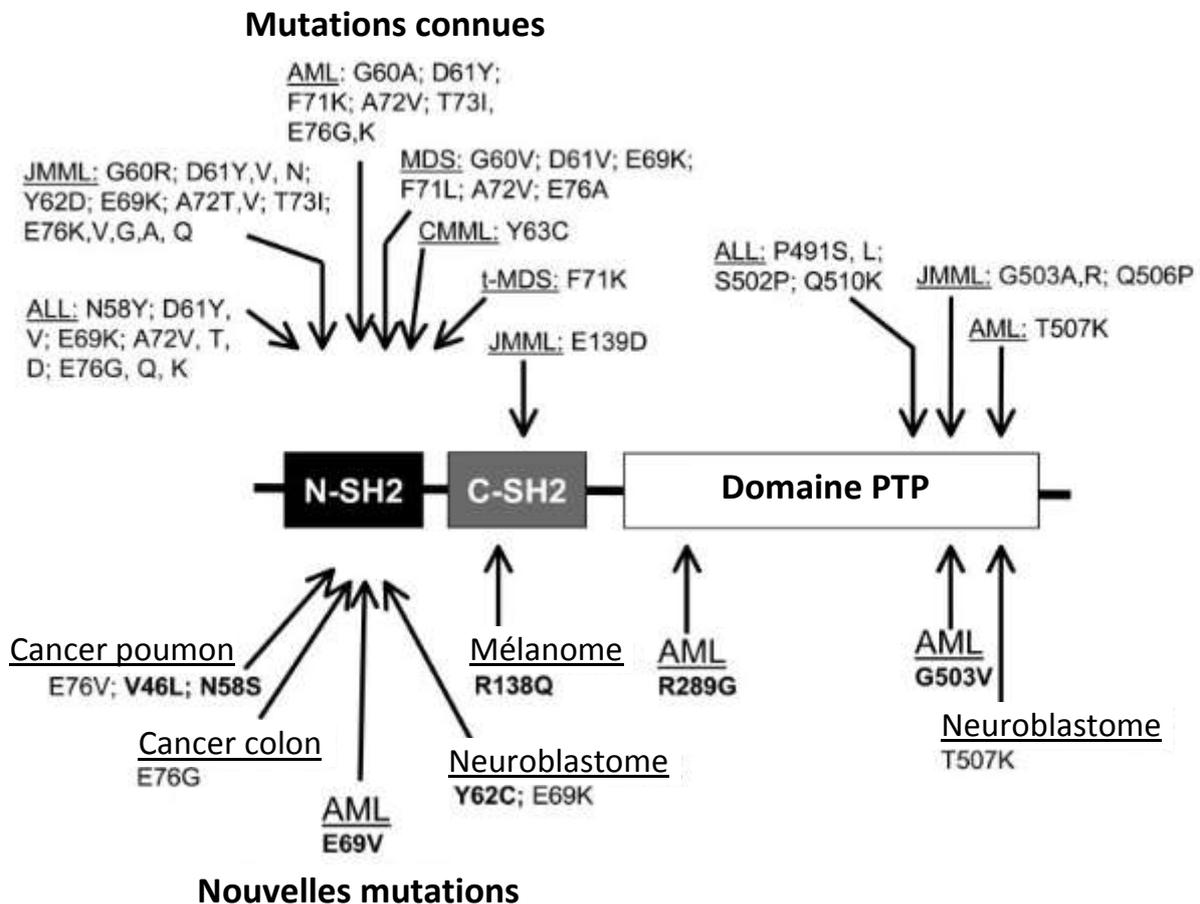


Figure 40 : Distribution des mutations *PTPN11* connues (panneau du haut) et nouvellement découvertes (panneau du bas) dans le cancer humain. D'après Bentires-Alj *et al.*, 2004.

Les nouvelles substitutions d'acides aminés sont en gras. JMML : Juvenile Myelomonocytic Leukemia (LMMJ : Leucémie Myéломonocytaire Juvénile) ; AML : Acute Myelogenous Leukemia (leucémie myéloïde aiguë) ; CMML : Chronic Myelomonocytic Leukemia (leucémie myéломonocytaire chronique) ; MDS : Myelodysplastic Syndrome (syndrome myélodysplasique) ; ALL : Acute Lymphoblastic Leukemia (leucémie lymphoblastique aiguë). [215]

Dans l'ensemble de ces tumeurs solides, ainsi que dans les désordres myéloprolifératifs, les mutations gain de fonction de SHP-2, en particulier la mutation E76K, **empêche l'apoptose dans les cellules tumorales** [217].

La protéine SHP-2 est aussi **impliquée dans d'autres tumeurs solides** via des mécanismes différents, **sans mutation** gain de fonction de *PTPN11*.

- Dans le **cancer du sein**, l'expression de la protéine d'ancrage **GAB-2** (*GRB2-Associated-Binding protein*) est **augmentée**, ce qui entraîne une hyperactivation de SHP-2 et une surstimulation de la voie RAS/MAPK (Figure 41).
- Dans le cas du **cancer gastrique causé par *Helicobacter pylori***, cette bactérie injecte directement la **protéine CagA** dans les cellules épithéliales gastriques. Cette protéine subit une phosphorylation de la tyrosine au niveau de certains de ses motifs. Elle se comporte alors comme une **protéine d'amarrage**, comme GAB-2, pour SHP-2. **L'activité de SHP-2** est ainsi davantage **stimulée** d'où une activité plus soutenue de la voie RAS/MAPK (Figure 41) [186].

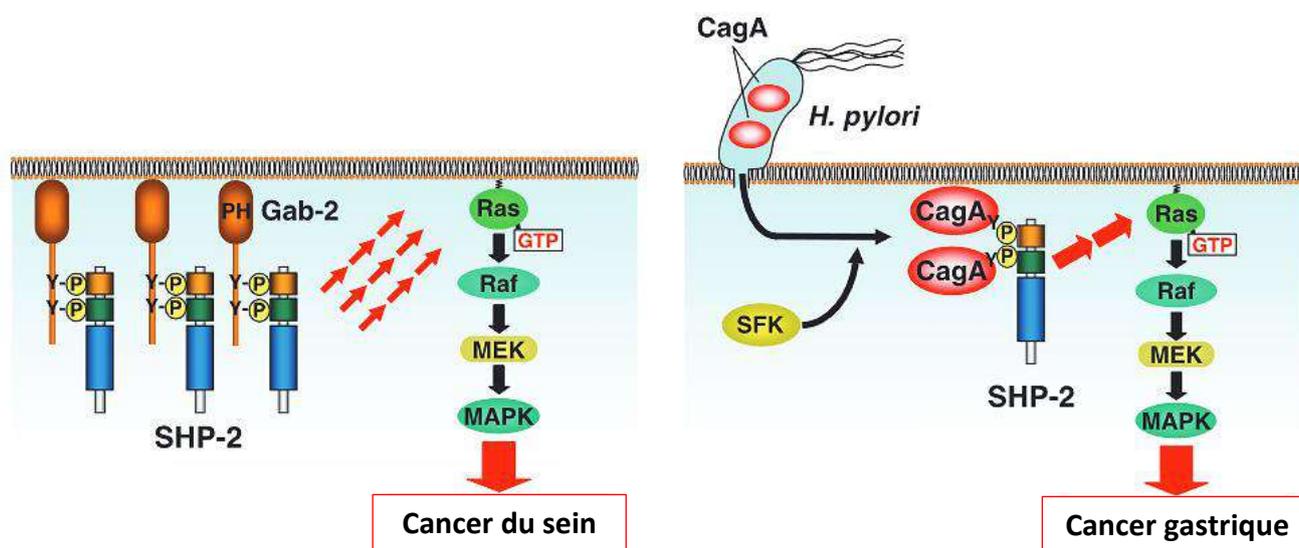


Figure 41 : Rôles de SHP-2 non mutée dans les cancers humains. D'après Matozaki *et al.*, 2009.

À gauche : Gab-2, une protéine d'amarrage contenant un domaine homologue de la pleckstrine (PH), se lie à SHP-2 et l'active en réponse à une variété de cytokines et de facteurs de croissance. La surexpression de Gab-2 dans le **cancer du sein humain** peut entraîner une hyperactivation de SHP-2 et une activation aberrante de la voie Ras-MAPK.

À droite : dans les cellules épithéliales gastriques infectées par *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), la protéine CagA injectée par la bactérie subit une phosphorylation de la tyrosine par les kinases de la famille Src (SFK). La CagA tyrosine-phosphorylée sert de protéine d'amarrage pour SHP-2 et déclenche ainsi une activation aberrante de SHP-2 et de la voie Ras-MAPK et le développement ultérieur d'un **cancer gastrique**. [186]

B) Les mutations de *PTPN11* dans le sarcome histiocytaire humain

Le **sarcome histiocytaire (SH) humain** étant une tumeur maligne **rare, orpheline**, aucun consensus sur son traitement n'a pu être établi et peu d'études génétiques ont été réalisées. Ainsi, l'importance des mutations somatiques dans cette maladie est très **mal connue**. D'après différentes études, le gène **le plus souvent** retrouvé muté dans ce cancer est le gène **BRAF** [9], [138].

Dans l'objectif d'identifier des mutations somatiques dans le **SH humain**, Liu *et al.* ont extrait l'ADN de ces tumeurs chez cinq patients. Ils ont ensuite séquencé les « *hotspots* mutationnels » dans cinquante gènes, dont des oncogènes bien connus : **BRAF principalement**, KRAS, PTEN, TP53, PIK3CA, ainsi que dans le gène *PTPN11*. Dans ces échantillons, **une mutation de *PTPN11*** a été trouvée à faible fréquence (**10,7%**) : la substitution d'acides aminés **G503V**, rapportée **également dans le sarcome histiocytaire canin**, comme nous allons l'exposer par la suite [218].

Dans un cas de **SH splénique** chez un homme rapporté par Batra *et al.* en 2016, des méthodes de séquençage nouvelle génération ont été utilisées pour analyser quinze gènes et trente-neuf *hotspots* oncogéniques dans des prélèvements tumoraux de la rate. Des **mutations de faible prévalence** ont été détectées (fréquence allélique inférieure à 10%) dans les gènes ASLX1, KIT, *PTPN11* et TP53, dont deux mutations somatiques différentes dans ***PTPN11* : Y63S et Q506R** [8], [138], [219].

En 2018, dans un cas rapporté par Zhang *et al.*, un patient était affecté d'une **histiocytose du système nerveux central, très agressive**, multifocale et dont l'issue a été fatale en huit mois. De nouveau, des méthodes de séquençage nouvelle génération ont été utilisées, et n'ont révélé **aucune mutation de BRAF**, pourtant fréquemment retrouvée dans les histiocytoses humaines. En revanche, la **mutation E76K du gène *PTPN11*** a été identifiée dans les cellules tumorales. La fréquence de l'allèle muté était de **28,2%**, d'après les tests réalisés sur un échantillon tissulaire, avec une cellularité tumorale estimée à 30% [220]. De la même façon, Voruz *et al.* ont rapporté en 2018 le cas d'un patient atteint d'un **SH de l'iléon terminal**, présentant la mutation **E76K** de *PTPN11* [221]. Enfin, en 2019, 28 cas de **SH humain** ont été analysés génétiquement, révélant la présence de deux mutations de *PTPN11*, à une faible fréquence, et préférentiellement dans les formes de SH disséminé et viscéral : **E76K** de nouveau, ainsi que **G60V** [222]. Ces deux mutations sont également détectées chez le chien.

En 2020, Egan *et al.* ont séquencé l'exome de **vingt-et-un échantillons tumoraux de SH primaires humains**. Quatre d'entre eux présentaient une mutation de *PTPN11* : **F71V, E76G, A72V, E76K**. Les trois premières mutations étaient associées à une mutation du gène NF1, et les tumeurs concernées étaient localisées dans le tractus gastro-intestinal. Cela suggère l'existence d'un **sous-type moléculaire** distinct de SH humain, caractérisé par des **altérations de *PTPN11* et de NF1** et fréquemment situé dans le **tractus gastro-intestinal** [7], [223].

Enfin, dans une étude de Hédan *et al.* en 2020, dix-neuf cas de **SH humain viscéraux** ont été séquencés, dont trois (soit **17,5%**) ont révélé des mutations de *PTPN11* : **K91E, E76K, E69K** [7].

Ainsi, la **mutation E76K est la mutation de *PTPN11* la plus fréquemment retrouvée dans les cancers humains**, ainsi que dans les histiocytoses malignes humaines. Elle entraîne une **activation constitutive** de la protéine **SHP-2**, qui stimule en permanence les voies de signalisation **RAS/MAPK et PI3K/AKT**, ce qui favorise les proliférations cellulaires oncogéniques. Cette mutation induirait également une **instabilité génomique** en perturbant directement les processus de mitose et de division cellulaire. La mutation **G503V**, également découverte dans des cas de SH canins, nécessiterait davantage

d'investigations en oncologie humaine pour éprouver sa fréquence et son rôle dans l'oncogénèse des histiocytoses malignes chez l'homme. Par ailleurs, toutes les **mutations de *PTPN11*** identifiées dans les SH humains semblent être **corrélées avec une localisation interne viscérale**. De plus, les formes **multifocales humaines**, déjà disséminées, seraient **plus agressives**, de la même façon que chez le chien [7], [138], [218], [220].

3.3.2. Choix du gène *PTPN11* pour la mise au point d'un test de diagnostic du sarcome histiocytaire chez les Bouviers Bernois

A) Les différentes mutations impliquées dans le sarcome histiocytaire canin : rôle majeur du gène *PTPN11*

Différentes études ont exploré les mutations génétiques impliquées dans le sarcome histiocytaire (SH) canin, notamment chez les Bouviers Bernois, comme mentionné dans la partie 2.2.3 de ce manuscrit. Ainsi, des **mutations somatiques** (des altérations du nombre de copies) associées à un **risque plus élevé de développer un SH chez les Bouviers Bernois** ont été identifiées dans les gènes **PTEN, CDKN2A/B, RB1 et *PTPN11***. Dans la plupart des travaux, les mutations découvertes **impliquaient** les voies de signalisation cellulaire ayant pour point de départ les récepteurs à tyrosine kinase (RTKs), notamment la **voie RAS/RAF/ERK/MAPK**, mais aussi la voie **PI3K-AKT** ou encore la voie impliquant les acteurs **STAT3**. Ces mutations faux-sens sont des modifications **gain de fonction, augmentant l'activité basale** des protéines mutées, **renforçant l'affinité** du domaine **N-SH2** pour ses ligands phosphorylés, **et améliorant la sensibilité de ces ligands** phosphorylés pour leur récepteur en amont ; ce qui augmente également l'activité de la voie de signalisation concernée [7]–[9], [138].

La principale voie touchée par les mutations engendrant un SH est la **voie des MAPK**. En effet, selon Hédan *et al.*, dans une cohorte de 111 chiens de différentes races atteints de SH, 63,9% des mutations identifiées altéraient cette voie, dont **56,7%** étaient des **mutations de *PTPN11***, et **7,2%** des mutations de **KRAS**. Les altérations touchant le gène BRAF étaient minimales dans cette étude, avec seulement 0,9% de mutations retrouvées [7]. Les **mutations de *PTPN11* semblent donc largement prédominantes** au sein des échantillons tumoraux ou sanguins obtenus auprès de patients canins atteints de SH.

Les principales mutations somatiques de *PTPN11* impliquées et retrouvées dans les différentes études sont les substitutions d'acides aminés suivantes :

- Sur l'exon 3 (domaine N-SH2) : **E76K** en grosse majorité (**32,3%** des mutations de *PTPN11* selon Takada *et al.* [8]), **E76G** et **G60D** ;
- Sur l'exon 13 (domaine PTP) : **G503V**, deuxième mutation de *PTPN11* la plus fréquente après E76K (**10,4%** des mutations de *PTPN11* selon Takada *et al.* [8]).

Comme chez l'homme, l'auto-inhibition du domaine PTP par le domaine N-SH2 est levée grâce à la mutation (perte d'affinité entre les domaines N-SH2 et PTP), ce qui entraîne une **activation constitutive** de SHP-2 et une stimulation accrue des acteurs en aval des voies de signalisation : ERK et PIK3. Cette activité excessive favoriserait la **tumorigénèse**, de **manière similaire** aux mécanismes rapportés dans les **cancers humains** présentant une mutation de *PTPN11*. Ainsi, dans le cas de la **mutation E76K**, les **interactions** avec les protéines **Grb2** pour la voie MAPK, et les interactions avec **GAB2** ou la sous-unité **p85** de PI3K pour la voie PI3K-AKT, sont **plus élevées qu'à l'état basal** et sont maintenues plus longtemps [7]–[9], [138]. De plus, **l'activité phosphatase** de la protéine SHP-2 mutée pour **E76K** serait

cinq fois plus forte qu'à l'état basal [8]. Dans le cas de la mutation **G503V**, l'étude de Niihori *et al.* aurait montré que l'**activité phosphatase** de SHP-2 serait **2,7 fois plus forte** que pour la protéine sauvage [224]. Il est intéressant de noter que ces deux mutations, **E76K et G503V**, **ne coexistent pas** dans une même localisation tumorale [8].

Les **mutations principales** dans le sarcome histiocytaire canin sont donc impliquées dans la voie **MAPK**, et concernent **notamment le gène PTPN11**, avec des « *hotspots* mutationnels » similaires à ce qui a été observé chez l'homme, ce qui encourage les **études translationnelles**.

B) Les mutations de PTPN11 sont prédominantes chez les Bouviers Bernois, en comparaison des autres races

Dans l'étude de Thaiwong *et al.*, cinquante-trois cas confirmés de sarcome histiocytaire ont été séquencés pour *PTPN11*. Parmi ces cas, la prévalence la plus haute de la **mutation E76K** de *PTPN11*, selon la race, était celle des **Bouviers Bernois** (trente individus) avec **36,6% d'individus mutés**. Dans les autres races (dix Golden Retrievers et dix individus d'autres races), E76K avait une prévalence de seulement 8,7%. Cette mutation n'a pas été retrouvée chez des individus sains, notamment pas chez des Bouviers Bernois sains [138].

Dans une étude très récente, trente-cinq mutations ont été identifiées dans des cas de sarcome histiocytaire canin (*Annexe 6*), concernant notamment : **TP53** (déjà identifiée auparavant), **PDGFRB** (*Platelet Derived Growth Factor B*), **PTPN11 dont E76K et G503V**, **SH3KBP1** (*SH3 domain containing kinase binding protein 1*). De plus, une **surexpression de FGFR1** (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*) a été notée, ce qui pourrait en faire une potentielle cible thérapeutique dans les voies de signalisation MAPK et PI3K-AKT [9].

Selon l'étude réalisée sur 109 chiens atteints de SH par Takada *et al.*, l'importance des mutations de *PTPN11* dans le SH canin peut être nuancée selon la race de chiens. En effet, la cohorte était constituée de 96 Bouviers Bernois et 13 Golden retrievers. Les **mutations de PTPN11** étaient retrouvées dans **42,7%** des échantillons de **Bouviers Bernois** et celles de **KRAS** dans **3,1%** des cas. Parallèlement, les **Golden Retrievers** ne présentaient la mutation de *PTPN11* que dans **23%** des cas ; et aucune mutation de **KRAS** [8]. Ainsi, les **mutations de PTPN11 sont certes majoritaires** au sein des sarcomes histiocytaires canins, mais cela est vrai **en particulier pour la race Bouvier Bernois**.

C) Les mutations de PTPN11 seraient spécifiques de la forme disséminée du sarcome histiocytaire

Au-delà de la spécificité supposée des mutations de *PTPN11* pour le SH canin, et en particulier chez les Bouviers Bernois, ces **altérations génétiques seraient également associées à la forme disséminée** du SH, **prédominante chez les Bouviers Bernois** et de très mauvais pronostic.

Dans l'étude de Takada *et al.*, pour les 93 chiens dont la localisation tumorale était connue, 44% avaient au moins deux organes affectés par le sarcome histiocytaire, et parmi eux, 39% présentaient une mutation de *PTPN11*. De plus, les travaux précédemment réalisés, en collaboration avec l'Équipe « Génétique du Chien » de l'IGDR et l'École Nationale Vétérinaire de Nantes-Oniris, ont montré que les **mutations de PTPN11 étaient associées à la forme disséminée interne viscérale du SH canin** [7], [8], [112].

D) Les mutations du gène *PTPN11* seraient spécifiques du sarcome histiocytaire disséminé des Bouviers Bernois

Enfin, les derniers travaux de recherche menés avant cette étude étaient favorables à l'hypothèse selon laquelle **les mutations somatiques de *PTPN11*** décrites ci-dessus étaient **spécifiques du SH des Bouviers Bernois**. Parmi les cinq tumeurs les plus fréquentes dans cette race (le sarcome histiocytaire, le mastocytome cutané canin, les sarcomes des tissus mous, le lymphome multicentrique et le mélanome), cette mutation n'était en effet retrouvée que dans des cas de sarcome histiocytaire [225]. De même, dans l'étude Takada *et al.*, aucune des mutations identifiées dans les prélèvements de sarcome histiocytaire canin n'a été retrouvée dans des échantillons de lymphome canin, ce qui renforce cette **hypothèse de spécificité vis-à-vis du sarcome histiocytaire chez le Bouvier Bernois** [8].

3.4. La mutation du gène *PTPN11* se retrouve dans l'ADN circulant du plasma de chiens atteints de sarcome histiocytaire

Comme expliqué dans la première partie de cette étude bibliographique, **les mutations de l'ADN circulant dans le plasma** peuvent être des **biomarqueurs**. Le support biologique est ici le plasma, issu d'une prise de sang, qui peut aussi être qualifiée de « **biopsie liquide** ». Pour rappel, l'ADN est libéré hors des cellules soit lors de la mort cellulaire, par **apoptose ou nécrose**, soit par **sécrétion active**, et subsiste environ cinq heures dans le sang. De plus, **l'augmentation de la concentration** d'ADN circulant dans le plasma est **corrélée avec la sévérité** et le **pronostic** de plusieurs maladies canines, dont notamment les néoplasies lymphoïdes et les carcinomes mammaires. La détection de mutations dans l'ADN tumoral circulant a déjà été **éprouvée comme biomarqueur de diagnostic de stades précoces** de certains cancers en **oncologie humaine** (cancer du sein, cancer colorectal, pulmonaire, ou ovarien) [226].

L'avantage des biopsies liquides consiste principalement en leur nature **minimalement invasives**, ce qui permet des analyses plus fréquentes, plus fiables (car non influencées par des paramètres telles qu'une sédation chimique ou une opération chirurgicale) et plus **accessibles**, aussi bien pour les vétérinaires que d'un point de vue éthique pour les propriétaires d'animaux.

Prouteau *et al.* ont montré dans une publication de 2021 que **l'ADN tumoral circulant** peut être **détecté dans le plasma** de chiens atteints de sarcome histiocytaire (SH), avec une **sensibilité de 91,3%**. Pour cette étude, des échantillons plasmatiques de quarante-neuf Bouviers Bernois atteints de SH (dix-sept formes disséminées, trente formes localisées et deux formes inconnues) ont été collectés et les prélèvements tumoraux correspondants étaient disponibles pour quarante-cinq de ces chiens. Pour quantifier précisément la quantité d'ADN circulant dans le plasma, une méthode de séquençage nouvelle génération (NGS : *Next-Generation Sequencing*) a été utilisée : la **ddPCR (droplet digital PCR)**, qui permet d'obtenir une **quantification absolue de la présence d'un allèle** (Figure 42). Cette même méthode a été effectuée pour **détecter les deux « *hosptots* mutationnels » de *PTPN11*** dans le SH du Bouvier Bernois : **E76K et G503V**. Parmi les échantillons tumoraux, une des mutations *PTPN11* a été découverte dans 51,1% des cas. Au sein des cas positifs pour une mutation de *PTPN11*, 91,3% des chiens présentaient la même mutation dans l'ADN circulant du plasma, avec une fréquence allélique allant de 0,056 à 36%.

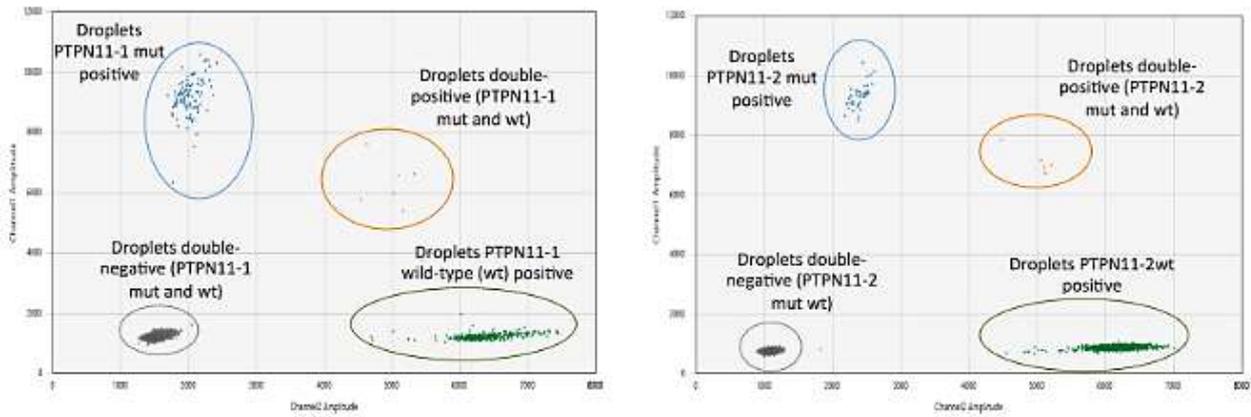


Figure 42 : Exemple de données issues du test multiplex de ddPCR pour la quantification absolue des mutations de *PTPN11* (*PTPN11-1* pour la variante E76K et *PTPN11-2* pour la variante G503V) dans le sarcome histiocytaire canin. D'après Prouteau *et al.*, 2021.

Exemples de diagrammes de grappes bidimensionnels tirés du logiciel *QuantaSoft* (version 1.7.4, Bio-Rad, disponible gratuitement après enregistrement : <https://www.bio-rad.com/fr-fr/sku/1864011-quantasoft-software-regulatory-edition>) dans lesquels *PTPN11-1mut* (à gauche) ou *PTPN11-2mut* (à droite) sont représentés par rapport à *PTPN11-1* de type sauvage (wt) et *PTPN112wt*, respectivement. Les gouttelettes forment des groupes qui doivent être disposés orthogonalement les uns par rapport aux autres et représentent les échantillons *PTPN11mut/PTPN11wt* négatifs (gouttelettes doublement négatives, en gris), *PTPN11mut* positifs (en bleu), *PTPN11wt* positifs (en vert) et *PTPN11mut/PTPN11wt* positifs (gouttelettes doublement positives, en orange). [2]

Les paramètres de validation de ce test ont ainsi pu être calculés : la détection des mutations de *PTPN11* dans l'ADN tumoral circulant de ces chiens a pu être réalisée avec une **spécificité de 98,8%** et une **sensibilité variant de 42,8 à 77%**, selon la présentation clinique du sarcome histiocytaire [2].

Cette étude est **très prometteuse pour la poursuite des travaux de recherche** sur l'exploitation des mutations de *PTPN11* comme potentiels biomarqueurs de diagnostic du sarcome histiocytaire canin. De même, pour notre partie expérimentale, cela donne déjà un aperçu des méthodes à utiliser pour détecter les mutations E76K et G503V dans l'ADN circulant du plasma.

BILAN

Dans cette sous-partie, nous avons pu voir que le gène *PTPN11* codait pour la protéine SHP-2, intracellulaire, remplissant de nombreux rôles dans les voies de signalisation, notamment les voies MAP-Kinases, PI3K-AKT et JAK/STAT. Ainsi, SHP-2 favorise la prolifération et la survie cellulaire et peut être impliquée dans les processus de tumorigénèse (Figure 43).

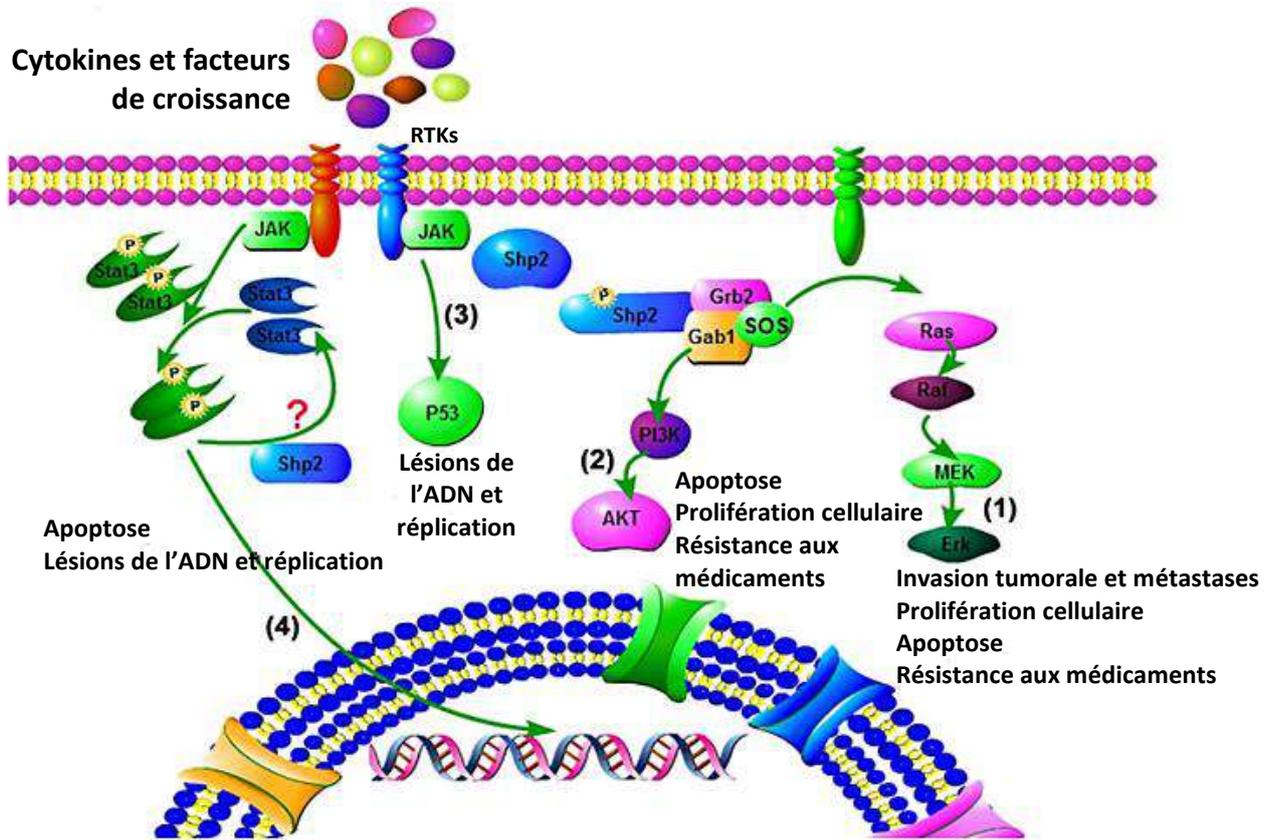


Figure 43 : Schéma de la signalisation et des fonctions de la protéine SHP-2, codée par le gène *PTPN11*. D'après Zhang *et al.*, 2015.

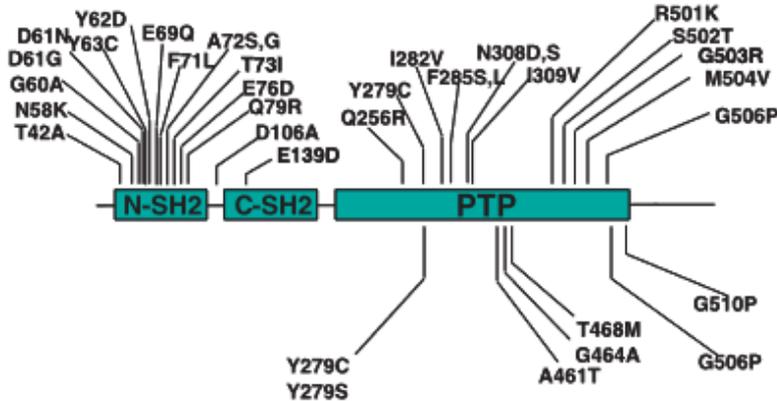
- (1) Certaines cytokines et facteurs de croissance se lient aux Récepteurs Tyrosine Kinase (RTKs) qui peuvent alors phosphoryler Shp2 ; celle-ci se lie à Grb2/SOS pour activer la signalisation Ras/Erk, de manière à favoriser l'invasion tumorale et les métastases.
- (2) Gab1 peut se lier à Shp2 et activer la signalisation PI3K/AKT pour réguler la prolifération des cellules tumorales, l'apoptose des tumeurs et la résistance aux médicaments. L'activité phosphatase de Shp2 joue un rôle essentiel dans le contrôle de ces processus.
- (3) Shp2 participe à la signalisation de p53 pour réguler les dommages et la réplication de l'ADN dans le cancer.
- (4) Stat3 peut être phosphorylé pour former un dimère, il est alors important pour la progression de la tumeur ; mais il peut aussi être déphosphorylé par Shp2. Les interactions entre Stat3 et Shp2 doivent donc encore être étudiées. [215]

Les mutations du gène *PTPN11* entraînent une **altération de la structure de la protéine SHP-2** en supprimant l'interaction auto-inhibitrice entre les domaines N-SH2 et PTP, ce qui provoque une **conformation active constitutive**, et donc une activité phosphatase permanente. Cela stimule de façon accrue les voies de signalisation intracellulaires, entraînant une **prolifération cellulaire incontrôlée**.

Suite BILAN

Les mutations du gène *PTPN11*, faux-sens et gain-de fonction, ont ainsi été étudiées dans certaines maladies humaines, montrant qu'elles peuvent engendrer des processus néoplasiques, comme des désordres développementaux (syndrome de Noonan, syndrome LEOPARD) ou myéloprolifératifs (Figure 45, Figure 44).

Mutations du syndrome de Noonan et des leucémies



Mutations du syndrome LEOPARD

Figure 45 : Mutations dans la protéine SHP-2 associées à des maladies humaines. D'après Kontaridis *et al.*, 2006.

Les mutations associées au syndrome de Noonan et aux néoplasies sont réparties dans l'ensemble de SHP-2, tandis que toutes les mutations associées au syndrome LEOPARD se trouvent dans le domaine PTP. [204]

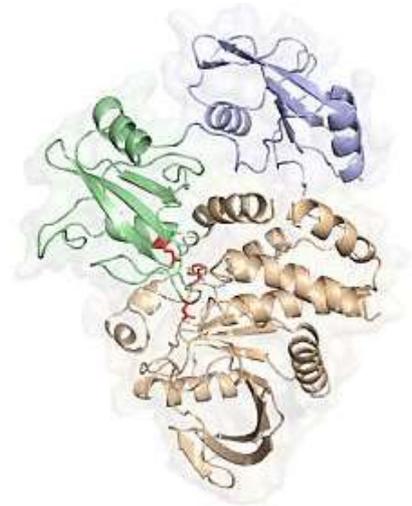


Figure 44 : Schéma en rubans de la protéine SHP-2 auto-inhibée ; les sites des mutations oncogéniques sont représentés en rouge. D'après LaRoche *et al.*, 2018.

Les sites des mutations oncogéniques se localisent à l'interface interdomaine N-SH2/PTP. Le domaine N-SH2 de SHP-2 est représenté en bleu, C-SH2 en vert, PTP en beige. [190]

Chez l'homme comme chez le chien, des mutations de *PTPN11* sont également retrouvées chez les patients atteints de sarcome histiocytaire. Chez le chien, le gène *PTPN11* est le gène le plus muté dans les cas de sarcome histiocytaire. Ces mutations sont encore plus fréquentes au sein de la race Bouvier Bernois ; d'autre part elles semblent être associées à la forme disséminée du sarcome histiocytaire. Ainsi, ces constats suggèrent fortement que les mutations de *PTPN11* seraient spécifiques du sarcome histiocytaire disséminé du Bouvier Bernois. Les principales mutations concernées sont les substitutions d'acides aminés E76K et G503V (Figure 46).

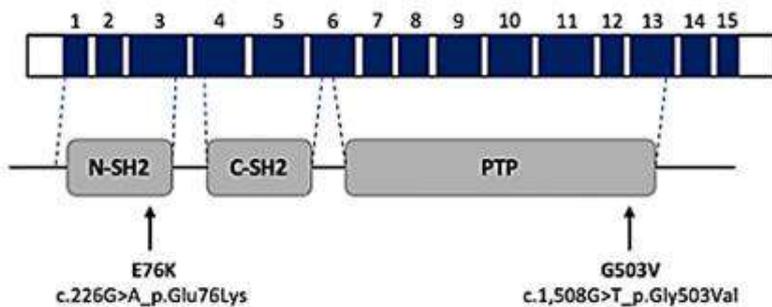


Figure 46 : Schéma du produit du gène *PTPN11* avec les domaines fonctionnels correspondants de la protéine SHP-2, indiquant les emplacements des mutations E76K et G503V, avec les changements d'acides aminés prédits. D'après Takada *et al.*, 2019.

La barre supérieure est une représentation schématique de la structure génomique avec les exons numérotés (bleu foncé), et la barre inférieure représente les domaines fonctionnels. [133]

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE : MISE AU POINT D'UN BIOMARQUEUR DE DIAGNOSTIC DU SARCOME HISTIOCYTAIRE CHEZ LE BOUVIER BERNOIS

1. Contexte et objectifs de l'étude : pertinence d'un test de détection des mutations du gène *PTPN11* comme biomarqueurs de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire chez le Bouvier Bernois

L'équipe « Génétique du Chien » de l'Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR UMR 6290 CNRS-UR1), sous la double tutelle du CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) et de l'Université de Rennes 1, s'intéresse actuellement à déterminer la **pertinence diagnostique des mutations du gène *PTPN11*** pour le sarcome histiocytaire (**SH**) des Bouviers Bernois. En collaboration avec cette équipe, notre travail s'est donné pour objectifs :

- De réaliser une **banque d'échantillons plasmatiques** de Bouviers Bernois, prélevés tous les trois mois pendant plus de deux ans ;
- D'identifier la **cause du décès** des animaux, le cas échéant ; et en cas de suspicion de **sarcome histiocytaire**, de **confirmer** ou d'infirmer ce diagnostic par **analyse histopathologique**, sur l'ensemble des organes suspects ;
- De documenter la **présence ou l'absence des mutations de *PTPN11*** dans les prélèvements tissulaires de sarcome histiocytaire ;
- D'associer ou non la présence de ces mutations dans les échantillons tumoraux à **la présence de la (les) même(s) mutation(s) dans l'ADN plasmatique** du prélèvement le plus récent ;
- D'estimer le **décali de précocité du diagnostic** de sarcome histiocytaire par détection des mutations *PTPN11* d'intérêt en analysant les échantillons plasmatiques antérieurs au décès de l'animal ;
- D'estimer le **coût** de cette technique de diagnostic pour les propriétaires de Bouvier Bernois ;
- D'évaluer **l'intérêt, auprès des particuliers et des éleveurs**, que pourrait présenter un tel test de diagnostic précoce s'il était mis sur le marché et rendu accessible au grand public ;
- D'étudier la faisabilité et la **pertinence d'une prise en charge précoce** de ces cas de sarcomes histiocytaires afin d'améliorer leur taux de survie.

Rappelons que les formes cliniques du sarcome histiocytaire peuvent correspondre à trois catégories :

- Les formes cliniques **localisées**, qui se manifestent le plus **souvent** par **une masse externe unique**, cutanée, sous-cutanée ou périarticulaire. Les nœuds lymphatiques locorégionaux de ces régions anatomiques « superficielles » sont également considérés comme partie intégrante des formes externes ;
- Les formes cliniques **disséminées** que nous pouvons aussi appeler formes **internes multiples**. Ces formes correspondent à des formes **viscérales** (splénique, pulmonaire ou hépatique notamment) et ont un pronostic plus défavorable que les formes localisées, avec une généralisation du cancer plus rapide, plus agressive et de développement plus insidieux.
- La forme clinique **hémophagocytaire**. Cette forme est la **plus agressive et fulgurante** par rapport aux précédentes ; elle présente une grande rapidité d'évolution et un **très mauvais pronostic**. Elle prend naissance dans les populations macrophagiques de la pulpe rouge splénique ou de la moelle osseuse. Cette forme peut être incluse parmi les formes disséminées, internes.

De plus, les **travaux effectués antérieurement** par l'Équipe « Génétique du Chien » de l'IGDR ont montré :

- la **prédominance** du sarcome histiocytaire (SH), en particulier de la **forme disséminée**, chez la race **Bouvier Bernois** [227]–[229] ;
- la **circulation de cellules cancéreuses et d'ADN tumoral** dans le sang de chiens atteints de SH disséminé [230] ;
- l'association des mutations de *PTPN11* avec les **formes internes** du SH [112], [174], [230] ;
- ainsi que la **spécificité** de cette association chez les **Bouviens Bernois** [225].

Comme nous l'avons décrit dans la partie bibliographique de ce travail, les **mutations décrites dans les sarcomes histiocytaires** canin et humain (E76K et G503V) peuvent être **détectées dans l'ADN circulant du plasma des Bouviens Bernois** affectés par un sarcome histiocytaire. Ce résultat est à la base de notre étude expérimentale, au cours de laquelle nous avons recherché des mutations de *PTPN11*, dont **E76K et G503V**, dans l'ADN circulant du plasma de Bouviens Bernois, afin **d'estimer la pertinence** d'utiliser ces mutations comme **biomarqueurs de diagnostic précoce** du sarcome histiocytaire chez les Bouviens Bernois.

Notre **hypothèse** est ainsi la suivante : la détection précoce des mutations du gène *PTPN11* dans le plasma est associée à une apparition ultérieure d'une forme interne, disséminée de sarcome histiocytaire et peut permettre une amélioration de la survie chez les Bouviens Bernois concernés, par une prise en charge plus précoce et un traitement plus adapté, tel que notamment une thérapie ciblée sur la protéine SHP-2 codée par le gène *PTPN11*.

2. Matériels et méthodes

2.1. Origine des échantillons

2.1.1. Cohorte de chiens sélectionnés

La cohorte originelle de Bouviers Bernois prélevés dans cette étude se composait de **quarante chiens** issus de **deux élevages** différents :

- L'élevage du Logis de Sainte-Macrine dans les Deux-Sèvres (79), géré par Madame Véronique Aveline ;
- L'élevage de la Vallée de l'Hyrome dans le Maine-et-Loire (49), géré par Madame Alexandra Vincent.

Des prises de sang ont été réalisées chez les chiens à partir de février 2021, à raison d'une prise de sang **tous les trois mois**, jusqu'à mai 2023, soit sur une durée **d'un peu plus de deux ans**. Ces prélèvements ont été particulièrement **réguliers**, grâce à notre déplacement sur les élevages mêmes. Plusieurs chiens étant déjà placés chez des particuliers, des kits de prélèvements, incluant un protocole de prélèvement ainsi qu'un questionnaire clinique, ont été envoyés directement chez ces propriétaires afin que la prise de sang trimestrielle soit réalisée chez le vétérinaire traitant ([Annexe 7](#)). Les coordonnées des propriétaires nous ont été transmises par les éleveurs. Ces prélèvements furent moins réguliers, car soumis aux impératifs personnels des particuliers.

2.1.2. Échantillons plasmatiques et tumoraux

Les prises de sang ont été réalisées sur **tube EDTA** (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique), et les tubes ont été **immédiatement centrifugés** après prélèvement à 4500 g (ou RCF : *Relative Centrifugal Force*) pendant dix minutes afin d'en **recupérer le plasma sur des tubes secs** distincts. Il est important d'isoler le plasma juste après le prélèvement, avant que les leucocytes et autres cellules circulantes ne se dégradent. En effet, elles libéreraient alors leur ADN cellulaire, susceptible de diluer l'ADN tumoral circulant (ADNtc), et donc de diminuer la sensibilité de notre protocole de détection des mutations dans l'ADNtc.

Le plasma est le matériel de base dans cette étude, bien que les analyses aient également été faites sur le sang total ou sur les culots cellulaires sanguins obtenus après centrifugation. L'ensemble des tubes a ensuite été réceptionné à l'Institut Génétique et Développement de Rennes (IGDR), enregistré et stocké dans le Centre de Ressources Biologiques Cani-DNA (**CRB Cani-DNA**), bio-banque d'échantillons canins rassemblant des prélèvements de sang et de tissus de chiens de toutes races accompagnés de leurs données généalogiques, phénotypiques et cliniques. L'objectif était ensuite **d'extraire l'ADN** de tous ces prélèvements et de stocker les échantillons correspondants.

Lors du décès d'un chien, celui-ci est **autopsié** et des **prélèvements** sont réalisés sur des organes clés, fréquemment affectés lors de sarcome histiocytaire disséminé, et en particulier sur les organes où un processus prolifératif est visible macroscopiquement : rate, foie, poumons et nœuds lymphatiques le plus souvent. Si le chien présentait une lésion sur un autre organe, celle-ci était également prélevée en post mortem. Ces prélèvements ont été envoyés au Laboratoire LabOniris, secteur d'analyse histopathologique animale, fixés dans du formol, et ont par la suite été inclus dans un bloc de paraffine, dit **bloc FFPE**

(*Formol-Fixed Paraffin Embedded*). Ces échantillons ont fait l'objet d'une **analyse histopathologique** par le Docteur Jérôme Abadie, Maître de Conférences en Histologie et Anatomie pathologique à Oniris.

2.1.3. Confirmation des diagnostics de sarcome histiocytaire par analyse histopathologique

Au laboratoire **LabOniris**, des **coupes histologiques** ont d'abord été réalisées à partir des blocs FFPE, puis les lames obtenues ont été soumises à coloration histologique conventionnelle Hémalum-Éosine-Safran (HES). Comme indiqué dans la partie bibliographique 1.1, les histiocytes sont identifiables sur coupe histologique grâce à leurs caractéristiques morphologiques, mais également grâce à des marquages immunohistochimiques permettant de confirmer le phénotype histiocytaire des cellules observées.

Au microscope, les histiocytes tumoraux sont des **grandes cellules** – de taille plus importante que les cellules de l'organe concerné – et **pléiomorphes** (*i.e.* possédant la propriété de présenter des formes variables sous diverses influences [20]) (Figure 47, Figure 48, Figure 49). Les caractéristiques morphologiques des cellules histiocytaires principalement retrouvées sont décrites ci-dessous :

- elles sont **arrondies, ou fusiformes** avec de longs prolongements cytoplasmiques et une organisation en faisceaux ; souvent ces deux types cellulaires sont présents au sein d'une même lésion ;
- elles sont **mononucléaires ; ou géantes et multinucléées** avec une morphologie atypique ;
- les noyaux des cellules géantes multinucléées sont larges, ronds et ovales, ou indentés et tordus, ils contiennent **un ou plusieurs nucléoles** ; tandis que les autres noyaux sont légèrement plus petits, ronds ou allongés et caractérisés par une chromatine plus condensée et plus grossière ;
- elles possèdent un cytoplasme modéré à abondant, amphophile (peut se colorer à la fois par les colorants acides et par les colorants basiques [20]) et un noyau basophile avec la coloration HES ;
- elles contiennent régulièrement de **nombreuses vacuoles** ;
- elles présentent des **atypies cellulaires** marquées : anisocytose (population de cellules de taille inégale [20]), anisocaryose (présence de noyaux de taille inégale dans une population cellulaire [20]), caryomégalie (noyau de taille augmentée) ;
- de **nombreuses figures de mitoses** d'aspect parfois anormal sont retrouvées ; avec une à sept figures de mitoses par champ au grossissement x40 (HPF) ;
- elles **infiltrent différents organes** selon les individus : poumons, foie, reins, nœuds lymphatiques ;
- elles sont régulièrement associées à des **cellules rondes mésenchymateuses** (cellules peu différenciées) et/ou des **infiltrats** de cellules **inflammatoires**, notamment neutrophiliques (type cellulaire constamment observé) ;
- de multiples zones de **nécrose** peuvent être observées au sein du tissu tumoral.

- Leur prolifération, intense, résulte communément en un **effacement de l'architecture** normale des tissus ;
- des **figures de phagocytoses** notamment d'érythrocytes, de leucocytes (neutrophiles), de cellules tumorales, ou de fragments cellulaires non identifiables peuvent aussi être observées [4], [113], [117], [118], [121], [123], [127].

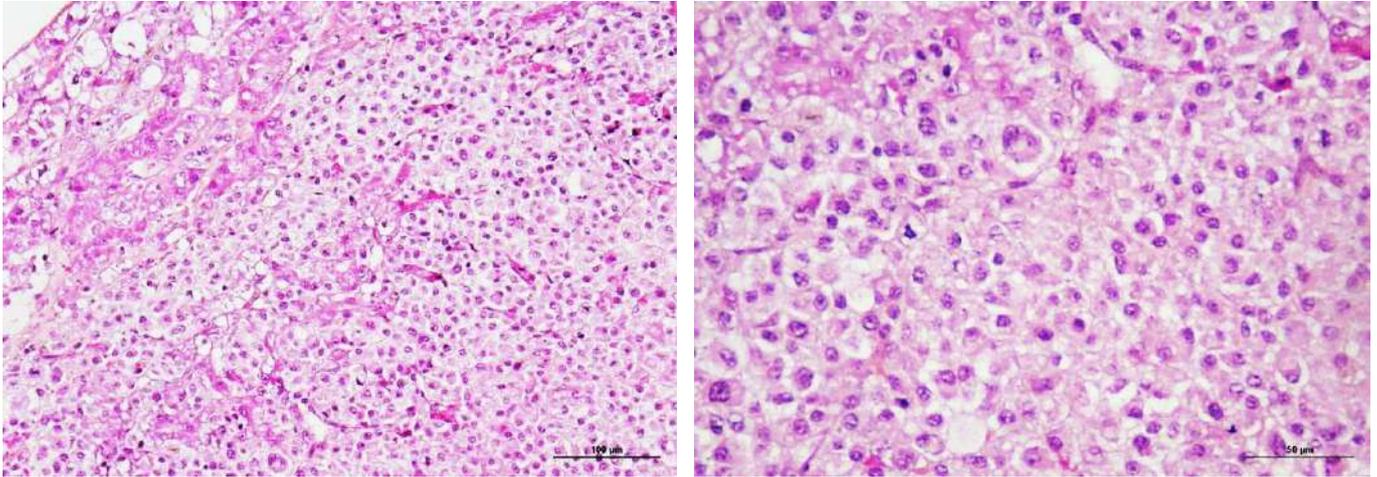


Figure 47 : Vue au microscope optique au grossissement 20 (à gauche) et 40 (à droite), d'une coupe histologique colorée avec la coloration HES, d'un infiltrat cellulaire hépatique de sarcome histiocytaire disséminé chez le chien 20272. Photographies : Jérôme Abadie, Oniris.

L'échelle (barre noire) représente 100 µm à gauche, 50 µm à droite.

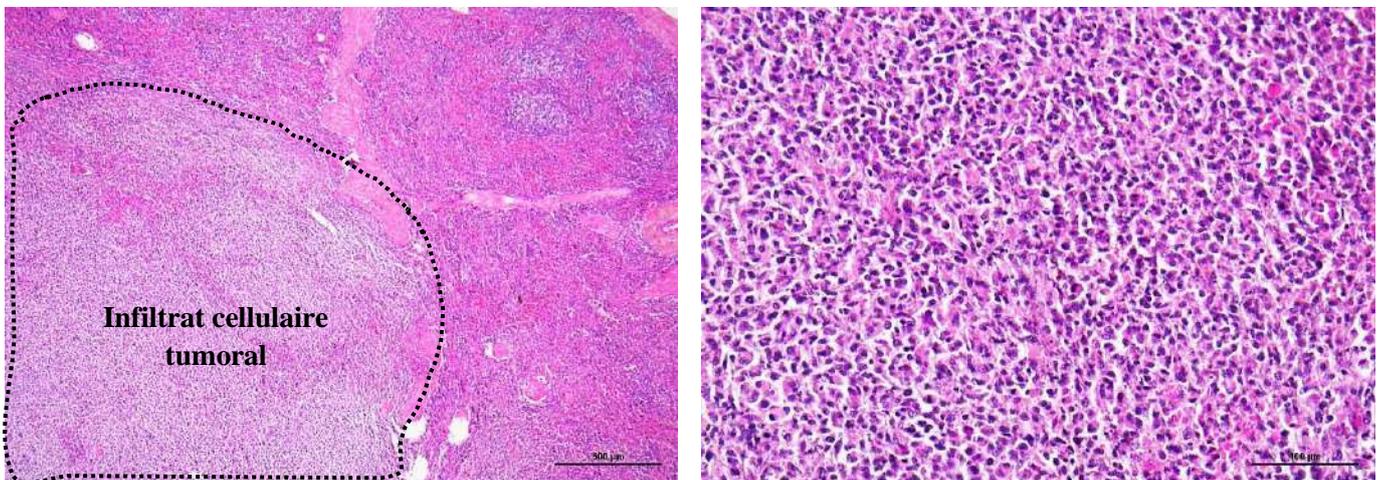


Figure 48 : Vue au microscope optique au grossissement 4 (à gauche) et 20 (à droite), d'une coupe histologique colorée avec la coloration HES, d'un infiltrat cellulaire splénique de sarcome histiocytaire disséminé chez le chien 19863. Photographies : Jérôme Abadie, Oniris.

L'échelle (barre noire) représente 500 µm à gauche, 100 µm à droite.

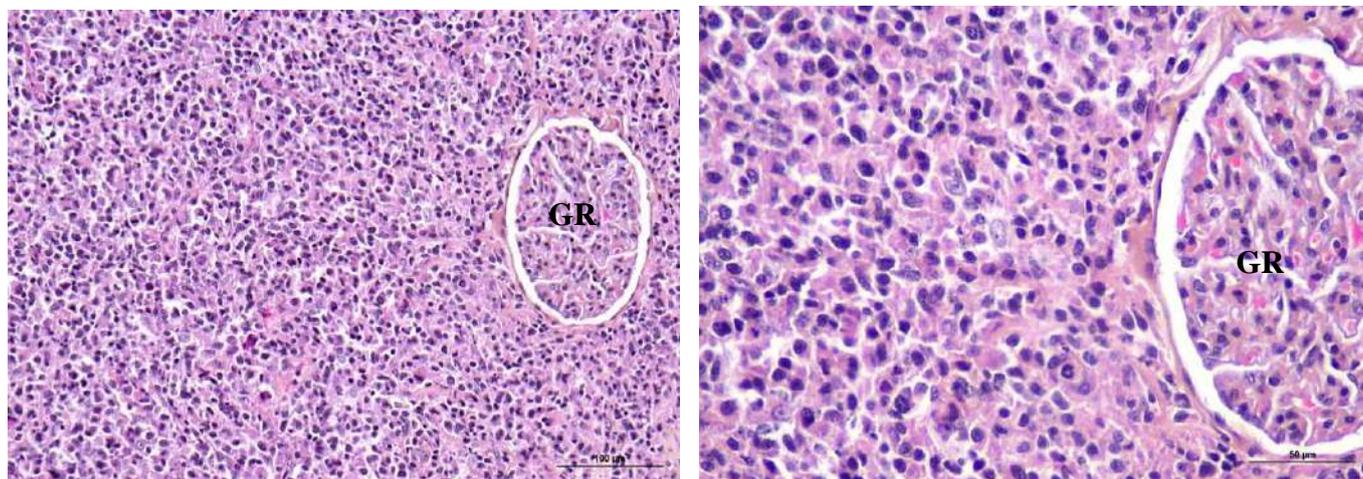


Figure 49 : Vue au microscope optique au grossissement x20 (à gauche) et x40 (à droite), d'une coupe histologique colorée avec la coloration HES, d'un infiltrat cellulaire rénal de sarcome histiocytaire disséminé chez le chien 19863. Photographies : Jérôme Abadie, Oniris.

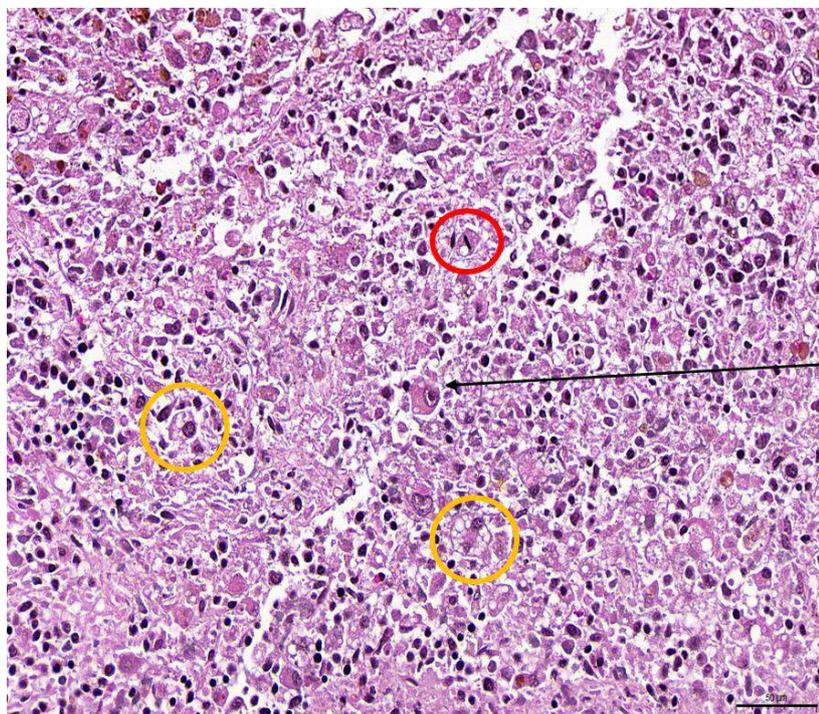
GR : Glomérule rénal. L'échelle (barre noire) représente 100 μm à gauche, 50 μm à droite.

Toutes ces caractéristiques morphologiques étant communes avec de nombreux autres processus néoplasiques malins, un **diagnostic différentiel** doit être fait d'autres cancers, notamment les sarcomes des tissus mous, les lymphomes, les mélanomes amélanotiques, les mastocytomes et les plasmocytomes. Par exemple, l'aspect fusiforme des cellules peut parfois entraîner une confusion avec des cellules sarcomateuses non histiocytaires [122], [123].

Ainsi, pour un **diagnostic définitif de certitude**, et lorsque la qualité des échantillons prélevés et des coupes histologiques réalisées ne permettait pas de garantir l'origine histiocytaire des infiltrats cellulaires observés [113], des **marquages immunohistochimiques** se sont avérés nécessaires pour confirmer le type cellulaire. Comme mentionné dans la sous-partie bibliographique 1.1.2, les marqueurs complémentaires et nécessaires pour confirmer le diagnostic du sarcome histiocytaire (SH) sont représentés par le phénotype suivant : **CD18+** (ou **CD45+**), **CD3-**, **CD79-**. Pour aller plus loin et préciser l'origine cellulaire de la tumeur, les phénotypes suivants peuvent être utilisés :

- Pour les cellules dendritiques : **CD1+**, **CD11c+**, **Iba-1+**, **CMH II+**
- Pour les macrophages : **CD11b+** (ou **d+** dans le cas d'un SH hémophagocytaire), **CD204+**, **CD163+**, **Iba-1 +**.

Il est à noter qu'aucun critère histopathologique ou immunohistochimique permet aujourd'hui de distinguer, sur un prélèvement tissulaire isolé, un SH localisé d'un SH disséminé [113]. En revanche, il est possible de **différencier ces deux formes d'un SH hémophagocytaire**. Dans cette forme clinique en effet, les cellules présentent un cytoplasme abondant et éosinophile, souvent vacuolisé, avec des dépôts d'hémosidérine importants. **L'érythrophagocytose** et la phagocytose leucocytaire sont bien **plus marquées**, tandis que l'aspect pléiomorphe est moins présent (Figure 50, Figure 51). Une activité d'érythropoïèse extramédullaire ainsi que des plasmocytes sont fréquemment associées aux cellules tumorales dans cette forme clinique [117], [119], [123]. De plus, comme décrit ci-dessus, les cellules d'un SH hémophagocytaire ont un **phénotype CD11d+ et Iba-1+**.



Cellules histiocytaires larges et rondes :
 - cytoplasme éosinophilique abondant
 - noyau large avec chromatine condensée hyperchromatique
 - nucléole important

Figure 50 : Vue au microscope optique d'une coupe histologique colorée avec la coloration HES, d'un infiltrat cellulaire splénique de sarcome histiocytaire hémophagocytaire chez le chien 19963.

Photographies : Marie Cuvelier, Oniris.

Une figure de mitose est encerclée en rouge ; de nombreuses figures de phagocytose sont encerclées en orange, avec de l'hémossidérine intracellulaire fréquemment retrouvée (pigment brun). L'architecture splénique (pulpe rouge/pulpe blanche) est effacée par la population de cellules néoplasiques. L'échelle (barre noire) représente 50 μm.

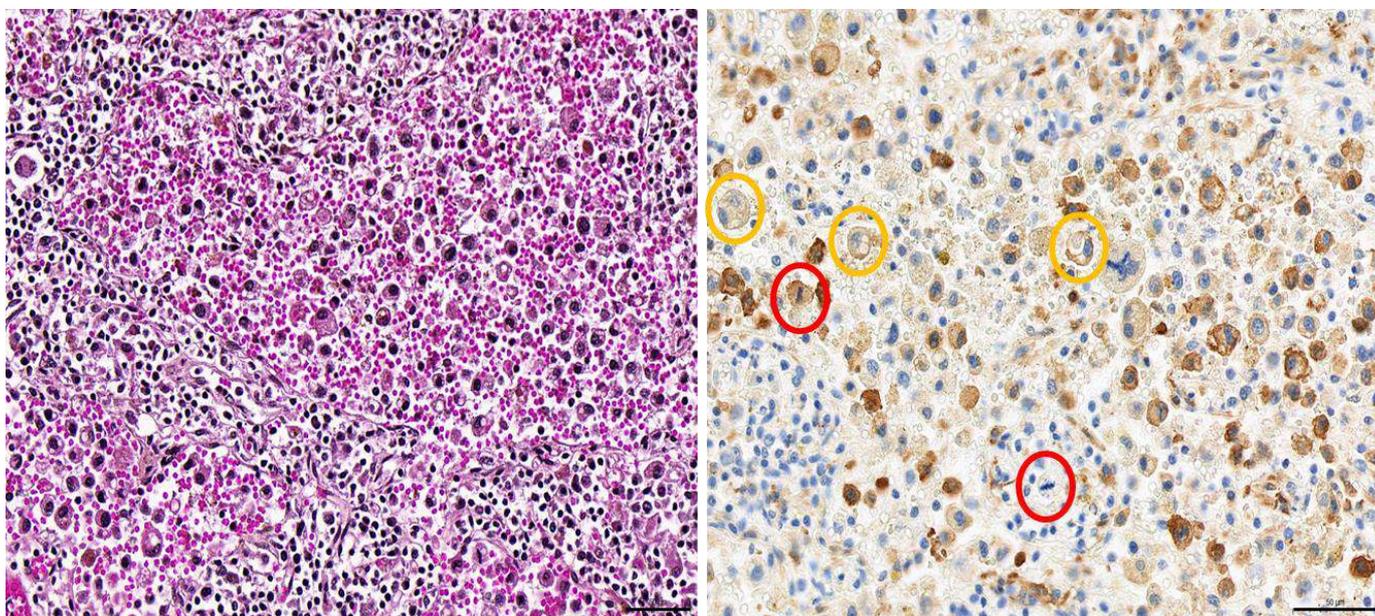


Figure 51 : Vue au microscope optique d'une coupe histologique avec la coloration HES (à gauche) et avec immunomarquage Iba-1 (à droite), d'un infiltrat cellulaire de sarcome histiocytaire hémophagocytaire dans un nœud lymphatique chez le chien 19963.

Photographies : Marie Cuvelier, Oniris.

Des figures de mitoses sont encerclées en rouge et de nombreuses figures de phagocytose sont encerclées en orange. L'échelle (barre noire) représente 50 μm.

Si l'analyse histopathologique **confirmait un cas de sarcome histiocytaire** supposé cliniquement, les **échantillons plasmatiques** du chien correspondant ainsi que les échantillons de sang, conservés à l'IGDR, étaient analysés pour **rechercher les mutations d'intérêt du gène *PTPN11***. Sur les échantillons tumoraux n'étant pas diagnostiqués comme sarcome histiocytaire à l'histopathologie, les mutations de *PTPN11* ont tout de même été recherchées dans les prélèvements tissulaires afin d'écartier l'hypothèse de sarcome histiocytaire et de confirmer une nouvelle fois la spécificité de ce test.

2.2. Critères d'inclusion

2.2.1. Choix de la cohorte de Bouviers Bernois

Lors de la constitution de notre cohorte, nous avons contacté plusieurs élevages de Bouviers Bernois dans les environs de Rennes, où est basé l'IGDR. Les éleveurs devaient accepter des **visites régulières**, tous les trois mois, pour réaliser des **prises de sang** sur un certain nombre de leurs chiens ; par ailleurs, d'un point de vue pratique, ils devaient être assez **proches de Rennes et entre eux** afin de pouvoir faire l'ensemble des prélèvements sur une seule journée. Deux élevages ont répondu positivement à notre demande, l'élevage du **Logis de Sainte-Macrine** et celui de la **Vallée de l'Hyrome**.

La deuxième étape de mise en place de cette cohorte était de choisir **l'âge à partir duquel les chiens allaient être prélevés**. Pour cela, trois données principales étaient à prendre en compte :

- la **durée** sur laquelle nous souhaitions faire les prélèvements : l'objectif fixé a été de **deux ans**.
- **l'espérance de vie moyenne** de la race Bouvier Bernois. Selon les études les plus récentes, l'espérance de vie moyenne de cette race est de 8,25 ans (études réalisées en Allemagne et en Suisse [231], [232]), l'âge médian est de 8,4 ans selon une étude menée en Suisse [231] ; et de 8,0 ans dans une étude menée aux Pays-Bas [132] et une autre menée au Royaume-Uni [233]. Nous retenons donc une **moyenne d'âge entre 8 et 8,5 ans**, âge au-delà duquel un Bouvier Bernois avait moins de probabilité d'être en vie et donc de développer un sarcome histiocytaire.
- **l'âge moyen au diagnostic** du sarcome histiocytaire (SH). Des études menées à ce sujet révèlent un âge moyen au diagnostic de **6,5 ans** (étude sur 89 Bouviers Bernois publiée en 2009) [120] ; **7,7 ans** sur 68 Bouviers Bernois (article paru en 2011) [137] ; ou **6,6 ans** sur 365 Bouviers Bernois atteints de SH (publication de 2022) [129]. Les âges au diagnostic s'étendaient respectivement, pour ces trois études, de deux à onze ans [120] ; de deux à douze ans [137] ; de 0,6 à 12,2 ans [129]. Dans des études plus récentes, l'âge au diagnostic était plus tardif : âge moyen de **7,9 ans** dans une cohorte de 30 Bouviers Bernois, dont neuf avaient une forme localisée et non disséminée (Thaiwong *et al.*, 2018) [138] ; âge médian de **8,3 ans** pour 92 chiens dans une étude ultérieure de la même équipe de recherche (Takada *et al.*, 2019) [8]. L'objectif étant de pouvoir détecter un potentiel sarcome histiocytaire plus précocement que ce qui peut être fait aujourd'hui en clinique vétérinaire, nous avons intérêt à prendre des chiens **plus jeunes que 6,5 ans** afin de pouvoir remonter dans les prélèvements et étayer notre hypothèse de détection précoce grâce aux mutations du gène *PTPN11*.

L'ensemble de ces données nous a conduits à **choisir des chiens âgés d'environ cinq ans ou plus**, ce qui permettrait dans le cas du développement d'un sarcome histiocytaire, de pouvoir remonter en moyenne d'un an et demi dans les prélèvements pour rechercher les mutations. Les chiens sélectionnés dans les élevages ont donc été ceux **nés au cours de l'année 2016** (cinq ans avant le début des prélèvements en 2021) **et plus tôt**.

2.2.2. Critères d'exclusion

Par la suite, parmi les quarante chiens de la cohorte initiale, certains ont été exclus. Tout d'abord, les chiens devaient être de **race Bouviers Bernois pure**. Ainsi, deux chiens de l'élevage de la Vallée de l'Hyrome, un mâle et une femelle, ont été exclus, étant des chiens croisés des races Bouviers Bernois et Berger Australien.

De plus, à la fin de la collecte des prises de sang en mai 2023, la régularité des prélèvements a été vérifiée pour chaque chien. Les individus n'ayant eu **qu'une prise de sang ne présentaient pas d'intérêt** dans le cadre de notre travail, car il nous était alors impossible de remonter dans le temps sur d'autres échantillons dans le cas de la présence d'une mutation sur le dernier prélèvement. Ainsi, trois mâles issus de l'élevage du Logis de Sainte-Macrine, placés chez des particuliers, ont été exclus car nous n'avions effectué qu'un seul prélèvement pour chacun en mars 2021.

La **cohorte finale** ayant pu être exploitée, de chiens de race Bouviers Bernois pure, comporte donc **trente-cinq chiens**, neuf mâles et vingt-six femelles, pour lesquels au moins deux prélèvements sanguins ont été réalisés sur chacun.

2.3. Caractéristiques de la cohorte

Dans la cohorte finale de 35 chiens, 26 femelles et 9 mâles, issus des deux élevages cités ci-dessus, nous avons :

- Issus de l'élevage du Logis de Sainte-Macrine : 22 chiens, 7 mâles et 15 femelles.
- Issus de l'élevage de la Vallée de l'Hyrome : 13 chiens, 2 mâles et 11 femelles.

Parmi eux, treize chiens ont été placés au cours des deux ans de prélèvement : trois chiens de la Vallée de l'Hyrome et dix chiens du Logis de Sainte-Macrine.

Vingt-et-un chiens sont décédés au 29/08/2023, dont **huit** ayant développé un **sarcome histiocytaire** confirmé par analyse histologique et immunohistochimique.

2.4. Méthodes expérimentales : manipulations réalisées au sein du laboratoire de l'IGDR

Toutes les manipulations nécessaires à notre étude ont pu être réalisées dans les laboratoires de l'Institut Génétique et Développement de Rennes (IGDR), excepté les premières amplifications par ddPCR qui ont été réalisées au neurocentre Magendie de Bordeaux. Par la suite, l'équipe de l'IGDR a pu utiliser l'automate du laboratoire de l'INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale), adjacent à celui du CNRS, pour ces expérimentations.

2.4.1. Extraction de l'ADN

La première étape dans notre travail était d'extraire l'ADN des différents prélèvements : les biopsies de tumeurs (sur animal autopsié ou vivant), les échantillons plasmatiques, et les sangs totaux (ou les sangs déplétés en plasma, c'est-à-dire les culots cellulaires sanguins conservés après centrifugation).

2.4.1.1. Extraction de l'ADN des tissus tumoraux

Toutes les biopsies des tissus tumoraux sur les chiens de notre cohorte ont été analysées : l'ADN a été extrait et les mutations du gène *PTPN11* des 2 principaux hotspots ont été recherchées. Lorsqu'un sarcome histiocytaire (SH) était confirmé à l'analyse histologique mais qu'aucune mutation des deux hotspots n'avait été retrouvé dans l'ADN de l'échantillon tumoral correspondant, l'analyse a été reproduite en recherchant cette fois d'autres mutations de *PTPN11*, moins fréquentes (Tableau IX). Les biopsies réalisées sur des organes non tumoraux, à l'autopsie des individus, n'ont pas été analysées.

Tableau IX : Mutations du gène *PTPN11* recherchées par ddPCR. Source : Benoit Hédan, Annexe 5.

Les mutations en gras (503G/V et 76 E/K) sont les deux hotspots mutationnels majoritairement rencontrés dans les SH des Bouviers Bernois, et donc les deux mutations recherchées en premier lieu dans chaque échantillon tumoral et plasmatique. ddPCR : droplet digital Polymerase Chain reaction ; UCSC : University of California Santa Cruz ; chr : chromosome.

Position du nucléotide (référence pour la ddPCR, CanFam3)	Position du nucléotide standardisée (CanFam6 selon l'Institut Génomique de l'UCSC [234])	Position des acides aminés substitués	Noms complets des acides aminés substitués	Abréviations des acides aminés substitués
G : chr26: 10,052,797 G/T	10171005	503G/V	Glycine/valine	Gly/Val
A : chr26: 10,014,656 A/G	10133095	76 E/G	Glutamic acid/Glycine	Glu/Gly
G : chr26: 10,014,655 G/A	10133094	76 E/K	Glutamic acid/Lysine	Glu/Lys
G : chr26: 10,014,643 G/C	10133082	72 A/P	Alanine/Proline	Ala/Pro
G : chr26: 10,014,634 G/A	10133073	69E/K	Glutamic acid/Lysine	Glu/Lys
G : chr26: 10,014,608 G/T	10133047	60G/V	Glycine/valine	Gly/Val

Pour extraire l'ADN des prélèvements tumoraux, nous avons utilisé le kit NucleoSpin® Tissue du laboratoire MACHEREY-NAGEL, dont le protocole est exposé dans le [Tableau X](#). Le protocole commercial du kit, en anglais, est présent en [Annexe 8](#).

Tableau X : Description et explication des étapes du protocole d'extraction d'ADN tissulaire avec le kit NucleoSpin® Tissue du laboratoire MACHEREY-NAGEL [235], [236]

ETAPES	PROTOCOLE		EXPLICATION
1 Préparation de l'échantillon	Après décongélation, découper environ 25mg de tissu en petits morceaux.		
2 Pré-lyse de l'échantillon		Ajouter 180 µL de tampon B1 et 25 µL de solution de protéinase K. Homogénéiser au vortex. Incuber à 56°C pendant au moins 1-3h voire toute la nuit.	Digestion du tissu et des protéines, séparation des cellules par une solution détergente et la protéinase K.
3 Lyse des échantillons		Après passage au vortex, ajouter 200 µL de tampon B3 et ré-homogénéiser vigoureusement au vortex. Incuber à 70°C pendant 10 min. Vortexer brièvement.	Destruction des membranes biologiques restantes par un nouveau détergent.
4 Précipitation de l'ADN		Ajout de 210 µL d'éthanol absolu (96-100%) et vortexer vigoureusement.	On peut voir une « méduse » (filaments) d'ADN se former dans le tube, c'est l'ADN précipité.
5 Filtration de l'ADN		On transfère le contenu de chaque tube dans une colonne avec membrane de silice, placée dans un tube collecteur. On centrifuge 1 min à 11 000 g.	On utilise la grande affinité des acides nucléiques pour la silice : l'échantillon est donc passé sur une membrane poreuse de silice qui fixe l'ADN (chromatographie d'affinité).
6 Lavage de la membrane de silice		Ajouter 500 µL de tampon BW. Centrifuger 1 min à 11 000 g. Jeter le contenu du tube collecteur puis le replacer sous la colonne.	Les deux lavages successifs permettent d'éliminer les contaminants résiduels de l'ADN.
		Ajouter 600 µL de tampon B5 dans la colonne et centrifuger de nouveau pendant 1 min à 11 000 g. Jeter le contenu du tube collecteur puis le replacer sous la colonne.	
7 Séchage de la membrane de silice.		Centrifuger 1 min à 11 000 g.	L'éthanol résiduel est éliminé pendant cette étape.
8 Éluion de l'ADN		Après avoir placé les colonnes dans des tubes à micro-centrifugeuse, ajouter 50 µL de tampon d'éluion BE. Laisser incuber 3 min à température ambiante puis centrifuger 1 min à 11 000 g. Renouveler l'étape.	L'ADN est re-solubilisé dans un tampon d'éluion ce qui permet de lui faire traverser la membrane de silice et de le récupérer en solution dans les tubes. Cette étape d'éluion est réalisée deux fois afin d'augmenter le rendement d'extraction de l'ADN. Le tampon d'éluion est également réchauffé à 70°C afin d'augmenter le rendement lors des éluions successives.

À l'issue de ce protocole, l'ADN peut être **conservé au réfrigérateur à 4°C** pour être utilisé pendant plus d'un an ou peut être gardé à -20°C pour une conservation à plus long terme [236].

2.4.1.2. Extraction de l'ADN du plasma

Comme expliqué ci-dessus, les prélèvements de sang réalisés tous les trois mois sur les Bouviers Bernois de notre cohorte étaient immédiatement centrifugés afin de récupérer le plasma dans des tubes secs distincts. Ces **échantillons plasmatiques** ont ensuite été **enregistrés et stockés** dans la biobanque **CaniDNA** de l'IGDR. En cas de prélèvements **tumoraux** présentant une **mutation de *PTPN11***, les échantillons plasmatiques du chien concerné ont été déstockés de la biobanque afin d'en extraire l'ADN. De plus, l'ensemble des derniers prélèvements réalisés sur chaque chien ont également été analysés pour les mutations de *PTPN11*, ces échantillons ont donc dû subir également une extraction d'ADN.

Pour extraire l'ADN des prélèvements plasmatiques, nous avons utilisé le kit NucleoSnap® cfDNA du laboratoire MACHEREY-NAGEL, dont le protocole est exposé dans le **Tableau XI**. Le protocole commercial du kit, en anglais, est présent en **Annexe 9**. Ce protocole nécessite un système d'aspiration, illustré dans la **Figure 52**.

Tableau XI : Description et explication des étapes du protocole d'extraction d'ADN avec le kit NucleoSnap® cfDNA du laboratoire MACHEREY-NAGEL [236], [237]

ETAPES	PROTOCOLE		EXPLICATION
1 Préparation de l'échantillon	Après décongélation, mesurer la quantité de plasma dans chaque tube et compléter les tous au même volume, choisi dans le tableau ci-dessous, avec du tampon PBS.		
	Volume complété de l'échantillon (mL)	Protéinase K (µL)	Tampon VL (mL)
	1	15	1
	2	30	2
	3	45	3
	4	60	4
5	75	5	
2 Lyse de l'échantillon		Ajouter le volume correspondant de protéinase K, selon le tableau ci-dessus. Homogénéiser au vortex. Incuber 5 min à température ambiante puis ajouter le volume correspondant de tampon VL. Homogénéiser au vortex pendant 20 secondes. Incuber à 56°C pendant 5 min à 1h.	Digestion des protéines, séparation des constituants de l'ADN circulant (protéines et acides nucléiques) par une solution détergente et la protéinase K.
3 Préparation pour passage sur colonne		Ajouter le volume correspondant d'éthanol (96-100%), selon le tableau ci-dessus. Homogénéiser au vortex pendant 10 secondes.	L'éthanol sert ici de tampon de lavage.
4 Fixation de l'ADN sur la colonne		Fixer une colonne NucleoSnap DNA Plasma du kit sur le système d'aspiration . Déposer 500µl de tampon CC sur la colonne. Appliquer l'aspiration (approximativement à 0,4-0,6 bars) jusqu'à ce que tout le tampon soit passé sur la colonne. Déposer le lysat sur la colonne. Attendre que tout le lysat soit passé sur la colonne. Fermer l'aspiration.	Le tampon CC permet de polariser la membrane de la colonne positivement, pour retenir l'ADN chargé négativement. L'aspiration sous-vide permet de faire passer le lysat tandis que l'ADN reste fixé sur la membrane de silice.

5	Lavage de la colonne		Ajouter 1 mL de tampon VW1 sur la colonne. Appliquer l'aspiration (approximativement à 0,4-0,6 bars) jusqu'à ce que tout le tampon soit passé sur la colonne. Ajouter 500 µL de tampon WB sur la colonne. Attendre que tout le tampon soit passé. Fermer l'aspiration.	Les deux lavages successifs permettent d'éliminer les contaminants résiduels de l'ADN.
6	Séchage de la membrane de silice		Détacher la partie supérieure de la colonne et la jeter. Récupérer la colonne et la placer sur un tube de collection de 2 mL. Centrifuger 3 minutes à vitesse maximale. Jeter le tube de collection de 2 mL et placer la colonne sur un tube d'1,5 mL.	
7	Séchage de la membrane de silice.		Centrifuger 1 min à 11 000 g.	L'éthanol résiduel est éliminé pendant cette étape.
8	Élution de l'ADN		Après avoir placé les colonnes dans des tubes à micro-centrifugeuse, ajouter 50 µL de tampon d'élution BE. Laisser incuber 3 min à température ambiante puis centrifuger 1 min à 11 000 g. Renouveler l'étape.	L'ADN est re-solubilisé dans un tampon d'élution ce qui permet de lui faire traverser la membrane de silice et de le récupérer en solution dans les tubes. Cette étape d'élution est réalisée deux fois afin d'augmenter le rendement d'extraction de l'ADN. Le tampon d'élution est également réchauffé à 70°C afin d'augmenter le rendement lors des éluions successives.



Figure 52 : Photographie du système d'aspiration utilisé pour l'extraction d'ADN des échantillons plasmatiques de notre cohorte de Bouviers Bernois. Photographie personnelle réalisée au laboratoire de l'Équipe « Génétique du Chien » de l'IGDR.

À l'issue de ce protocole, l'ADN peut de nouveau être **conservé au réfrigérateur à 4°C** pour être utilisé pendant plus d'un an ou être gardé à -20°C pour une conservation à plus long terme [236].

2.4.1.3. Extraction de l'ADN du sang total ou du sang déplété en plasma

Lors de la centrifugation des prises de sang réalisées sur le terrain, nous avons **conservé les culots sanguins déplétés en plasma** dans les tubes EDTA, afin de poursuivre notre recherche des mutations de *PTPN11* également dans le sang. De plus, les vétérinaires traitant réalisant des prises de sang sur les chiens placés chez des particuliers envoyaient parfois les **tubes EDTA sans les avoir centrifugés**. L'ADN plasmatique circulant étant de courte durée de vie dans le sang non centrifugé, les analyses ont alors été effectuées par défaut sur les **échantillons de sang total**, bien que par la suite ces résultats n'aient pu être exploités.

Ainsi, nous avons également besoin d'un protocole d'extraction de l'ADN à partir du sang. Ce protocole, rédigé par l'équipe du CRB (Centre de Ressources Biologiques) Cani-DNA, se réalise en **deux jours** en raison d'un temps de lyse sur une nuit complète (Tableau XII).

De la même façon que pour les extractions d'ADN précédemment décrites, les **échantillons d'ADN** ainsi obtenus peuvent être **stockés provisoirement à 4°C**.

Tableau XII : Protocole d'extraction manuelle d'ADN à partir du sang. Source : CRB Cani-DNA.

JOUR 1 : PRÉPARATION DE LA LYSE SUR LA NUIT				
ETAPES		PROTOCOLE		EXPLICATION
1	Préparation la protéinase K	Mettre en suspension la protéinase K dans 5,750 mL de solution PB.		
2	Préparation des échantillons		Vortexer les tubes de sang pendant au moins 10 secondes.	Homogénéisation du sang.
3	Préparation des tubes pour la lyse		Transférer 1,5 mL de sang dans les tubes à hémolyse numérotés.	NB : si le volume de sang disponible est insuffisant, compléter avec du PBS (<i>Phosphate-Buffered Saline</i> : tampon phosphate salin) jusqu'à la quantité souhaitée de 1,5 mL.
4	Ajout des tampons et de l'enzyme de lyse		Ajouter 750 µL de tampon PBS. Ajouter 260 µL de protéinase K. Ajouter 750 µL de tampon BQ1. Vortexer chaque tube au moins 10 secondes.	Préparation du mix de lyse et homogénéisation des tubes. 
5	Lyse sur la nuit		Mettre les tubes sur l'agitateur rotatif à vitesse 8, pour la nuit.	Une nuit complète est nécessaire pour s'assurer de la lyse des cellules sanguines.
JOUR 2 : EXTRACTION DE L'ADN				
ETAPES		PROTOCOLE		EXPLICATION
1	Préparation pour passage sur colonne		Ajouter 4 mL du tampon 1 dans les tubes à hémolyse contenant le lysat. Vortexer. 	Le tampon est le premier tampon de lavage.
2	Fixation de l'ADN sur la colonne		Déposer la moitié du lysat sur la colonne (série A). Centrifuger 3 minutes. Verser la seconde moitié du lysat sur la colonne et centrifuger 5 minutes. Transférer les colonnes sur les tubes Falcon série B.	Fixation de l'ADN sur la membrane de silice de la colonne en deux étapes pour ne pas surcharger la membrane. Nettoyer le bord des tubes pour éviter les contaminations sur le portoir. Les tubes de la série A, contenant les débris cellulaires et protéines, peuvent être jetés après transfert des colonnes dans les tubes de la série B.
3	Lavages successifs de la colonne		Ajouter 2 mL de tampon 2 puis centrifuger 2 minutes. Ajouter 2 mL du tampon BQ2 puis centrifuger 2 minutes.	Les deux lavages successifs permettent d'éliminer les contaminants résiduels de l'ADN.
4	Rinçage de la colonne		Ajouter 2 mL d'éthanol puis centrifuger 5 minutes.	Purification de l'ADN fixé sur la membrane de silice.
5	Élution(s) de l'ADN		Transférer les colonnes sur les tubes Falcon de la série C. Déposer sur le centre de la colonne 200 µL de tampon d'élution BE. Attendre 10 minutes puis centrifuger 2 minutes.	Le tampon d'élution BE doit être préalablement chauffé à 70°C afin d'augmenter le rendement de l'élution. Afin d'obtenir une quantité d'ADN maximale, éluer une 2^{ème} fois avec 100 µL de tampon BE puis centrifuger 2 minutes.

2.4.2. Amplification par ddPCR

L'objectif de notre étude expérimentale est d'être capable de détecter des **mutations connues, mais présentes à très faible fréquence**, dans l'**ADN tumoral circulant** (ctDNA : *circulating tumor DNA*), lui-même **dilué** dans l'ADN libre, issu de toute cellule de l'organisme, circulant dans le plasma (cfDNA : *cell-free DNA*). L'enjeu est donc d'utiliser une **technique suffisamment sensible** pour détecter ces mutations en faible quantité, mais aussi de **pouvoir les quantifier de manière absolue** afin d'écarter les possibles faux positifs et d'avoir une estimation vraie de la quantité d'ADN tumoral circulant. Ainsi, la PCR (*Polymerase Chain Reaction* : réaction de polymérisation en chaîne) semble être une technique assez sensible ; en revanche la **ddPCR** (*droplet digital PCR* : PCR digitale en gouttelettes), ayant déjà l'avantage d'avoir une très grande sensibilité, permet également de quantifier avec précision le nombre de mutants dans un échantillon d'ADN analysé.

2.4.2.1. Principe de la PCR

Étant donné la faible quantité de matériel génétique présent dans une cellule, des techniques d'amplification moléculaire sont nécessaires pour l'étude des gènes. La technique la plus utilisée est la PCR ; elle permet de multiplier de façon exponentielle une séquence d'ADN, *in vitro*, par une réaction enzymatique cyclique. Elle nécessite l'utilisation d'amorces (séquences d'une vingtaine de nucléotides, capable de s'hybrider de façon spécifique à chacune des extrémités des brins d'ADN à répliquer), d'une enzyme thermostable, la Taq polymérase, et de nucléotides. Un cycle d'amplification de PCR se déroule en trois étapes (Figure 53) [236] :

- La **dénaturation** : à une température de 94°C, les deux brins d'ADN sont séparés. Ces brins vont servir de matrice pour l'amplification par la Taq polymérase.
- **L'hybridation** : un refroidissement entre 40 et 65°C permet la fixation des amorces sur les brins matrices par complémentarité.
- **L'élongation** : généralement à 72°C, la Taq polymérase ajoute des nucléotides par complémentarité du brin matrice, à partir de l'extrémité 3' de l'amorce.

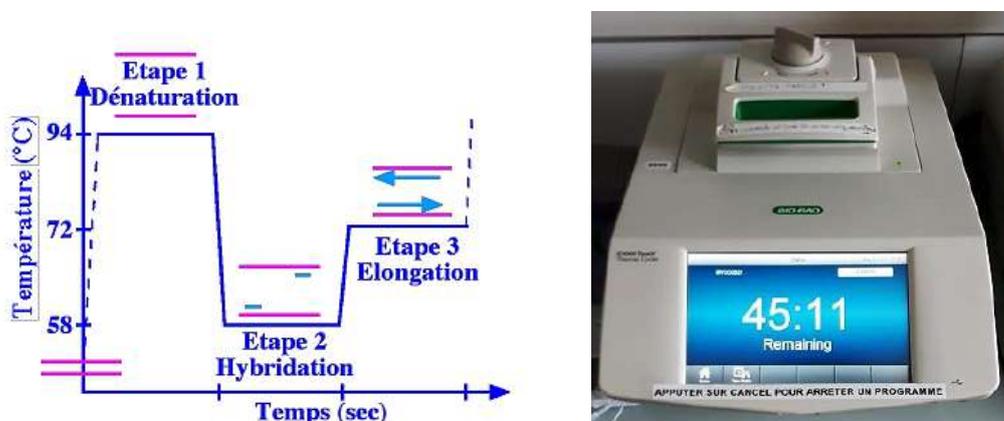


Figure 53 : Etapes d'un cycle d'amplification de PCR (à gauche [238]), pouvant se réaliser dans un thermocycleur Biorad (à droite, photographie personnelle).

Les cycles se répètent ensuite à l'identique, les amplicons du cycle précédent servant, à leur tour, de matrice.

En pratique, on ajoute à chaque échantillon d'ADN un mix constitué de désoxynucléotides libres, d'amorces et d'enzyme. Les échantillons sont ensuite placés dans un thermocycleur, programmé pour répéter le cycle d'amplification avec les différents paliers de température, afin de produire entre 20 et 40 cycles d'amplification. On obtient ainsi une quantité importante d'ADN [236].

2.4.2.2. *Choix de la méthode de ddPCR pour la détection des mutations du gène PTPN11 pour notre étude*

La ddPCR (*droplet digital PCR* : PCR digitale en gouttelettes) est une technique de PCR pouvant être incluse dans les techniques de séquençage nouvelle génération. Cette méthode est commercialisée par la société **Biorad**. Elle fonctionne en **trois étapes principales** :

- **1^{ère} étape : fractionnement de l'échantillon d'ADN**, permettant de le distribuer dans environ **20 000 gouttelettes lipidiques**, de taille et de volume identiques, formées grâce à une émulsion eau-huile [238], [239]. Cela est réalisé grâce à l'outil générateur de gouttelettes : *QX200™ Droplet Generator* (Biorad) (Figure 54).

En pratique, on transvase 20 µL de mix de ddPCR (cf. ci-dessous) et 70 µL d'huile à émulsion dans chaque puits correspondant sur la barrette destinée à être mise dans le générateur de gouttelettes (barrette à trois lignes, une pour le mix, une pour l'huile, et une pour l'émulsion qui est créée par l'instrument). L'émulsion se fait en 2,5 minutes environ.

- **2^{ème} étape : amplification par PCR** : elle est réalisée individuellement dans chaque gouttelette, grâce à un thermocycleur classique (Figure 54). L'amplification s'effectue avec des primers (ou amorces) spécifiques et avec des **sondes TaqMan**, très spécifiques, permettant la quantification ultérieure à la PCR. Les sondes TaqMan sont faites d'un fluorochrome à leur première extrémité (le « *Reporter* »), et d'un « *Quencher* » à l'autre extrémité, qui inhibe la fluorescence du fluorochrome. Ces sondes sont complémentaires d'une portion interne du produit d'amplification (entre les amorces). Elles vont donc se fixer sur l'amplicon pendant la dénaturation. Pendant l'élongation, la Taq polymérase va « buter » sur cette sonde qui empêche la poursuite de la synthèse d'ADN : la sonde est alors dégradée, ce qui libère une molécule fluorescente, le « *Reporter* » [236], libre, mais restant alors dans la gouttelette lipidique. Dans le cas de la ddPCR, les sondes TaqMan utilisées sont les sondes **FAM pour les séquences mutantes (Mut)** et **HEX pour les séquences dites sauvages (Wild-Type : WT)** ; ces deux sondes produisent une **fluorescence différente** [238], [239].

En pratique, 40 µL d'émulsion lipidique obtenue à l'étape précédente est transvasée dans chaque puits ; puis la plaque de ddPCR est placée dans le thermocycleur. La PCR dure environ deux heures, selon les étapes décrites dans le **Tableau XIII**.

Tableau XIII : Étapes réalisées par le thermocycleur pour le protocole de PCR utilisée dans la technique de ddPCR. D’après Bianchi, 2023.

Hold : en attente de l'utilisateur, pour la récupération de la plaque de ddPCR dans le thermocycleur et sa lecture. [238]

Étape	Température	Temps	Rampe de T°C	Nombre de cycles
Activation de l'enzyme	95	10 minutes	~2°C/sec	1
Dénaturation	94	30 secondes		40
Annealing/Extension	58	1 minute		1
Désactivation de l'enzyme	98	10 minutes		1
Hold (optional)	12	Infini	~1°C/sec	1

- **3^{ème} étape : lecture numérique de la fluorescence dans chaque gouttelette lipidique** : après réalisation de la PCR, la plaque est retirée du thermocycleur et placée dans le lecteur de gouttelettes *QX200™ Droplet Reader* (Biorad) (Figure 54). Les gouttelettes positives et négatives pour chacune des fluorescences sont ainsi comptées. La connaissance de la fraction de **gouttelettes positives et négatives** pour chacune des fluorescences, permet d’avoir une **quantification absolue**, grâce à la **loi de Poisson**, du **nombre de copies WT ou Mut** présentes **dans l'échantillon d'origine** avant la répartition en gouttelettes. La fraction de gouttelettes positives nous permet ensuite d’obtenir le pourcentage de mutations présent dans l’ADN circulant du plasma [238], [239]. Les résultats sont transmis grâce au **logiciel QX Manager 1.2 Standard Edition** sur ordinateur. Des graphiques sous forme de **nuages de points** ainsi que des données chiffrées sont disponibles.



Figure 54 : Instruments de la société Biorad nécessaires pour la réalisation de la ddPCR. Photographies personnelles.

À gauche : générateur de gouttelettes : QX200™ Droplet Generator ; au milieu : thermocycleur utilisée dans la salle dédiée à la ddPCR ; à droite : lecteur de gouttelettes QX200™ Droplet Reader.

Cette approche permet **d'identifier et de quantifier une mutation ciblée** (généralement un *hotspot* mutationnel, comme c'est le cas dans la plupart de nos ddPCR avec les mutations E76K et G503V) et **d'améliorer nettement la sensibilité de la PCR**. En effet, le seuil de détection de cette méthode, et donc sa sensibilité, est de **l'ordre de 0,1%** [238], [239]. Les trois étapes de la ddPCR décrites ci-dessus sont résumées dans la figure ci-dessous (Figure 55) [240].

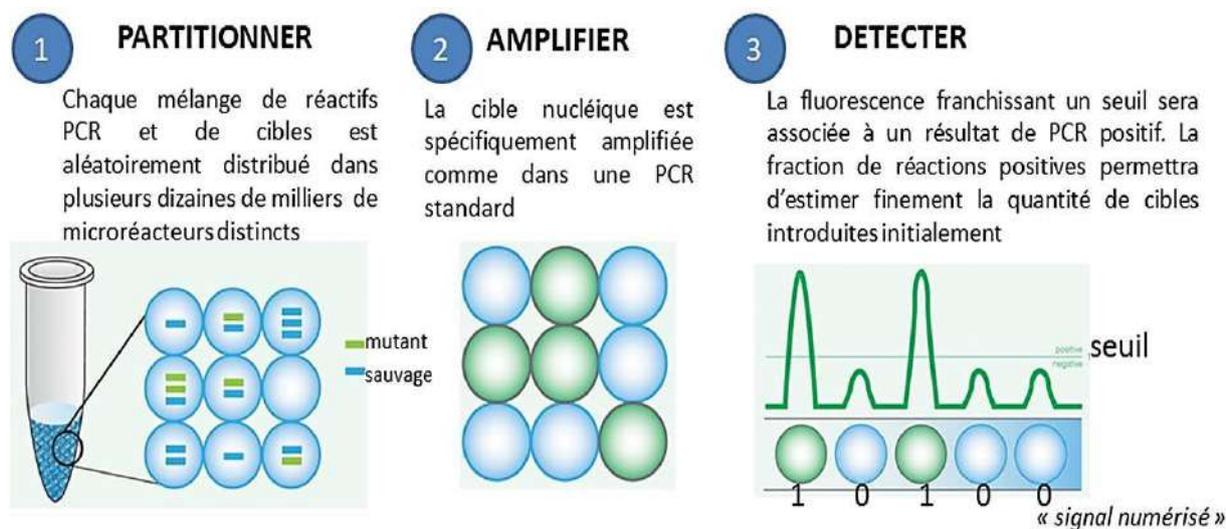


Figure 55 : Principe général de la ddPCR (droplet digital PCR) : trois étapes.
D'après Audebert, 2014. [242]

En pratique, pour la réalisation des ces trois différentes étapes, il faut **préparer au préalable le « mix »** à utiliser pour la ddPCR. Les plaques de PCR utilisées en ddPCR sont des plaques spécifiques, avec 96 puits, où **chaque puits** a une **contenance de 20 µL**. Pour détecter une mutation, le mix théorique à préparer serait celui exposé dans le [Tableau XIV](#).

Tableau XIV : Composition du MIX pour un puits, en vue de la réalisation d'une ddPCR.
D'après Bianchi, 2023.

Buffer : solution tampon ; primers : amorces. [238]

	x1
Buffer	10µl
Primers RF (18µM)	1µl
Sonde WT (10µM)	0,5µl
Sonde MUT (10µM)	0,5µl
H2O	7µl
ADN	1µl
<u>Total</u>	<u>20µl</u>

Lors de la réalisation de nos mix de ddPCR, nous avons pris en compte les potentielles pertes de matière incluses dans les nombreuses manipulations nécessaires à la réalisation des trois étapes de ddPCR. Pour cela, nous avons toujours préparé un mix comprenant **21 µL par puits**, soit **1 µL de marge** (de l'eau a été utilisée pour cette marge). De plus, il était nécessaire d'avoir une **concentration de sonde de 900 nM** (nanomolaires) par puits **afin de détecter une fluorescence**, soit 0,9 µM. Dans un volume théorique de 20 µL, cela fait donc une **quantité de sonde nécessaire de 18 µm** (micromoles). Afin de pouvoir réaliser une ddPCR en **multiplex**, c'est-à-dire avec deux sondes mutantes différentes,

correspondantes aux deux hotspots mutationnels (mutation E76K : sonde 655 ; mutation G503V : sonde 797), il était nécessaire de distinguer les deux sondes mutantes en leur conférant une intensité de fluorescence différente. Ainsi, une sonde était mise à une concentration de 0,9 μM , soit une quantité de 18 μm par puits ; tandis que la deuxième sonde était ajoutée au mix avec une concentration de 1,8 μM , soit une **quantité de 36 μm par puits**. Ainsi, la seconde sonde pouvait être distinguée de la première par une **fluorescence d'intensité double** (Tableau XV).

Tableau XV : Composition du mix de ddPCR pour un puits, en vue de la réalisation d'une ddPCR sur de l'ADN plasmatique, pour la détection des deux hotspots mutationnels du gène *PTPN11* (E76K ou 655 et G503V ou 797). Réalisation : Benoit Hédan.

Buffer : solution tampon ; primers : amorces ; F : Forward ; R : Reverse ; mut : séquence mutante ; WT : séquence sauvage (Wild Type).

<i>PTPN11_655_797</i>	Pour un puits (en μL)
buffer	10
primers 1439F (100 μM)	0,18
primers 1439R (100 μM)	0,18
sondes WT 655 E76 (10 μM)	0,5
sonde mut 655 76K (10 μM)	0,5
primers 1442F (100 μM)	0,36
primers 1442R (100 μM)	0,36
sonde WT 797 G503 (100 μM)	0,1
sondes mut 797 503V (100 μM)	0,1
ADN plasmatique	8,72
TOTAL	21

Dans nos expériences, nous avons choisi la sonde **FAM pour coder les séquences mutantes** (lecture sur l'axe des **ordonnées** du graphique fourni par le logiciel QX Manager) et la sonde **HEX pour coder les séquences sauvages** (lecture sur l'axe des **abscisses**).

2.4.3. Autre méthode possible pour la détection des mutations du gène *PTPN11* : le séquençage de Sanger

La méthode de séquençage de Sanger a été une évolution clé dans l'histoire du séquençage et est aujourd'hui utilisée couramment. Elle permet de **séquencer jusqu'à 1000 paires de base**. Auparavant réalisée avec un gel d'électrophorèse, les séquenceurs actuels utilisent des **capillaires** (évite les risques de déviation des ADN dans le gel). Le principe est de **néo-synthétiser des brins complémentaires** à des matrices d'ADN simple brin. Les brins obtenus sont de toute taille, et la base qui termine chaque brin est identifiée. Pour cela, des **didésoxynucléotides** (ddNTP), nucléotides libres bloquant l'élongation lors de leur incorporation dans le brin d'ADN, sont utilisés. Des **fluorochromes sont fixés sur ces ddNTP**, un par type de ddNTP, soit **quatre fluorescences différentes pour les bases azotées** A (Adénine) T (Tyrosine) C (Cytosine) et G (Guanine) [236]. Une fluorescence va être émise lors de l'excitation du fluorochrome par le laser du séquenceur.

Les étapes pratiques sont les suivantes :

- Ajout de **formamide** dans les échantillons d'ADN (dénature l'ADN en formant 2 simples brins par rupture des liaisons hydrogène liant les bases nucléiques) et du mix **Big Dye Terminator®**, contenant les ddNTP marqués par les fluorochromes ;
- **Dépôt de 10 µL dans chaque puits** de la plaque de séquençage (96 puits en tout) ;
- **Injection de gel** de polymères dans les capillaires ;
- **Électrophorèse** : migration de l'ADN dans les capillaires (l'anode trempe dans les puits, la cathode est à l'extrémité opposée des capillaires) (Figure 56, Figure 57) ;
- **Excitation des fluorochromes par un laser** : le spectre de fluorescence réémise est spécifique de chaque ddNTP ;
- Le logiciel associé au séquenceur **enregistre** ensuite ces pics de fluorescence, et après utilisation d'un **algorithme** qui évalue la probabilité que tel pic corresponde à l'emplacement de tel nucléotide, une **séquence propre est obtenue**.

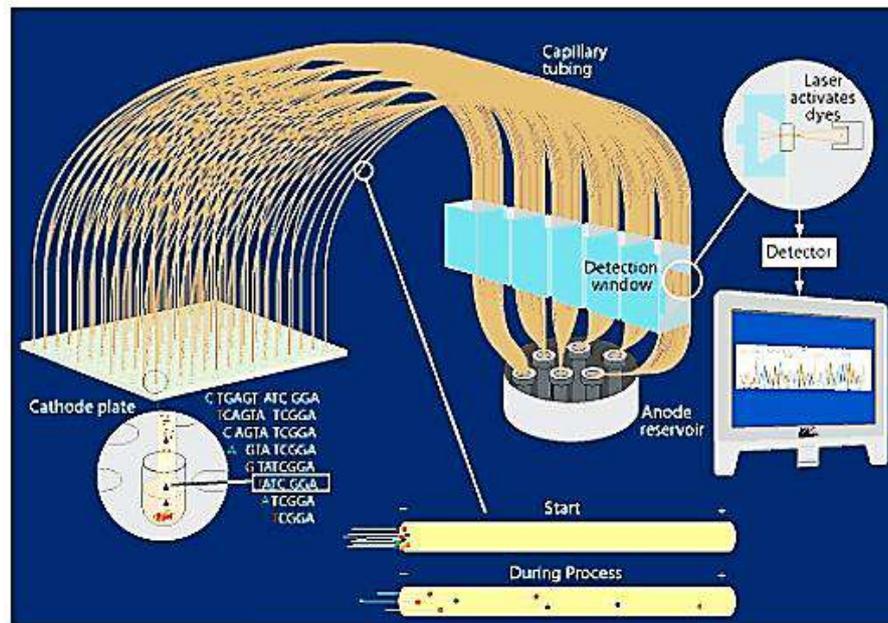


Figure 56 : Schéma d'une électrophorèse dans des capillaires lors d'un séquençage par la technique de Sanger. [238]

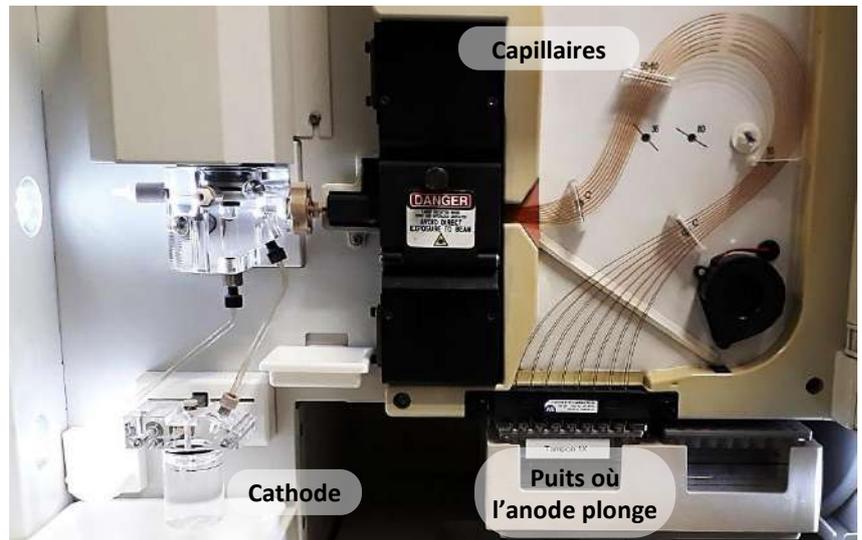


Figure 57 : Séquenceur de Sanger de l'IGDR : fermé à gauche, ouvert à droite. Photographies personnelles.

Le résultat obtenu est un **électrophorégramme**, c'est-à-dire un graphique avec une courbe par couleur de fluorescence (donc une courbe par nucléotide). Chaque pic de fluorescence sur une courbe correspond à un nucléotide détecté dans le fragment d'ADN séquencé (Figure 58).

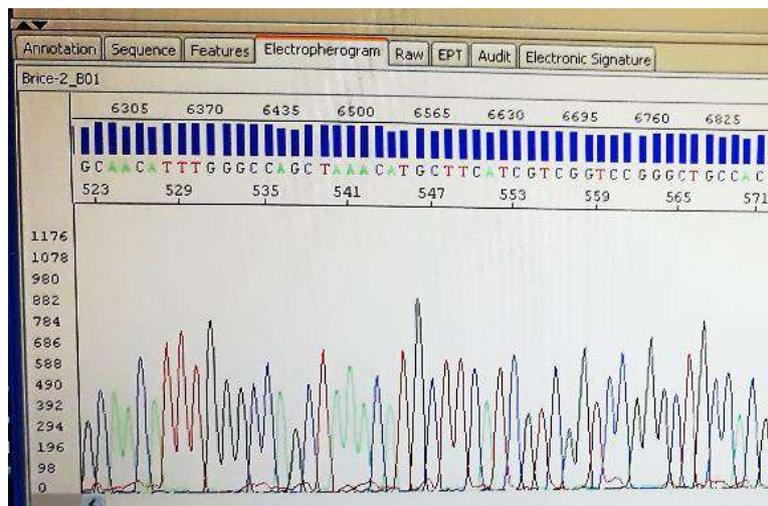


Figure 58 : Exemple d'électrophorégramme obtenu sur logiciel après séquençage d'ADN par la technique de Sanger. Photographie personnelle.

Cette méthode a été **utilisée au tout début de cette étude expérimentale**, dans un premier temps pour comparer la sensibilité de détection et/ou confirmer la détection des mutations du gène *PTPN11*. Les premiers résultats ont montré un seuil de détection de la technique de Sanger plus haut que la méthode de ddPCR. Le séquençage de Sanger étant **beaucoup moins sensible**, cette technique a été **abandonnée au profit de la ddPCR**.

2.4.4. Rédaction d'un questionnaire à destination des propriétaires de Bouviers Bernois, afin d'évaluer leur intérêt potentiel pour le test de diagnostic précoce en étude

Dans l'objectif d'estimer l'intérêt que pourraient porter les propriétaires de Bouviers Bernois, particuliers, ou éleveurs, à un test de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire tel que celui que nous cherchons à mettre en point, nous avons construit un questionnaire visant à :

- Déterminer l'âge et la catégorie socio-professionnelle des personnes répondant au questionnaire, afin d'estimer la représentativité de l'échantillon obtenu par diffusion du questionnaire ;
- Prendre connaissance des expériences antérieures des propriétaires concernant la race des Bouviers Bernois et leur prédisposition aux cancers, notamment le sarcome histiocytaire ;
- Évaluer l'importance de la médicalisation des Bouviers Bernois de la part des propriétaires en possédant et répondant au questionnaire ;
- Savoir si le test de diagnostic précoce, s'il est mis sur le marché, serait utilisé par les propriétaires de Bouviers Bernois ;
- Le cas échéant, connaître quel coût les propriétaires seraient prêts à investir dans ce test, l'âge de leur chien à partir duquel ils seraient motivés à le tester, et enfin la fréquence à laquelle le test souhaiterait être réalisé ;
- En cas de diagnostic précoce positif (*i.e.* présentant une mutation de *PTPN11* avant apparition de signes cliniques), connaître la motivation des propriétaires à réaliser des examens complémentaires, et si oui, lesquels et à quelle fréquence ils souhaiteraient les renouveler.

Le questionnaire est détaillé en [Annexe 10](#).

3. Résultats de l'étude expérimentale

3.1. Caractéristiques descriptives de notre cohorte

Les principales caractéristiques descriptives de notre cohorte sont rassemblées dans le [Tableau XVI](#) Tableau XVI. Quelques données numériques de notre cohorte sont intéressantes à décrire pour notre étude ou à comparer avec celles de la littérature :

- La moyenne d'âge au **premier prélèvement** était de **7,15 ans** (médiane de 7,06 ans), avec des âges allant de 4,42 à 11,68 ans.
- L'âge moyen au **décès** pour les vingt-et-un chiens concernés est de **9,08 ans**, avec une médiane de 8,77 ans (valeurs allant de 5,52 à 14,31 ans), ce qui est cohérent avec les données retrouvées dans la littérature (*i.e.* entre huit et neuf ans d'âge moyen), et même légèrement supérieur. Cela peut s'expliquer par **l'utilisation assidue de certains tests génétiques** par les deux élevages concernés, ce qui permet d'orienter les accouplements afin de limiter l'incidence de maladies familiales telles que le SH.
- De plus, l'âge moyen au **décès** pour les **chiens ayant développé un SH** est de **7,98 ans**, avec une médiane de 8,07 ans et des valeurs allant de 5,52 à 10,11 ans. Cela est de nouveau supérieur aux données de la littérature (âge médian de 6,3 ans dans l'étude d'Erich *et al.* en 2013 [132]). Cette valeur supérieure dans notre cohorte peut être due au faible nombre d'individus ; et également à la sélection en reproduction pratiquée par les élevages, ce qui limite l'incidence du SH.
- Enfin, il est intéressant de souligner que **l'âge moyen au décès survient deux ans plus tôt chez les chiens diagnostiqués d'un SH** (7,98 ans) par rapport aux chiens décédés sans SH (9,75 ans). Malheureusement, le manque de données cliniques concernant le décès de certains chiens ainsi que l'absence d'autopsie systématique en cas de cause de décès identifiée comme non tumorale, ne permettent pas de connaître l'âge moyen des chiens de notre étude décédés sans tumeur. Par exemple, le chien 19857, a présenté un syndrome vestibulaire, néanmoins aucune autopsie n'a été réalisée, ne permettant pas d'exclure les causes tumorales. Cependant, un parallèle peut tout de même être fait avec l'étude d'Erich *et al.* en 2013, où l'âge médian au décès des Bouviers Bernois sans tumeur était de 9,2 ans tandis qu'il était de 6,3 ans pour ceux décédés de SH [132]. Les écarts de valeurs entre les deux types de population (avec SH et sans SH / sans tumeurs) sont de nouveau cohérents.

Tableau XVI : Caractéristiques de la cohorte d'étude de Bouviers Bernois

ID : identifiant de la biobanque Cani-DNA ; ID en gras = chien issu de l'élevage de la Vallée de l'Hyrome ; ID en italique = chien issu de l'élevage du Logis de Sainte-Macrine ; F = Femelle ; M = Mâle ; O = Oui ; N = Non ; SH : Sarcome Histiocytaire ; les âges sont exprimés en années.

ID cani-DNA	Sexe	Placé ?	Date de naissance	Âge au 1 ^{er} prélèvement	Âge au décès	Nombre de prélèvements	Diagnostic de SH ?
19968	F	O	03/01/2016	5,25	en vie	7	/
19967	F	N	03/01/2013	8,25	8,56	2	O
19966	F	O	18/02/2016	5,12	en vie	6	/
19965	M	N	18/02/2016	5,12	5,52	3	O
19964	F	N	31/10/2016	4,42	en vie	10	/
19963	F	O	17/09/2016	4,54	6,66	11	O
19962	F	O	24/03/2016	5,02	en vie	6	/
19961	F	N	17/10/2015	5,46	6,50	6	N
19960	F	N	06/04/2015	5,99	en vie	9	/
19959	M	N	14/11/2013	7,38	9,18	8	N
19958	F	N	07/04/2014	6,99	8,22	7	N
19957	F	N	01/04/2014	7,01	en vie	10	/
11962	F	N	21/07/2013	7,70	10,11	10	O
<i>18739</i>	M	N	03/11/2012	8,37	9,04	4	N
<i>19856</i>	M	N	07/02/2016	5,10	en vie	10	/
<i>7809</i>	F	N	28/05/2010	10,81	11,73	5	N
<i>19857</i>	M	O	12/11/2013	7,34	9,26	6	N ?
<i>19858</i>	F	N	10/05/2015	5,85	en vie	9	/
<i>18735</i>	F	N	30/12/2012	8,21	9,25	6	O
<i>19859</i>	M	N	16/12/2011	9,25	11,32	8	N
<i>19860</i>	F	N	14/08/2015	5,59	en vie	9	/
<i>19861</i>	F	N	13/01/2014	7,17	en vie	9	/
<i>9659</i>	F	O	28/05/2010	10,81	12,12	7	N
<i>19862</i>	F	N	27/01/2014	7,13	8,52	7	N
<i>19863</i>	F	N	10/05/2015	5,85	7,58	8	O
<i>19864</i>	F	O	25/08/2010	10,56	11,20	2	N
<i>20272</i>	F	N	14/12/2014	6,53	7,42	5	O
<i>19748</i>	M	O	27/01/2014	7,07	8,38	6	N
<i>19762</i>	F	O	03/02/2014	7,06	en vie	4	N
<i>18753</i>	F	O	29/01/2007	11,68	14,31	2	N
<i>19850</i>	F	O	28/03/2012	8,97	en vie	4	/
<i>19851</i>	M	O	23/12/2014	6,23	7,02	4	N
<i>19852</i>	M	O	15/06/2014	6,75	en vie	4	/
<i>18930</i>	F	O	05/10/2012	8,41	en vie	5	/
<i>19781</i>	F	O	13/11/2013	7,32	8,77	3	O
Totaux		15 placés					8 SH

Sur chacun de ces chiens, nous avons **extrait l'ADN et recherché les mutations du gène *PTPN11*** sur les **échantillons tumoraux** le cas échéant ; puis dans le dernier échantillon plasmatique et le dernier échantillon de sang total (ou de sang déplété en plasma, selon le dernier prélèvement réalisé). Dans le cas où une mutation de *PTPN11* était trouvée dans l'échantillon tumoral d'un individu et dans les derniers échantillons plasmatique et sanguin correspondants, les échantillons plasmatiques et sanguins antérieurs étaient à leur tour analysés. Les signes cliniques ainsi que les analyses réalisées sont résumées dans les tableaux ci-dessous (Tableau XVII, Tableau XVIII) par individu.

Tableau XVII : Description des causes de décès, des signes cliniques et inventaire des prélèvements tumoraux, plasmatiques et sanguins analysés, pour les Bouviers Bernois de l'élevage de la vallée de l'Hyrôme. Réalisation personnelle.

SH : Sarcome Histiocytaire ; NFS : Numération Formule Sanguine ; RX : radiographies ; écho : échographie ; RAS : Rien À Signaler ; NL : Nœuds Lymphatiques.

ID cani-DNA	Age au décès (années)	Nombre prises de sang	Cause du décès	Signes cliniques	Prélèvements tumoraux analysés	Nombre d'échantillons analysés	
						Plasma	Sang
19968	en vie	7				1	1
19967	8,56	2	SH disséminé	<p>22/07/2021 : baisse de forme, absences, essoufflement. Examen clinique et RX abdomen : RAS. RX thorax : nodules pulmonaires ou médiastinaux (un crânial, un caudal), visible surtout sur la vue de face; cardiomégalie légère. Biochimie : RAS. NFS : anémie modérée et lymphopénie légère (Ht=33% ; GR=4,59x10⁶/mm³ ; Hb=10g/dL ; Lym=0,8x10³/mm³). Suspicion de SH. Traitement : Fercobsang.</p> <p>26/07/2021 : épisodes de tétanie musculaire, amaurose entre les crises, décubitus, polypnée : métastases cérébrales probables. décision d'euthanasie.</p>	<p>Autopsie : tumeur pulmonaire, adénomégalie trachéo-bronchique, foie et rate alésionnels macroscopiquement, cerveau non exploré. Histologie : NL et poumons infiltrés par le SH.</p>	2	1
19966	en vie	6				1	1
19965	5,52	3	SH disséminé	<p>20/08/2021 : dysorexie, baisse de forme, amaigrissement (perte de 9 kg en 3 mois), muqueuses pâles à jaunâtres. Analyse urinaire : urobilirubinogénurie / bilirubinurie : suspicion piroplasmose. Biochimie : hypopoténémie et hypoAlb; PAL, ALAT et urée sévèrement augmentés. NFS : anémie et thrombopénie sévères (Ht=13%; GR=1,57x10⁶/mm³ ; Hb=4g/dL ; PLT=74x10³/mm³). Echo : suspicion SH ou hémangioscarcome splénique. 23/08/2021 : Transfusion pré-op. Laparotomie exploratrice révélant des métastases hépatiques. Décision d'euthanasie.</p>	<p>Histologie : foie infiltré par le SH, rate alésionnelle.</p>	3	2
19964	en vie	10		<p>08/2023 : masse digitée au niveau du membre pelvien droit. 09/2023 : amputation de deux doigts pour exèrèse du mastocytome.</p>	<p>Cytoponction et histologie de la masse : mastocytome de grade 2.</p>	1	1
19963	6,66	11	SH hémophagocytairaire	<p>16/02/2023 : RX thorax (que profil), écho abdo : hépatomégalie modérée, parenchyme bien homogène. Biochimie : RAS. OVE par flancs : RAS sur organes visibles. 14/05/2023 : épistaxis, consultation d'urgence. Écho abdo : foie et rate hypertrophiés. 15/05/2023 : euthanasie.</p>	<p>Autopsie : foie et rate hypertrophiés. Histologie : foie, rate, poumons, NL infiltrés par des cellules histiocytaires tumorales. SH hémophagocytairaire.</p>	8	1
19962	en vie	6				2	1

			Cause inconnue, hémorragie interne probable	Suspicion clinique de SH	Histologie : hépatopathie vacuolaire probablement cortico-induite ; mésentère : hémosidérine intracellulaire donc hémorragie probable ; poumons : anthracose (surcharge intracellulaire en pigments exogènes) ; rate : légère hyperplasie réactionnelle lymphoïde.		1
19961	6,50	6				1	
19960	en vie	9				1	1
19959	9,18	8	Lymphome ganglionnaire à cellules B	11/2022 : dégradation de l'état général, adénomégalie rétromandibulaire, étendue en 12/2022 aux noeuds lymphatiques parotidiens, pré-scapulaires, poplités et axillaires; mis sous anti-inflammatoires. 01/2023 : oedème du fanon, bien résolu sous furosémide. Examens complémentaires en faveur d'un lymphome multicentrique. 15/01/2023 : dégradation de l'état général, décision d'euthanasie.	Cytoponction et histologie sur les nœuds lymphatiques : cellules rondes, petites et nucléolées en faveur d'un lymphome à cellules B.	2	1
19958	8,22	7	SDTE	Signes cliniques classiques d'un SDTE : détérioration rapide de l'état général et abdomen gonflé.	Autopsie : stase sanguine sévère hépatique et splénique ; compatible avec une torsion de rate. Poumons alésionnels.	1	1
19957	en vie	10		27/12/2022 : hémotochézie, hématomèse, dysorexie, diarrhée : suspicion lymphome intestinal. RX thorax : nodule de 2,5x3 cm sur l'aire de projection du poumon droit caudal, suspicion SH . NFS : neutrophilie avec monocytose et éosinopénie ; biochimie : RAS ; frottis sanguin : lymphocytose. Traitement : anti-hémorragique, corticoïdes, antibiotiques et perfusion, hospitalisation à la maison. 26/01/2022 : absence d'anomalie aux analyses sanguines. 21/02/2022 : abattue mais bon appétit.	Aucun à ce jour	1	1
11962	10,11	10	SH disséminé	05/01/2023 : bonne forme. Biochimie : RAS. 21/07/2023 : toux depuis vaccin toux de chenil le 06/07. RX : masses pulmonaires et médiastinales probablement tumorales. Suspicion SH . Traitement PO : Bronchosed NDV. 03/08/2023 : anorexie, toux progresse. Traitement palliatif : corticoïdes. 29/08/2023 : amélioration clinique de courte durée sous corticoïdes avec inconfort gastrique apparu. Décision d'euthanasie.	Histologie : infiltrats cellulaires de SH dans les poumons, la rate, les nœuds lymphatiques.	3	1

Tableau XVIII : Description des causes de décès, des signes cliniques et inventaire des prélèvements tumoraux, plasmatiques et sanguins analysés, pour les Bouviers Bernois de l'élevage du logis de Sainte-Macrine. Réalisation personnelle.

SH : Sarcome Histiocytaire ; NFS : Numération Formule Sanguine ; RX : radiographies ; IECA : Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine ; SDTE : Syndrome Dilatation et Torsion de l'Estomac ; OG : Œil gauche ; LCCr : Ligament Croisé Crânial ; TPLO : Tibia Plateau Leveling Osteotomy ; CMD : Cardiomyopathie Dilatée ; ATBQ : antibiotiques ; AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens ; NL : Nœuds Lymphatiques.

ID cani-DNA	Age au décès (années)	Nombre prises de sang	Cause du décès	Signes cliniques	Prélèvements tumoraux analysés	Nombre d'échantillons analysés	
						Plasma	Sang
18739	9,04	4	Carcinome pulmonaire	Inconnus	Histologie : confirmation carcinome pulmonaire, les caractéristiques histopathologiques suggèrent une origine hépatique des cellules tumorales.	1	1
19856	en vie	10				4	1
7809	11,73	5	Inconnue	Inconnus	Histologie : lésions spléniques d'hyperplasie complexe et lymphoïde nodulaire ; lésions ganglionnaires réactionnelles dans les NL prélevés.	1	1
19857	9,26	6	Inconnue	Syndrome vestibulaire idiopathique. Décision d'euthanasie.	Aucune autopsie n'a été réalisée, les hypothèses tumorales ne peuvent donc pas être exclues.	2	1
19858	en vie	9				1	1
18735	9,25	6	SH localisés	14/03/2022 : amaurose OG d'apparition brutale évoluant depuis 2 semaines : luxation ventro médiale du cristallin, déformation irienne avec synéchies irido-cornéennes, hyperhémie conjonctivale, effet Tyndall et buphtalmie OG ; 21/03/2022 : énucléation OG.	24/03/2022 : analyse histopathologique : SH en région scléo-cornéenne de l'OG. 31/03/2022 : euthanasie, autopsie et histologie : stéatose hépatique ; lipome (?) au niveau d'une épaule ; poumons alésionnels.	5	4
19859	11,32	8	SDTE	Signes cliniques classiques d'un SDTE.	Aucune autopsie	1	1
19860	en vie	9				1	1
19861	en vie	9				1	1
9659	12,12	7	Lymphome B de haut grade	Déshydratation, suspicion clinique de SH.	Histologie : infiltrats de cellules tumorales (rondes à gros noyaux nucléolés) dans la pulpe blanche splénique et dans les NL ; immunomarquage CD3, CD20, Ki67 en faveur d'un lymphome à cellules B.	1	1

19862	8,52	7	Carcinome pulmonaire acineux	Suspicion clinique de SH pulmonaire	Histologie : infiltrats de cellules tumorales en faveur d'un carcinome pulmonaire acineux à stroma squirreux, sévèrement remanié par nécrose.	1	1
19863	7,58	8	SH disséminé	10/05/2022 : hyperthermie à 40,5°C sans autre signe clinique. NFS : neutrophilie modérée. Biochimie : PAL et ALAT sévèrement augmentés. Suspicion SH , hépatite, infection. Traitements : ATBQ, AINS. 07/12/2022 : dégradation état général, euthanasie.	Autopsie et histologie : le nodule dans la rate, le ganglion et le rein présentent des cellules tumorales en faveur d'un sarcome histiocytaire ; foie alésionnel.	1	1
19864	11,20	2	Dilatation gastrique	Dilatation abdominale, ne se lève plus, vomissements mousseux. Chien trop âgé pour tenter une anesthésie, décision d'euthanasie.	Mastocytome thoracique cutané diagnostiqué et retiré chirurgicalement le 11/08/2021. Aucune autopsie n'a été réalisée.	1	1
20272	7,42	5	SH disséminé	05/04/2022 : polyuro-polydipsie, hypercalcémie aux analyses biochimiques. RX : masse pulmonaire probablement tumorale, suspicion clinique de SH . 14/05/2022 : décision d'euthanasie.	Autopsie et histologie : infiltrats cellulaires de SH dans les poumons et le foie. Hépatopathie vacuolaire modérée probablement corticoinduite.	4	5
19748	8,38	6	Inconnue	Suspicion clinique de SH , aspect tumoral de la rate.	Histologie : splénite réactionnelle avec hyperplasie lymphoïde.	1	1
19762	en vie	4				1	1
18753	14,31	2	Inconnue	Signes cliniques inconnus. Euthanasie.	Aucun prélèvement analysé	1	1
19850	en vie	4		Masse cutanée retirée en 01/2022.	Histologie : sarcome cutané des tissus mous.	1	1
19851	7,02	4	Septicémie	Ingestion d'un corps étranger duodénal ; perforation intestinale suivie d'une septicémie; décès à domicile.	Autopsie : au laboratoire Inovalys de Tours, compte-rendu non reçu.	1	1
19852	en vie	4				1	1
18930	en vie	5				1	1
19781	8,77	3	Hémangio-sarcome splénique et hépatique associé à un SH pulmonaire	2018 : hypothyroïdie diagnostiquée. Traitement mis en place avec suivi de la thyroxinémie tous les 6 mois. 2021 : rupture LCCr, traitée par TPLO. 15/03/2022 : baisse de forme. Absence d'anomalie à l'échographie abdominale et à l'échocardiographie (suspicion CMD). Traitement : IECA par prévention. Suspicion clinique de SH non exclue . 18/08/2022 : apathie soudaine, anémie, polypnée ; bruits cardiaques assourdis, pouls faible ; signe du flot positif. Échographie abdominale : hémobdomen, suspicion de rupture de la rate. Euthanasie.	Autopsie : nodules hépatiques et hémobdomen. Histologie : infiltrats cellulaires tumoraux dans la rate et le foie (hémangiosarcome), et dans les poumons (SH).	2	1

Dans les tableaux ci-dessus, nous pouvons constater la présence de **huit cas de SH confirmés par analyse histopathologique** (cases au fond jaune pâle). Il est intéressant de remarquer dans les colonnes « Signes cliniques » et « Prélèvements tumoraux analysés » que **douze chiens ont été suspectés cliniquement d'un sarcome histiocytaire**. En effet, à partir d'un certain âge, les vétérinaires peuvent être enclins à privilégier l'hypothèse tumorale chez les chiens de race Bouvier Bernois. De plus, les Bouviers Bernois étant **prédisposés** au sarcome histiocytaire, cette tumeur maligne est souvent suspectée en priorité. Ainsi, il y a un risque fréquent de **diagnostic clinique par excès du SH**. Dans certaines études, jusqu'à 37% des lésions viscérales [241] et 71% des lésions cutanées [242] auraient été diagnostiquées à tort comme des lésions de SH. Le test de diagnostic précoce que nous cherchons à mettre au point, par **détection de mutations spécifiques** du sarcome histiocytaire, permettrait **d'éviter de poser un faux diagnostic** pour les chiens développant ces mutations.

Parmi les cas suspectés de sarcome histiocytaire, le chien 19957 de la vallée de l'Hyrôme (**Tableau XVII**) présente une masse d'environ 3 cm de diamètre sur l'aire de projection du poumon droit caudal, d'après les radiographies thoraciques réalisées en décembre 2022. Cette localisation est en faveur d'un sarcome histiocytaire pulmonaire, bien que d'autres hypothèses tumorales, notamment le carcinome pulmonaire, ne peuvent pas être écartées (**Figure 59**).

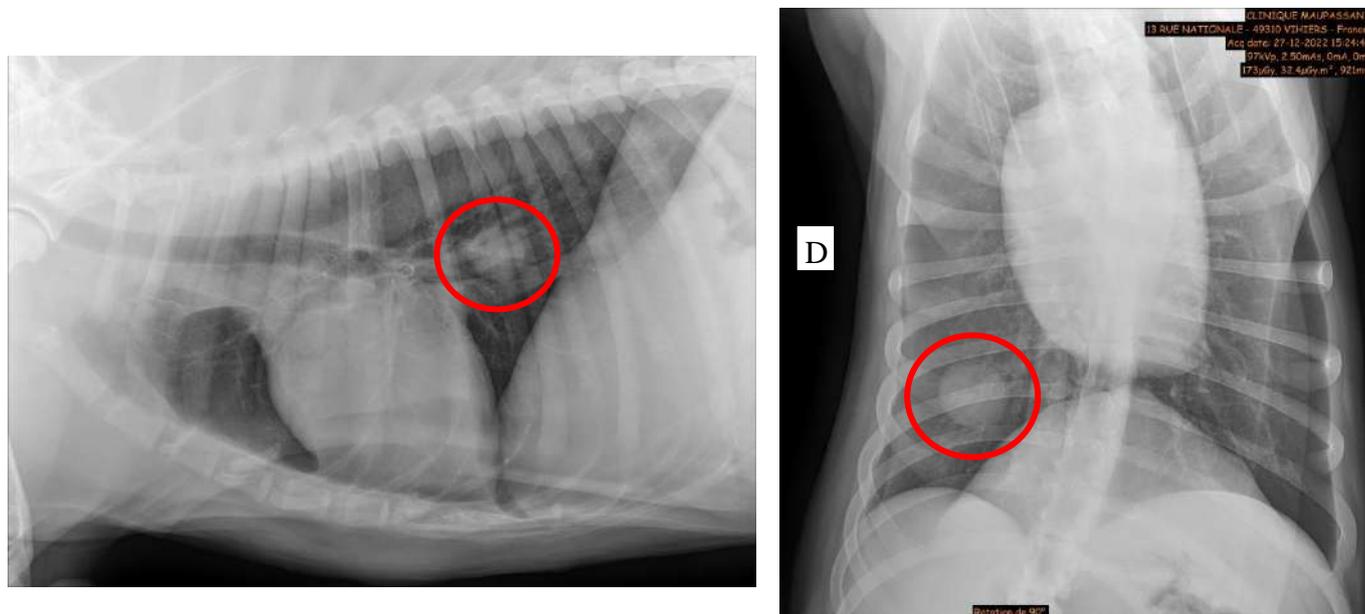


Figure 59 : Radiographies thoraciques (de profil à gauche, de face à droite) du chien 19957 de la vallée de l'Hyrôme, réalisées le 27/12/2022 suite à une suspicion de lymphome intestinale, à la clinique vétérinaire Maupassant à VIHIERS.

*Le nodule sur l'aire de projection du poumon droit caudal est encerclé en **rouge** sur les deux clichés.*

3.2. Analyse des résultats pour les individus décédés et affectés d'un sarcome histiocytaire confirmé par histopathologie

Au terme de notre collecte de prises de sang, **huit Bouviers Bernois sont décédés d'un sarcome histiocytaire (SH)** confirmé par analyse histopathologique. Les prélèvements tumoraux et plasmatiques de ces huit individus ont donc été analysés en ddPCR afin d'y rechercher les mutations du gène *PTPN11*.

3.2.1. Résultats de ddPCR sur les échantillons tumoraux de sarcome histiocytaire

Les huit individus atteints de sarcome histiocytaire, d'abord supposé, ont été **autopsiés**, et tout organe suspecté d'être atteint par une néoplasie, que ce soit en raison de caractéristiques macroscopiques ou épidémiologiques (par exemple, la rate était souvent prélevée car c'est un des organes le plus touché par le SH), ont été échantillonnés. **Chaque prélèvement**, réalisé en plusieurs exemplaires (donc à différents endroits de l'organe concerné), a été **inclus en bloc FFPE** pour réalisation ultérieure de **coupes histologiques** afin de confirmer le diagnostic de SH ; tandis que les autres exemplaires des prélèvements biopsiques du même organe étaient **envoyées au laboratoire de l'Équipe « Génétique du Chien » de l'IGDR**. Dans ce laboratoire, nous avons **extraît l'ADN** des prélèvements tumoraux reçus, puis nous avons **réalisé une ddPCR** pour chaque échantillon d'ADN. Les résultats des ddPCR sur ces échantillons tumoraux sont rassemblés dans le **Tableau XIX**. Les pourcentages de mutations identifiées sont indiqués, ainsi que l'intervalle de confiance à 95% correspondant. **Seul un individu**, le cas 19863, ne présentait **pas de mutation** de *PTPN11* au sein de ses **lésions tumorales**.

A) Répartition des mutations de *PTPN11* dans les cas mutés pour la tumeur

Les **mutations observées** dans les sept SH mutés de notre cohorte correspondent aux **deux hotspots mutationnels du gène *PTPN11*** : les substitutions d'acides aminés **E76K (10,014,655 G/A)** et **G503V (10,052,797 G/T)**. Comme dans la littérature, notamment dans la publication de Takada *et al.* en 2019 rapportant 32,3% de mutations E76K et 10,4% de G503V, bien devant les autres mutations de *PTPN11* [8], nous retrouvons la mutation **E76K en majorité (78%)**, devant la mutation G503V (22%) (**Figure 60**).

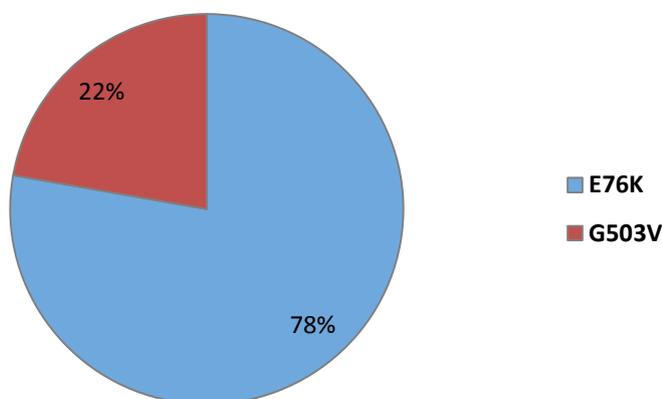


Figure 60 : Répartition des mutations du gène *PTPN11* dans les échantillons tumoraux de notre population de Bouviers Bernois atteints de sarcome histiocytaire (réalisation personnelle).

Tableau XIX : Résultats de ddPCR détectant le ratio des mutations E76K et G503V dans les différentes tumeurs des huit individus atteints de SH (réalisation personnelle).

ID : identifiant, les *ID* en **gras** sont les individus issus de l'élevage de la vallée de l'Hyrôme, les *ID* en italique sont les individus issus de l'élevage du Logis de Sainte-Macrine ; *NL* : Nœuds Lymphatiques ; *NA* : Non Applicable (pour raisons techniques : tumeur non collectée ou analyses n'ayant pas pu être réalisées). Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués dans chaque ligne sous les pourcentages calculés de mutation détectée (toutes les valeurs sont en %).

ID cani-DNA	Sexe	Pourcentage (%) de la mutation concernée retrouvée dans chaque échantillon d'ADN tumoral							Mutation					
		Poumons	Rate	NL	Foie	Rein	Autres organes			E76K	G503V			
19967	F	0,000%		5,960%						1	0			
		[0-0,002312634]		[4,89-7,02]										
19965	M				10,100%						1	0		
					[7,93-12,2]									
19963	F	NA	6,350%	NA	NA						0	1		
		NA	[4,61-8,09]	NA	NA									
11962	F	41,800%	30,500%	59,800%						1	0			
		[38,5-45]	[27,8-33,2]	[56,7-62,9]										
<i>18735</i>	F						Œil	Épaule 1	Épaule 2	Épaule 3	1	0		
							31,000%	0,580%	24,400%	0,408%				
							[21,8-40,1]	[0,232-0,928]	[22,9-25,8]	[0,037-0778]				
<i>19863</i>	F		0,000%	0,000%		0,000%						0	0	
			[0-0,001567749]	[0-0,001417722]		[0-0,001051852]								
<i>20272</i>	F	E76K				G503V						Poumons	Foie	
		57,30%				47,50%						1	1	
		[52,4-62,3]				[35,7-47,5]								
<i>19781</i>	F	39,100%											1	0
		[18,8-59,4]												

Il est intéressant de noter, comme mentionné ci-dessus, qu'un individu (le cas 19863) ne présente pas de mutations de *PTPN11* au sein de ses trois lésions tumorales : rate, nœuds lymphatiques, rein.

Un autre cas de lésion tumorale non mutée est rapporté dans le cas **19967**. En effet, celui-ci présente **deux résultats de ddPCR différents selon la lésion tumorale** : les **nœuds lymphatiques présentent la mutation E76K**, tandis que le prélèvement pulmonaire ne présente pas de mutation. **Cette absence de mutation de *PTPN11* dans les poumons** peut s'expliquer par le fait que cette lésion tumorale n'avait pas encore acquis de mutation, auquel cas nous avons affaire à un vrai négatif ; ou bien la proportion d'ADN de cellules tumorales dans le tissu n'était pas assez importante après extraction, auquel cas c'est un faux négatif.

B) Étude épidémiologique-clinique des individus atteints de sarcome histiocytaire

Au-delà des mutations du gène *PTPN11* retrouvées dans nos cas, il est intéressant d'étudier la répartition des sarcomes histiocytaires diagnostiqués selon leur localisation organique :

- Pour un cas, le **18735**, les sarcomes histiocytaires identifiés étaient des formes externes, **localisées** à l'œil ainsi qu'à l'épaule.
- Les **autres cas** ont été considérés comme des SH **disséminés**. Cette catégorie **inclut** le cas **19963**, qui a été diagnostiqué à l'histologie comme un **SH hémophagocytaire**. Nous avons étudié la répartition des tumeurs par organe chez ces sept individus (Figure 61).

Ainsi, parmi dix-sept tumeurs identifiées chez ces sept chiens, nous constatons une **majorité de localisations pulmonaires (29%** des tumeurs), bien que dans la littérature la rate soit l'organe préférentiel du SH, devant les poumons [120]. La **deuxième localisation préférentielle** du SH dans nos cas correspond aux **nœuds lymphatiques (24%)**, puis à la **rate (23%)**. Les tumeurs du **foie** et du **rein** ont été plus **anecdotiques**, avec respectivement trois cas de tumeurs hépatiques et un cas de tumeur rénale.

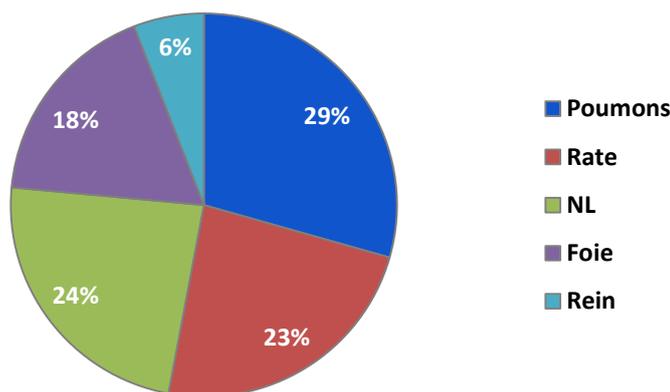


Figure 61 : Etude épidémiologique-clinique chez les chiens de notre cohorte atteints de sarcome histiocytaire : localisations des tumeurs avérées selon les organes (réalisation personnelle).

Concernant le **sexe des individus atteints de SH**, notre échantillon comporte une **majorité de femelles (7 femelles pour un mâle)** (Tableau XIX), **de la même façon que notre cohorte globale (9 mâles pour 35 individus)**. La prédisposition sexuelle n'a donc pas été testée ici.

C) Variabilité du taux de mutation tumorale selon les prélèvements analysés

Le **taux de mutation tumorale** obtenu après ddPCR **dépend de la quantité de cellules tumorales** présentes dans l'échantillon tissulaire d'origine. En effet, **plus il y a de cellules tumorales** dans notre prélèvement, **plus la quantité d'ADN tumoral extrait sera importante** par rapport à la quantité d'ADN sain ; et donc plus il y a de chances de détecter effectivement cet ADN tumoral muté (ce qui signifie que cela **diminue le risque de faux négatif**, à cause d'un défaut de sensibilité de la technique de ddPCR). De la même façon, **l'analogie** peut être faite avec la réalisation de **coupes histologiques** à partir des biopsies d'organes. Si la coupe histologique est réalisée sur une partie du bloc FFPE contenant **peu ou pas de cellules tumorales**, il y a un **risque** de ne pas visualiser de cellules tumorales au microscope, et donc d'avoir un **faux négatif à l'histologie**.

Ce risque de faux négatif et cette variabilité, dépendante de la quantité de cellules tumorales dans les prélèvements, peuvent être **illustrés par le cas de l'individu 18735**, chez qui deux sarcomes histiocytaires à forme externe et localisée ont été identifiés : un à l'œil, confirmé par histopathologie, et un à l'épaule, **non confirmé par histopathologie**. Sur la coupe histologique de l'épaule, **aucune cellule histiocytaire n'a été identifiée** et les observations étaient davantage en faveur d'un lipome. Cependant, en **ddPCR**, trois prélèvements, de localisation différente sur la masse de l'épaule, ont chacun montré une **positivité à la mutation E76K**, bien qu'il y ait des **variations dans les ratios calculés** (Figure 62). Nous avons donc émis **l'hypothèse** que la masse de l'épaule étant importante, plusieurs prélèvements différents ont été réalisés lors de l'autopsie, et **le prélèvement analysé en histopathologie n'était pas représentatif de la tumeur** car il ne contenait pas de cellules tumorales, contrairement aux prélèvements analysés en ddPCR. La coupe histologique de l'épaule de ce chien serait donc un **faux négatif**. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en réalisant d'autres coupes histologiques provenant d'autres localisations de la masse de l'épaule, et/ou en analysant en ddPCR le prélèvement utilisé pour la coupe histologique considérée comme faux négatif.

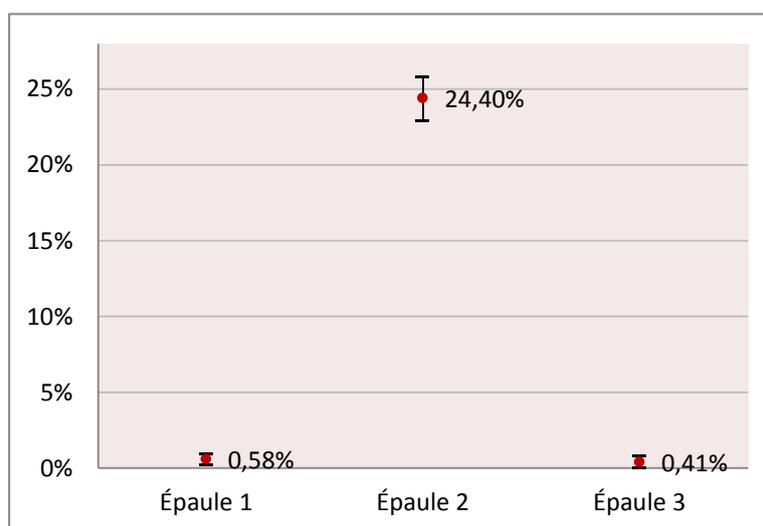


Figure 62 : Illustration graphique de la variabilité intratumorale des ratios de mutation E76K, selon le prélèvement réalisé dans l'organe : cas de la tumeur de l'épaule de l'individu 18735 (réalisation personnelle).

La variabilité du taux de mutation selon la quantité de cellules tumorales dans l'échantillon d'origine peut également être illustrée par le cas **19963**, ayant déclaré un **SH hémophagocytaire** fulgurant. Dans le cas de cette forme très agressive, les **cellules tumorales** ne forment pas une masse ou un nodule assez bien distinct ou délimité, mais elles vont au contraire **infiltrer diffusément l'organe**, ce qui mêle les cellules tumorales à des cellules saines et inflammatoires ou réactionnelles. Les **cellules tumorales sont ainsi diluées parmi les autres cellules**. Cela peut expliquer le **faible pourcentage de mutation** dans la rate observé dans ce cas, soit 6,35% ; ratio peu élevé comparé à celui du cas 11962 présentant également un SH splénique, avec un taux de mutation de 30,50%.

D) Illustrations graphiques des résultats de ddPCR des échantillons tumoraux

Comme expliqué dans la partie 2.4.2.2, le logiciel *QX Manager 1.2 Standard Edition* permet de récupérer les résultats de la ddPCR, « lus » par le lecteur de gouttelettes, sous forme de **graphiques ou de tableaux chiffrés** sur ordinateur. Les résultats chiffrés ayant été exposés ci-dessus, nous allons maintenant donner les **exemples les plus représentatifs et les plus visuels** de la représentation graphique des résultats de ddPCR obtenus dans les échantillons tumoraux (Figure 63, Figure 64).

Les graphiques sont représentés sous forme de **nuages de points**. Chaque point correspond à l'**interprétation de la fluorescence d'une gouttelette** par l'instrument lisant les gouttelettes dans la plaque de PCR. Les points les plus proches de l'**origine** correspondent aux **gouttelettes négatives**, c'est-à-dire celles ne présentant **aucun allèle du gène PTPN11**, ni l'allèle sauvage ni l'allèle muté. Les nuages de points s'étendant le long de l'axe des **abscisses** correspondent à la fluorescence **HEX**, choisie dans notre étude pour coder les **allèles sauvages**. Chaque point de ces nuages correspond donc à une gouttelette contenant un allèle sain (ou sauvage) du gène *PTPN11*. Les nuages de points s'étendant le long de l'axe des **ordonnées** correspondent à la fluorescence **FAM**, choisie dans notre étude pour coder les **allèles mutés**. Chaque point de ces nuages correspond donc à une gouttelette contenant un allèle muté du gène *PTPN11*.

Des nuages de points peuvent résulter d'une **translation de deux nuages de points**, ils correspondent en effet aux **gouttelettes contenant deux allèles différents de PTPN11**, exprimant donc deux fluorescences différentes. Par exemple, le troisième nuage de points le plus à droite sur l'axe des abscisses, fréquemment retrouvé, correspond à des gouttelettes contenant les deux allèles sains de *PTPN11* (un pour E76K et un pour G503V).

Des **individus témoins**, négatifs ou positifs pour les mutations de *PTPN11*, nous permettent de **déterminer le seuil d'amplitude à partir duquel un point** peut être considéré comme **appartenant à tel nuage de points**. Ainsi, nous avons pu désigner sur le logiciel les points considérés comme représentant les gouttelettes avec un ou plusieurs allèle(s), muté(s) ou sain(s). Cela nous a permis d'obtenir des données chiffrées, calculées par le logiciel, dont les pourcentages de mutations retrouvées et leurs intervalles de confiance à 95%.

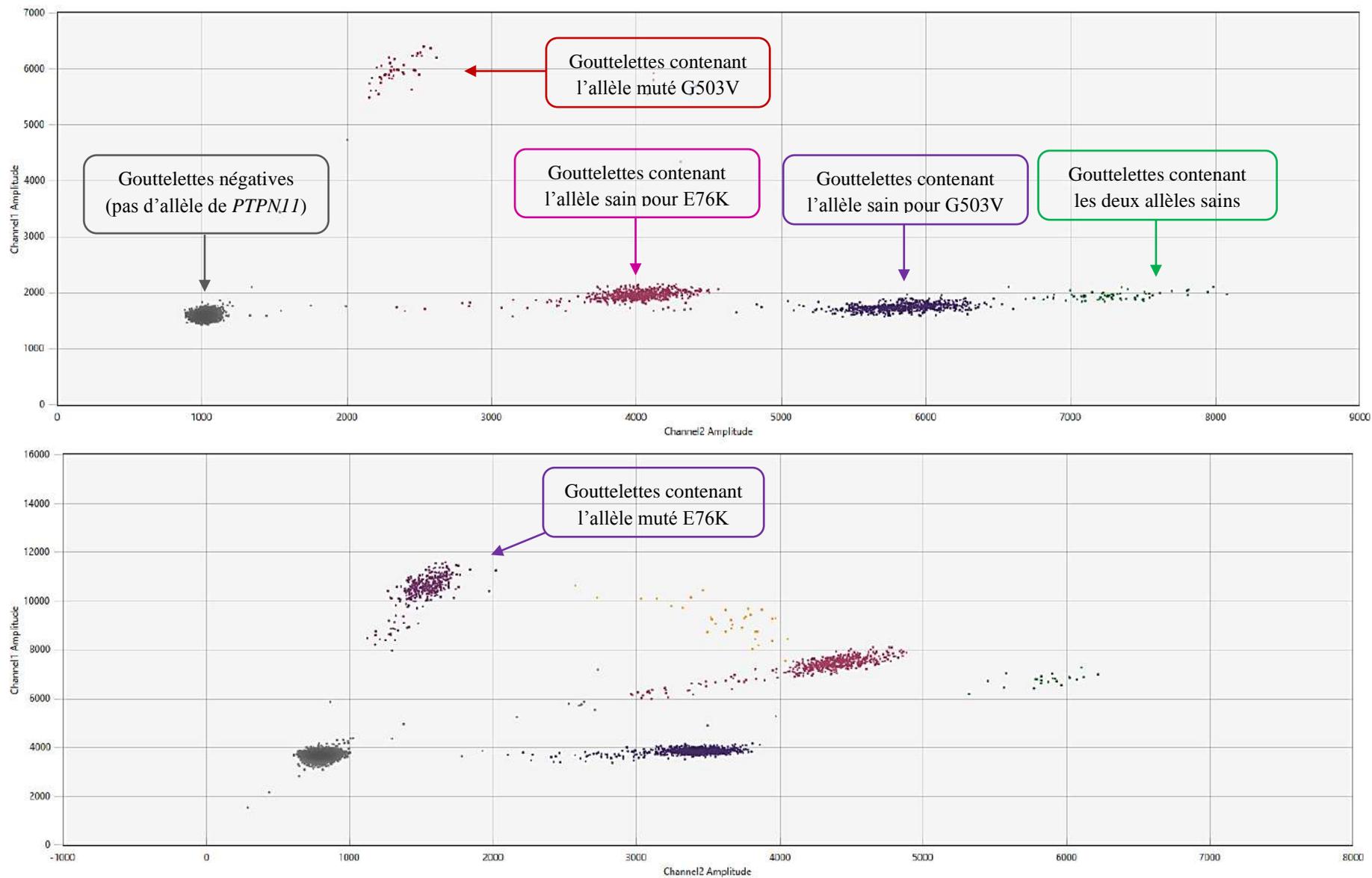


Figure 63 : Graphiques des résultats de ddPCR pour deux individus atteints de sarcome histiocytaire.

En haut : résultat de l'analyse du prélèvement de rate du chien 19963, muté G503V ; *en bas* : résultat de l'analyse des poumons du chien 11962, muté E76K.

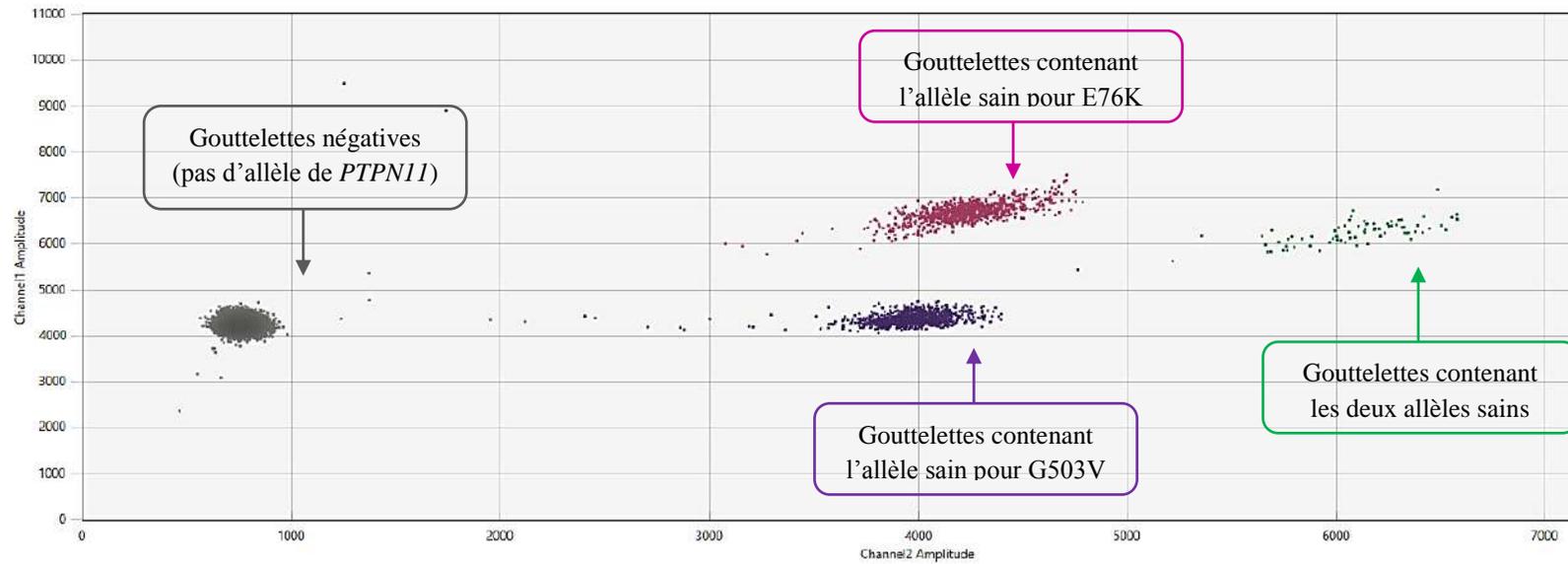
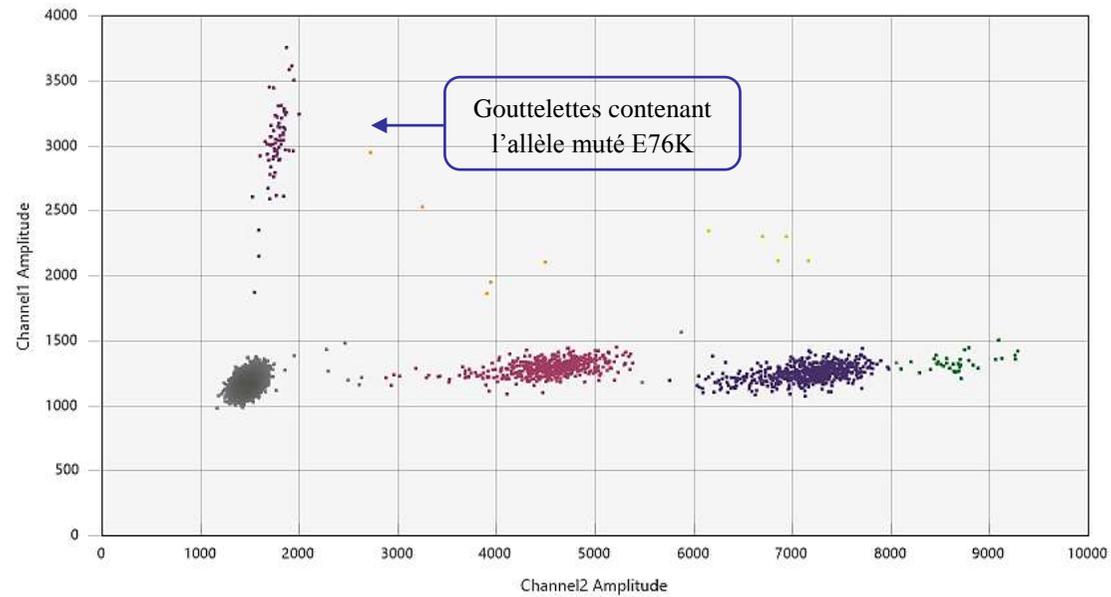


Figure 64 : Graphiques des résultats de ddPCR pour deux individus atteints de sarcome histiocytaire.

En haut : résultat de l'analyse du prélèvement de foie du chien 19965, muté E76K ; *en bas* : résultat de l'analyse des nœuds lymphatiques du chien 19863, non muté.

3.2.2. Résultats de ddPCR sur les échantillons plasmatiques des individus affectés par un sarcome histiocytaire

Parmi les huit chiens affectés de sarcome histiocytaire, un chien (**19863**) ne présentait **pas de mutation** du gène *PTPN11* **dans ses lésions tumorales** ; et un chien (**19781**) ne présentait **pas de suivi satisfaisant** quant à la régularité des prélèvements plasmatiques (que trois prélèvements, trop espacés : mars 2021, puis mars et août 2022). Nous avons donc gardé **six chiens pour analyser les résultats de ddPCR dans les échantillons plasmatiques séquentiels**. Les échantillons plasmatiques ont été analysés du plus récent au plus ancien, les résultats sont rassemblés dans le [Tableau XX](#).

A) Illustration par individu des résultats de ddPCR sur les échantillons plasmatiques

Pour mieux **illustrer l'évolution de la quantité de mutation détectée selon la date de prélèvement**, nous avons réalisé **un graphique par chien avec une courbe de tendance**, afin d'avoir un aperçu de **l'évolution globale** de la quantité d'ADN tumoral circulant (ADN_{tc}) muté, dans les échantillons plasmatiques séquentiels ([Figure 65](#)). L'évolution de cette quantité d'ADN_{tc} muté n'est pas linéaire en fonction du temps ou de la charge tumorale, elle varie selon les dates de prélèvements pour un même individu. Cette **évolution variable** sera discutée dans la partie 4 (Discussion).

De la même façon que pour les résultats de ddPCR sur les échantillons tumoraux, nous avons choisi ici quelques graphiques de ddPCR, les plus visuels, afin d'illustrer nos interprétations des nuages de points pour chaque chien (*i.e.* attribution d'un allèle sauvage ou muté à chaque point représentant une gouttelette) ([Figure 66](#)).

Pour le cas **19965**, il peut être intéressant de noter que le **jour de son dernier prélèvement** (date du décès, le 23/08/2021), il a été anesthésié pour subir une laparotomie exploratrice avec éventuelle splénectomie. Or, les analyses pré-opératoires avaient révélé une **anémie avec thrombocytopenie sévères**, ayant motivé une **transfusion pré-opératoire** par les vétérinaires traitants. Cependant, **nous ne connaissons pas le moment exact du prélèvement**, supposé avoir été réalisé avant transfusion. S'il a été réalisé après transfusion, cela peut expliquer le taux de mutation moindre que l'on retrouve ce jour par rapport au prélèvement antérieur le 22/06/2021.

Tableau XX : Résultats de ddPCR détectant le ratio des mutations E76K et G503V dans les différents prélèvements plasmatiques des six individus atteints d'un sarcome histiocytaire portant une mutation de *PTPN11* (réalisation personnelle).

ID : identifiant Cani-DNA, les *ID* en **gras** sont les individus issus de l'élevage de la vallée de l'Hyèvre, les *ID* en *italique* sont les individus issus de l'élevage du Logis de Sainte-Macrine ; *NL* : Nœuds Lymphatiques ; *NA* : Non Applicable (pour raisons techniques : plasma non collecté ou analyses n'ayant pas pu être réalisées) ; *e1/e2* : élution 1 ou 2 de l'extraction d'ADN. Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués, dans chaque ligne sous les pourcentages calculés de mutation détectée (toutes les valeurs sont en %).

ID	Date décès	Prélèvements plasma (date de réception pour BB placés)											Mutation		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	E76K	G503V	
19967	26/07/2021	01/04/2021 0,000% [0-0,708]	22/06/2021 0,345% [0-1,16]										1	0	
19965	23/08/2021	01/04/2021 0,000% [0-0,59]	22/06/2021 7,390% [1,52-13,3]	23/08/2021 1,430% [0-3,53]										1	0
19963	15/05/2023	01/04/2021 0,000% [0-2,63]	22/06/2021 0,000% [0-0,27]	05/10/2022 NA Non extrait	17/12/2021 0,000% [0-0,75]	07/03/2022 0,345% [0-1,16]	16/06/2022 0,270% [0-0,917]	18/10/2022 e2 7,070% [3,31-10,8]	31/01/2023 e2 0,536% [0-1,35]	28/02/2023 NA Non prélevé	20/03/2023 7,660% [3,02-12,3]	15/05/2023 NA Non exploitable	0	1	
11962	29/08/2023	01/04/2021	22/06/2021	05/10/2021	17/12/2021	07/03/2022	16/06/2022	18/10/2022	31/01/2023	22/05/2023 0,000% [0-0,01]	09/08/2023 NA Non extrait	29/08/2023 3,560% [2,18-4,95]	1	0	
<i>18735</i>	31/03/2022	15/03/2021 0,000% [0-0,92]	22/06/2021 0,000% [0-0,39]	05/10/2021 0,278% [0-0,935]	17/12/2021 0,372% [0-1,25]	07/03/2022 10,660% [8,1-12,44]	31/03/2022 NA Pas de plasma						1	0	
<i>20272</i>	14/05/2022			Chr 26 10,014,655 G/A : E76 K (poumons)									Poumons	Foie	
		22/06/2021 3,700% [1,7-4,3]	05/10/21 0,760% [0-1,5]	17/12/21 4,560% [2,96-6]	07/03/22 1,580% [0-4]	14/05/22 NA NA						1	1		

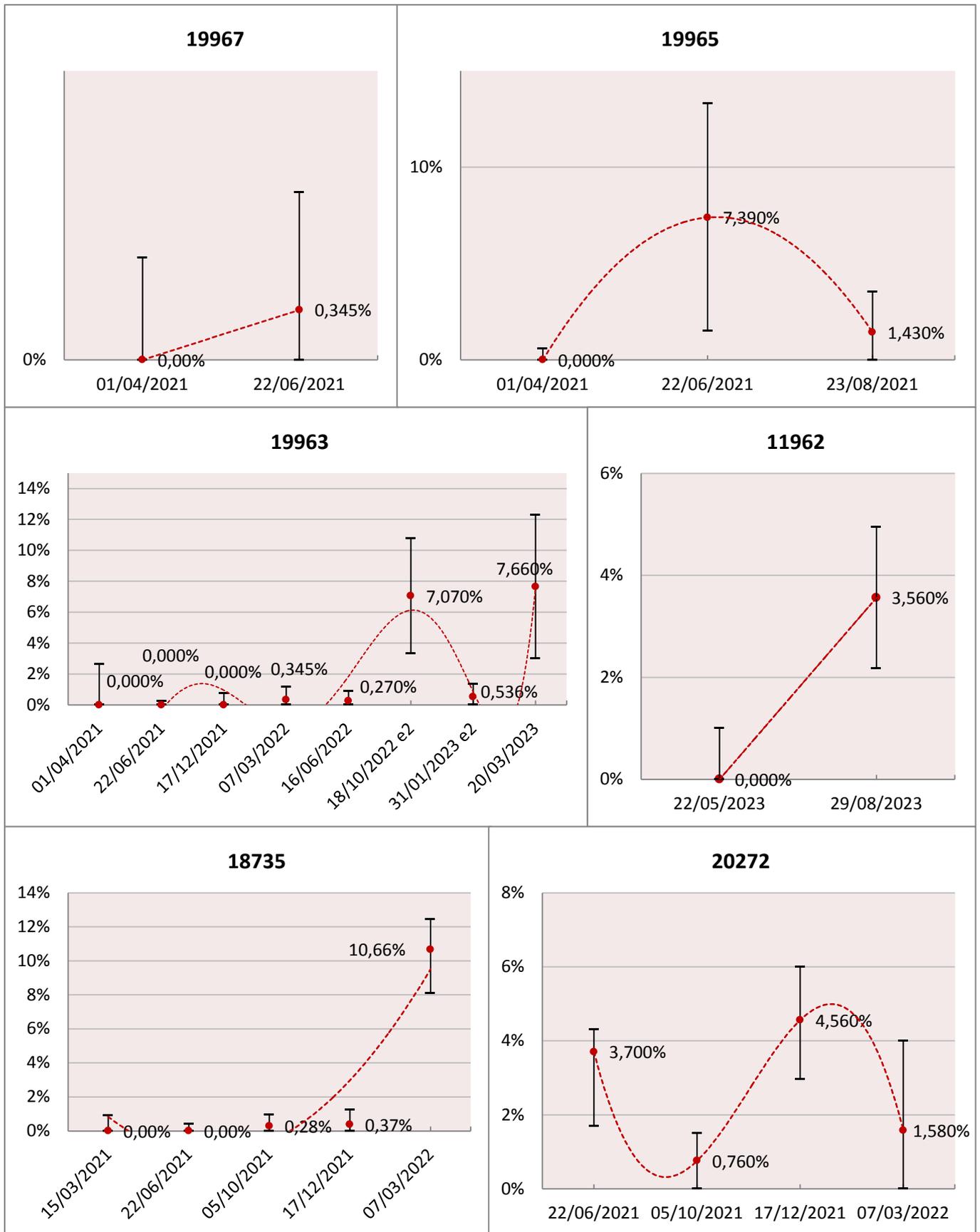


Figure 65 : Courbes de tendance polynomiales représentant l'évolution du ratio d'ADN tumoral circulant muté en fonction du temps, chez les six individus atteints d'un sarcome histiocytaire muté pour *PTPN11* (réalisation personnelle).

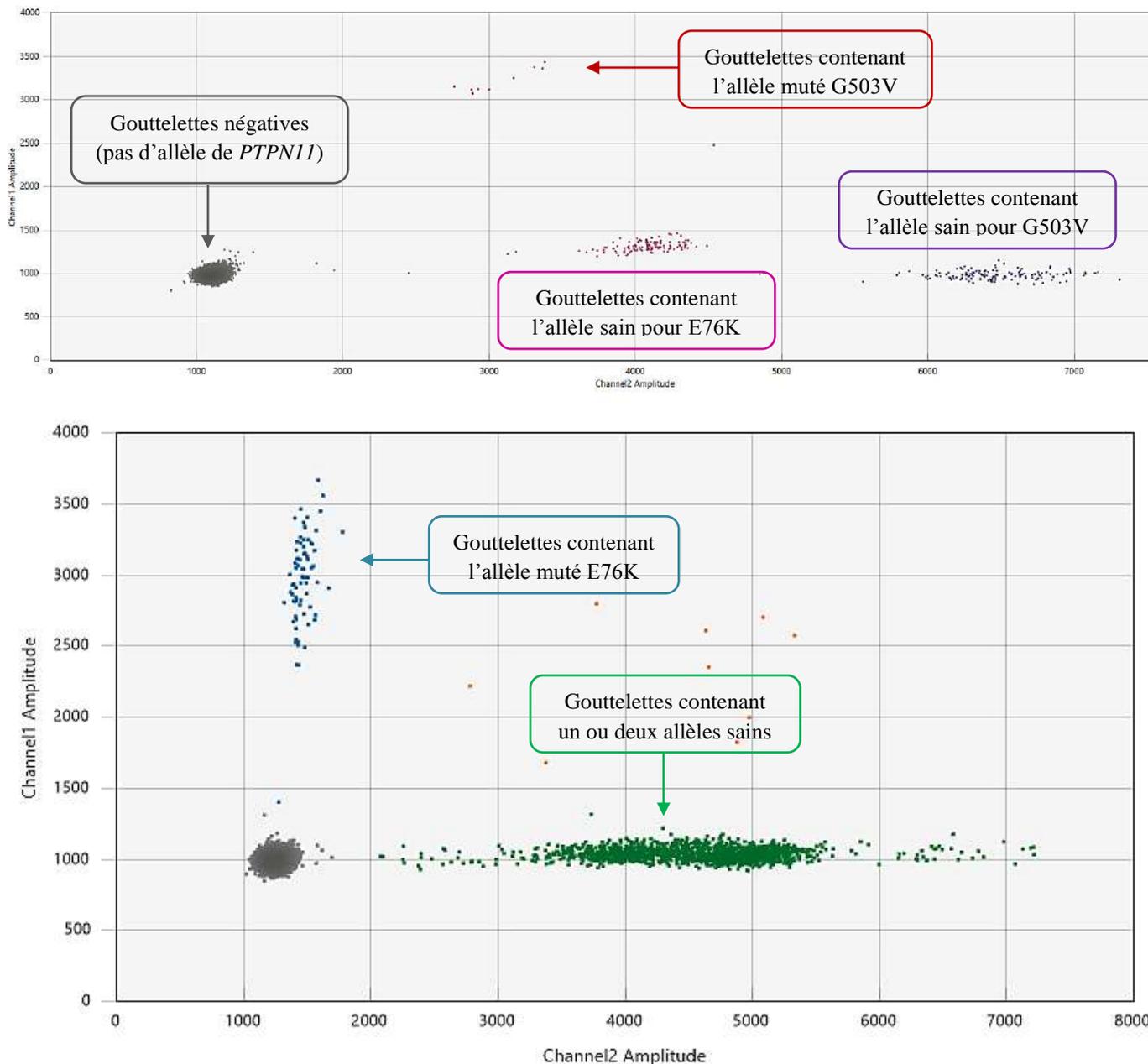


Figure 66 : Graphiques des résultats de ddPCR sur échantillons plasmatiques pour deux individus atteints de sarcome histiocytaire.

En haut : résultat de l'analyse du prélèvement plasmatique du 20/03/2023 du chien 19963, muté G503V ; on peut noter le faible nombre de gouttelettes en comparaison avec l'image du bas, probablement liée à la forme hémophagocytaire du SH chez ce chien.

En bas : résultat de l'analyse du prélèvement plasmatique du 07/03/2023 du chien 18735, muté E76K, et ayant un SH localisé à l'œil et un second à l'épaule.

B) Cas particulier du chien 19963 : un sarcome histiocytaire hémophagocytaire foudroyant

Le cas **19963** a été particulièrement prometteur dans notre travail, car nous avons pu réaliser sur une durée de **quelques mois une étude prospective** sur ce chien. En effet, après les deux ans de collecte, nous avons décidé d'analyser tous les échantillons plasmatiques les plus récents, y compris ceux toujours en vie. Cela nous a permis d'identifier **trois individus présentant une mutation du gène PTPN11** dans l'ADNet du plasma, dont le cas 19963, et deux autres dont nous discuterons dans la partie 3.3.

Le cas 19963 est, parmi ces trois individus positifs pour une mutation, **le seul étant aujourd'hui décédé d'un SH foudroyant, confirmé par analyse histopathologique**. Nous avons identifié, lors de nos dernières analyses de ddPCR, la mutation G503V de *PTPN11* dans son prélèvement plasmatique le plus récent (datant du 31/01/2023). En remontant dans les prélèvements antérieurs, la **positivité pour cette mutation s'est avérée être présente** depuis le prélèvement du 07/03/2022, soit quasiment **onze mois avant** le dernier prélèvement. Nous avons donc décidé de mettre en place une **surveillance rapprochée** de ce chien en proposant à l'éleveuse la réalisation, **tous les trois mois**, d'un **examen d'imagerie tomodensitométrique**, pris en charge financièrement dans le contexte de cette étude. Cet examen a pu être réalisé le 20/03/2023, en ciblant les régions **thoracique et abdominale**. Le compte-rendu de l'examen (Dr Nora Bouhsina) n'a pas fait état de masses identifiables comme tumorales ; bien que les images des poumons et de la rate ne **puissent pas exclure totalement l'hypothèse tumorale** :

- « **Petites plages pulmonaires** mal délimitées compatibles avec des **foyers inflammatoires** en première hypothèse, pouvant être en lien avec l'anesthésie. Un processus tumoral ne peut cependant être totalement exclu et un suivi tomodensitométrique de ces nodules est recommandé. »

- « **Splénomégalie diffuse homogène** probablement **consécutive à l'anesthésie**. Une infiltration tumorale est peu probable mais ne peut être totalement exclue. »

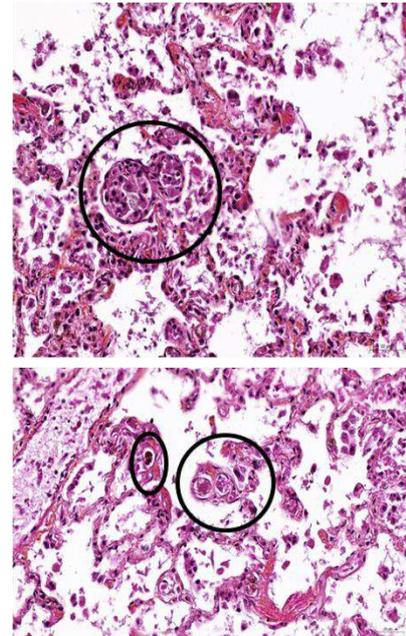
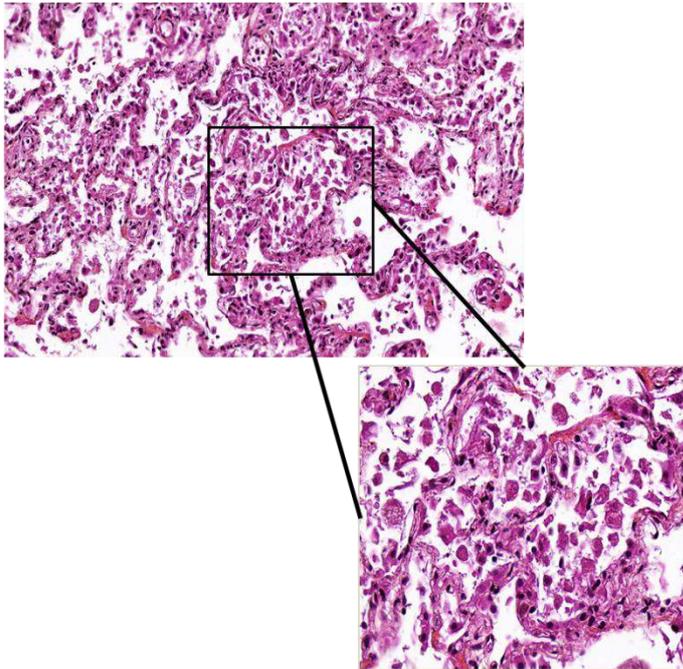
À peine deux mois après cet examen d'imagerie, le 14/05/2023, la chienne a présenté **une épistaxis en continu** et a été emmenée en **consultation d'urgence** dans la nuit. Aucun signe clinique annonciateur n'avait laissé penser à une dégradation de l'état général avant cette épistaxis. La chienne, en raison d'un **très mauvais état général, a été euthanasiée** dans la journée qui a suivi la consultation d'urgence, soit le 15/05/2023. L'autopsie (Figure 67) et les analyses histologiques réalisées ont révélé de multiples organes **infiltrés par des cellules tumorales histiocytaires** : **poumons** (Figure 68), **rate** (sous-partie 2.1.3, Figure 50), **foie et nœuds lymphatiques** (Figure 69 et sous partie 2.1.3, Figure 51). Les images histopathologiques sont caractéristiques de **SH hémophagocytaire**, avec de nombreuses figures de phagocytose dont de l'érythrophagocytose et des figures de mitose anormales.



Figure 67 : Clichés de la rate (à gauche) et de nœuds lymphatiques mésentériques (à droite) lors de l'autopsie du cas 19963 atteint de SH hémophagocytaire (réalisation : Marie Cuvelier, Oniris).

*Un nodule tumoral est encerclé en **jaune** sur la rate à gauche. Un nœud lymphatique mésentérique hypertrophié, infiltré par des cellules tumorales histiocytaires, est encerclé en **jaune** à droite.*

Cellules tumorales dans la lumière alvéolaire



Cellules tumorales dans les cloisons et vaisseaux alvéolaires

Figure 68 : Clichés au microscope optique d'une coupe histologique avec la coloration HES, d'infiltrats cellulaires pulmonaires de sarcome histiocyttaire hémophagocytaire chez le chien 19963 (réalisation : Marie Cuvelier, LabOniris).

Des cellules tumorales histiocytaires sont encerclées en noir. Ces cellules tumorales ont les mêmes caractéristiques que d'autres cellules histiocytaires, notamment : cytoplasme abondant avec éléments ingérés ; noyaux gros et nucléolés, parfois binucléés ; figures de mitose nombreuses et fréquemment anormales.

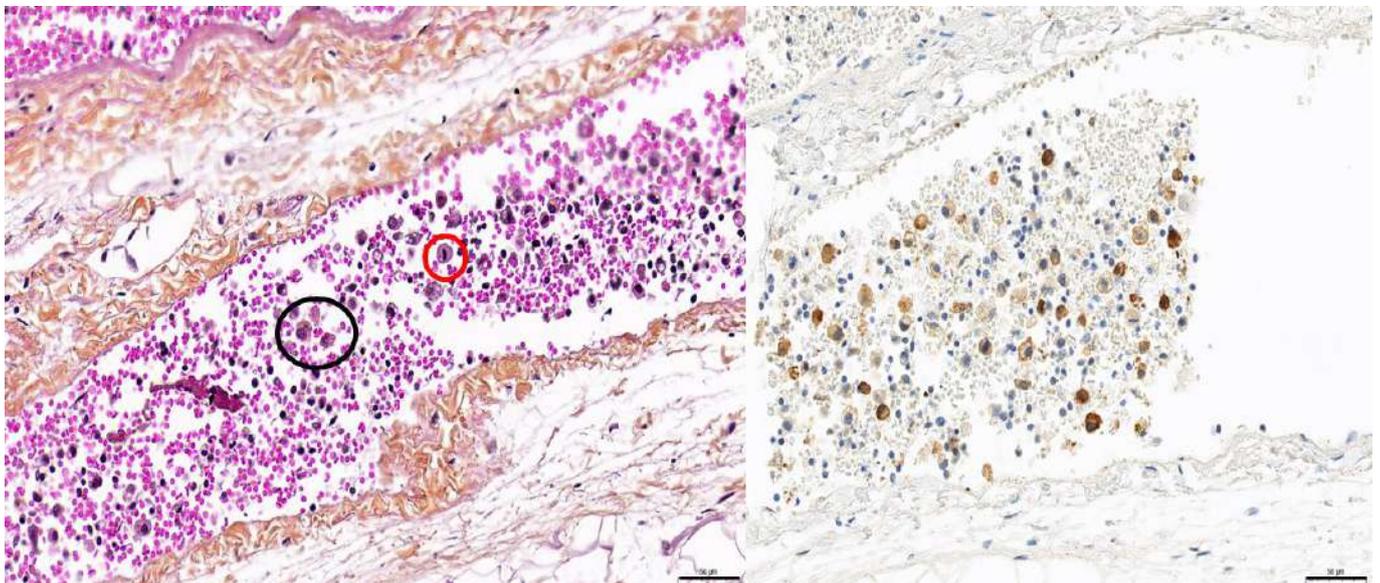


Figure 69 : Clichés au microscope optique d'une coupe histologique avec la coloration HES (à gauche) et avec immunomarquage Iba-1 (à droite), d'infiltrats de sarcome histiocyttaire hémophagocytaire dans des vaisseaux lymphatique chez le chien 19963 (réalisation : Marie Cuvelier, LabOniris).

Une figure de mitose est encerclée en rouge et des embolus tumoraux sont encerclés en noir sur la photographie de gauche. L'échelle (barre noire) représente 50 μ m sur les deux photographies.

C) Caractéristiques de performance de notre test de diagnostic du sarcome histiocytaire par détection des mutations de *PTPN11* dans l'ADN tumoral circulant, au sein de l'effectif des sept individus concernés

De la même façon que dans la publication de Prouteau *et al.* en 2021 [2], nous avons calculé les caractéristiques de performance de notre test de diagnostic, c'est-à-dire la **sensibilité (Se)**, la **spécificité (Spe)**, la **valeur prédictive négative (VPN)** et la **valeur prédictive positive (VPP)** comme indiqué dans l'encadré de rappel ci-dessous. Pour rappel, **VP** signifie Vrais Positifs et **VN** signifie Vrais Négatifs ; **FP** signifie Faux Positifs et **FN** signifie Faux Négatifs.

Rappel théorique – Méthodes de calcul des caractéristiques de performance d'un test diagnostic

Sensibilité = Fraction des individus malades dont le test est positif = $VP / (VP + FN)$

Spécificité = Fraction des individus sains dont le test est négatif = $VN / (VN + FP)$

Valeur Prédictive Positive = Proportion des individus testés positifs et étant effectivement malades
= $VP / (VP + FP)$

Valeur Prédictive Négative = Proportion des individus testés négatifs et étant effectivement sains
= $VN / (VN + FN)$

Nous avons huit chiens atteints d'un SH, mais **un individu** (19781) n'avait **pas un bon suivi** concernant les prélèvements séquentiels de plasma, nous l'avons donc **exclu pour le calcul** des caractéristiques de performance du test.

Parmi les **sept individus** restants, nous avons dénombré **quatorze lésions tumorales**. Nous avons donc calculé les caractéristiques de performance de notre test de diagnostic selon la présence d'une **mutation de *PTPN11* dans au moins une de ces lésions tumorales** et selon la présence ou non de cette même mutation dans l'ADN tumoral circulant du plasma ([Tableau XXI](#)).

Tableau XXI : Répartition des mutations distinctes de *PTPN11* retrouvée chez chaque individu atteint de sarcome histiocytaire, selon leur présence dans au moins une lésion tumorale et/ou dans l'ADN tumoral circulant dans le plasma (réalisation personnelle).

VP : Vrais Positifs ; *VN* : Vrais Négatifs ; *FP* : Faux Positifs ; *FN* : Faux Négatifs ; *Se* : sensibilité ; *Spe* : spécificité ; *VPN* : valeur prédictive négative ; *VPP* : valeur prédictive positive.

	Mutation trouvée dans au moins une lésion tumorale	Mutation non trouvée dans au moins une lésion tumorale	Totaux
Mutation trouvée dans l'ADN circulant	6 (VP)	0 (FP)	6
Mutation non trouvée dans l'ADN circulant	1 (FN)	3 (VN)	4
Totaux	7	3	10

Après calculs : **Se** = 86% ; **Spe** = 100% ; **VPN** = 75% ; **VPP** = 100%

Après calculs, selon les formules de l'encadré de rappel et les valeurs du **Tableau XXI**, nous obtenons une **sensibilité de 86%**, une **spécificité de 100%**, une **valeur prédictive négative de 75%** et une **valeur prédictive positive de 100%**. Notre test a donc une excellente spécificité et une excellente valeur prédictive positive, mais une sensibilité et une valeur prédictive négative moindres. Cela signifie qu'il y a un risque de ne pas détecter tous les Bouviers bernois atteints de SH par recherche des mutations de *PTPN11* dans le sang, donc un **risque de faux négatifs**.

Ces **résultats sont cohérents avec ceux déjà obtenus** par Prouteau *et al.*, qui avaient obtenu pour ce même test une sensibilité de 91,3%, une spécificité de 100%, une valeur prédictive négative de 91,6% et une valeur prédictive positive de 100% [2].

Enfin, une dernière remarque intéressante à soulever concerne **l'analyse supplémentaire par ddPCR des échantillons sanguins collectés pour nos huit individus atteints d'un SH**. Nous avons effectivement réalisé des ddPCR pour les échantillons de sang total ou de sang déplété en plasma, afin de rechercher si les mutations de *PTPN11* pouvaient être détectées également dans l'ADN des potentielles cellules tumorales circulantes. Pour nos huit cas de sarcome histiocytaire, les **résultats de ddPCR se sont tous montrés négatifs pour les deux hotspots mutationnels**, E76K et G503V. Nous verrons cependant dans un paragraphe ultérieur que les mutations de *PTPN11* peuvent se retrouver dans l'ADN des cellules tumorales circulantes (3.3.3).

3.2.3. Estimation de la précocité du diagnostic du sarcome histiocytaire par détection des mutations du gène *PTPN11* dans l'ADN circulant du plasma

Pour estimer la précocité de notre test de diagnostic, nous avons besoin des **six individus** ayant au moins une lésion tumorale mutée avec la mutation correspondante retrouvée dans l'ADN tumoral circulant dans le plasma. La **date de diagnostic précoce (DP)** correspond à la date du **prélèvement le plus ancien présentant une positivité pour une mutation de *PTPN11***.

Pour chacun de ces chiens, nous avons contacté leurs vétérinaires traitants afin d'avoir le plus de données possibles concernant leurs signes cliniques dans les mois précédant leur euthanasie. Cette collecte d'informations nous a permis d'estimer une **date dite « de diagnostic (ou suspicion) clinique »**, c'est-à-dire la date où l'état général de l'animal et/ou les résultats d'examen complémentaires permettent de **suspecter fortement un processus tumoral** en développement, **compatible avec un SH**.

Les **dates de diagnostic de certitude (DC)** correspondent dans nos cas aux **diagnostics par histopathologie**, sur les prélèvements réalisés **presque toujours en post-mortem**. **Habituellement**, ce sont les dates de diagnostic de certitude qui sont **utilisées** pour être comparées aux dates de diagnostic précoce et ainsi **estimer la précocité d'une nouvelle technique diagnostique**, lorsque les diagnostics de certitude sont établis lors du vivant de l'animal, par des cytoponctions ou biopsies par exemple. Ici, cela était difficile à mettre en œuvre, d'une part car la majorité des tumeurs sont internes et viscérales, cela aurait donc nécessité une laparotomie exploratrice dans de nombreux cas ; d'autre part car les éleveurs ne souhaitent pas faire des examens complémentaires aussi invasifs sur leurs chiens. Ainsi, ici, **ces dates de diagnostic de certitude sont quasiment toutes en post-mortem**. C'est pourquoi nous avons **choisi de comparer la date de notre test de diagnostic précoce à la date de diagnostic clinique** (ou suspicion clinique).

L'ensemble de ces dates (de diagnostic précoce, de diagnostic clinique et de certitude) sont rassemblées dans le [Tableau XXII](#). Les dates de diagnostic de certitude y sont incluses pour illustrer le fait qu'elles ne soient pas utilisables pour nos cas.

Pour les chiens **19967** et **19965**, des analyses sanguines ont été réalisées quelques jours avant leur euthanasie. Celles-ci révélaient dans les deux cas une **anémie, modérée** pour le chien 19967 (Ht=33% ; GR=4,59x10⁶/mm³ ; Hb=10 g/dL) et **sévère** pour le chien 19965 (Ht=13% ; GR=1,57x10⁶/mm³ ; Hb=4 g/dL ; PLT=74x10³/mm³). L'anémie est **fréquente dans les cas de SH disséminé**, notamment lorsqu'il y a beaucoup d'**érythrophagocytose** dans les lésions tumorales, ce qui se retrouve **fréquemment lorsque la rate est tumorale**. Or, dans ces deux cas, la **rate était alésionnelle**. Il aurait été intéressant de **regarder d'autres coupes histologiques** afin de voir si de l'érythrophagocytose était présente dans les lésions tumorales d'autres organes, notamment les nœuds lymphatiques et le poumon pour le cas 19967, ou le foie pour le cas 19965.

Pour le cas **11962**, la suspicion clinique de SH est venue après déclaration d'une **toux un mois avant le décès**. Le vétérinaire traitant a alors réalisé des **radiographies thoraciques**, révélant des **masses** sur l'aire de projection des poumons et du médiastin ([Figure 70](#)). La chienne étant alors âgée (plus de dix ans) et de race Bouviers Bernois, l'**hypothèse privilégiée** était tumorale, et plus précisément le **SH**.

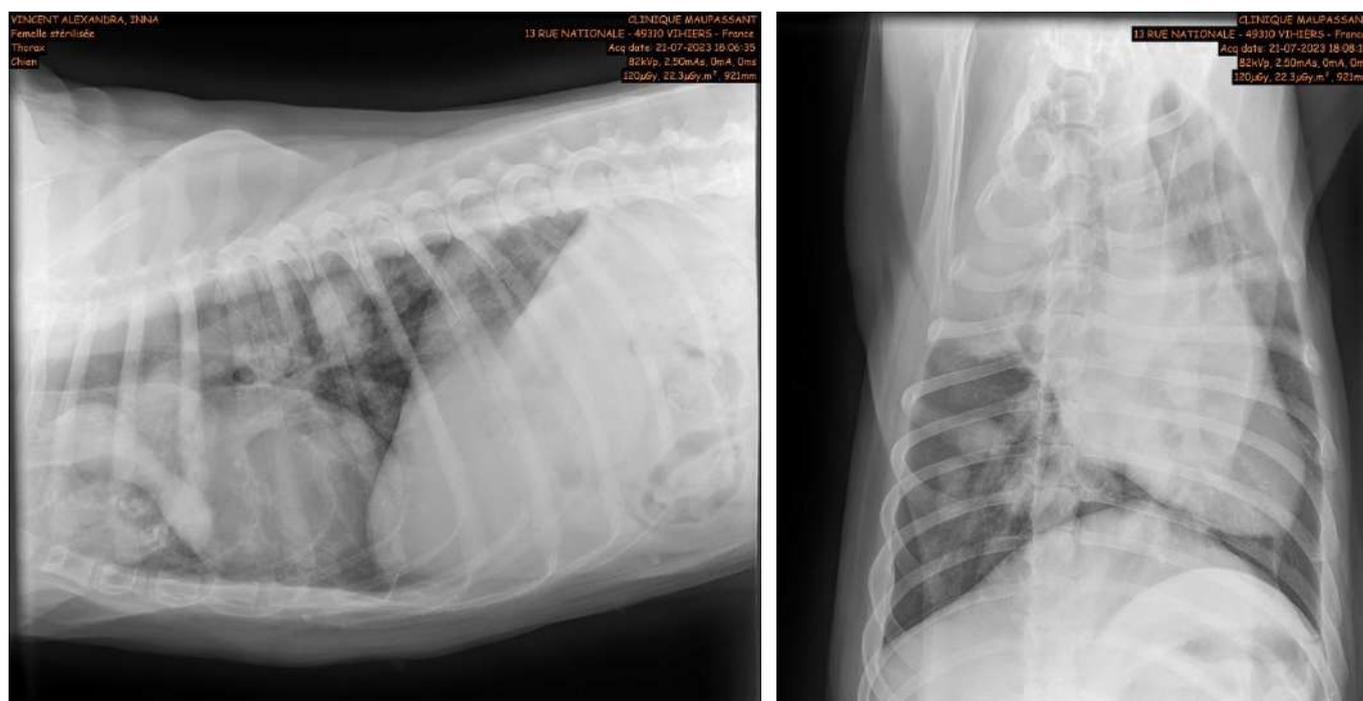


Figure 70 : Radiographies thoraciques (de profil à gauche, de face à droite) du chien 11962 de la Vallée de l'Hyrôme, réalisées le 21/07/2023 suite à une toux persistante, à la clinique vétérinaire Maupassant à VIHERS.

Tableau XXII : Détermination des dates de diagnostic clinique (diag. clinique), diagnostic de certitude (DC) et diagnostic précoce (DP) afin d'estimer le bénéfice du test diagnostique précoce du SH par rapport au diagnostic par suspicion clinique (réalisation personnelle). Les temps de survie et les délais sont en jours.

SH : Sarcome Histiocytaire ; NFS : Numération Formule Sanguine ; RX : radiographies ; OG : Œil gauche ; NL : Nœuds Lymphatiques ; PUPD : Polyurie Polydipsie.

ID cani-DNA	Date de décès	Âge au décès (années)	Diag. clinique	DC	DP	Survie après diag. clinique	Survie après DC	Délai SC après DP	Délai DP - DC	SC (Signes Cliniques) et prélèvements tumoraux analysés	Cause du décès
19967	26/07/2021	8,56	22/07/2021	26/07/2021	22/06/2021	4	0	30	34	22/07/2021 : baisse de forme, absences, essoufflement. RX thorax : nodules pulmonaires ou médiastinaux (un crânial, un caudal), cardiomégalie légère. Suspicion SH . NFS : anémie modérée et lymphopénie légère. Traitement : Fercobsang. 26/07/2021 : épisodes de tétanie musculaire, amaurose entre les crises, décubitus, polypnée : métastases cérébrales probables. Décision d'euthanasie. Histologie : NL et poumons infiltrés par le SH. Cerveau non autopsié.	SHD
19965	23/08/2021	5,52	20/08/2021	23/08/2021	22/06/2021	3	0	59	62	20/08/2021 : dysorexie, baisse de forme, amaigrissement (perte de 9 kg en 3 mois), muqueuses pâles à légèrement jaunâtres. Analyse urinaire : urobilirubinogénurie / bilirubinurie. Biochimie : hypoprotéïnémie et hypoAlb; PAL, ALAT et urée sévèrement augmentés. NFS : anémie et thrombopénie. Echo abdo : suspicion SH ou hémangioscarcome. 23/08/2021 : transfusion pré-op. Laparotomie exploratrice révélant des métastases hépatiques. Décision d'euthanasie. Histologie : foie infiltré par le SH.	SHD
19963	15/05/2023	6,66	15/05/2023	17/05/2023	07/03/2022	0	-2	434	436	16/02/2023 : RX thorax (que profil), écho abdo : hépatomégalie modérée, parenchyme bien homogène. OVE par flancs : RAS sur organes visibles. 14/05/2023 : épistaxis continu, consult. d'urgence. Écho abdo : foie, rate hypertrophiés. 15/05/2023 : suspicion SH , euthanasie. Histologie : foie, rate, poumons, NL = SH.	SHH
11962	29/08/2023	10,11	21/07/2023	29/08/2023	29/08/2023	39	0	-39	0	21/07/2023 : toux depuis vaccin toux de chénil le 06/07. RX : masses pulmonaires et médiastinales probablement tumorales. Suspicion SH . Traitement : Bronchosed. 03/08/2023 : anorexie, toux progresse. Traitement palliatif : corticoïdes. 29/08/2023 : amélioration clinique de courte durée sous corticoïdes avec inconfort gastrique apparu. Décision d'euthanasie. Histologie : poumons, rate, et NL = SH.	SHD
18735	31/03/2022	9,25	14/03/2022	24/03/2022	05/10/2021	17	7	160	170	14/03/2022 : amaurose brutale OG, évoluant depuis 2 semaines Luxation ventro médiale du cristallin, déformation irienne avec synéchies irido-cornéennes, hyperhémie conjonctivale, effet Tyndall et buphtalmie OG. 21/03/2022 : énucléation OG. 24/03/2022 : histologie : SH en région scléo-cornéenne de l'OG . 31/03/2022 : euthanasie. Histologie : stéatose hépatique ; lipome (?) épaule.	SHL
20272	14/05/2022	7,42	05/04/2022	14/02/2022	22/06/2021	39	89	287	237	05/04/2022 : PUPD ; biochimie : hypercalcémie. RX : masse pulmonaire probablement tumorale, suspicion clinique de SH . 14/05/2022 : décision d'euthanasie. Histologie : poumons et foie infiltrés par le SH.	SHD

Les valeurs des durées de survie après diagnostic clinique, de certitude ou précoce et les délais entre diagnostic précoce et diagnostic clinique / de certitude, répertoriées dans le [Tableau XXII](#), ont été interprétées par des statistiques descriptives (moyenne, médiane, minimum et maximum) dans le [Tableau XXIII](#).

Tableau XXIII : Statistiques descriptives concernant le délai de précocité du test de diagnostic du sarcome histiocyttaire chez nos six cas, par détection des mutations du gène *PTPN11* dans l'ADN circulant du plasma (réalisation personnelle).

Diag. : Diagnostic ; DP : Diagnostic précoce. Les cases sur fond jaunes sont les données les plus intéressantes concernant la précocité de ce test de diagnostic.

		Survie après diag. clinique	Survie après diag. de certitude	Survie après DP	Délai DP - diag clinique	Délai DP – diag. de certitude
JOURS	Moyenne	17	1	172	155	171
	Médiane	11	0	120	110	116
	Minimum	0	-2	0	-39	0
	Maximum	39	7	434	287	363
MOIS	Moyenne	0,67	0,07	6,71	5,24	6,26
	Médiane	0,56	0,01	5,72	5,17	5,60
	Minimum	0,00	-0,07	0,00	-1,28	0,00
	Maximum	1,28	0,23	14,23	9,41	11,90

Les données intéressantes à retenir dans ces tableaux sont notamment :

- **La durée de survie après diagnostic précoce** : elle a été nulle dans un cas, mais peut aller jusqu'à **14,23 mois** ; avec une **moyenne de 6,71 mois**. Cela est bien supérieur à la durée de survie après diagnostic clinique, qui est en moyenne de 17 jours avec un maximum de 39 jours (1,28 mois).
- **Le délai entre diagnostic précoce et diagnostic clinique** : le SH peut, grâce à notre test, être détecté en moyenne 155 jours plus tôt que le diagnostic clinique, soit 5,24 mois plus tôt ; le temps « gagné » grâce à cette précocité peut même aller jusqu'à 287 jours soit 9,41 mois.

Le délai entre le diagnostic précoce et le diagnostic de certitude se rapprochent de la durée de survie après diagnostic précoce, étant donné que les dates de diagnostics de certitude et de décès sont très proches. Cette donnée n'apporte donc pas beaucoup de plus-value aux données décrites ci-dessus.

Le **test de diagnostic du SH que nous avons mis au point**, par détection des mutations du gène *PTPN11* dans l'ADN circulant du plasma, **peut donc bien être qualifié de « précoce »**. De plus, cette précocité de diagnostic, avant toute suspicion clinique, est **très prometteuse**, se rapprochant presque d'une année complète pour certains cas. Cette précocité aurait donc tout **intérêt à être exploitée**, en mettant en place une prise en charge des animaux ainsi précocément diagnostiqués de SH ; l'objectif étant d'allonger leur durée de survie tout en conservant leur qualité de vie. Cela exclut donc les thérapies agressives et non spécifiques telles que la chimiothérapie ou la radiothérapie. En revanche, il serait pertinent de **développer une thérapie ciblée**.

3.3. Individus présentant une mutation de *PTPN11* dans l'ADN circulant du plasma, sans diagnostic de certitude de sarcome histiocytaire

3.3.1. Un individu en vie présentant une mutation de *PTPN11* dans l'ADN circulant du plasma, sans aucun signe clinique

Le chien 19856 était dans le même cas que la chienne 19963, décrite dans la sous partie 3.2.2 B). En effet, comme expliqué ci-dessus, après les deux ans de collecte, nous avons décidé d'analyser tous les échantillons plasmatiques les plus récents, y compris ceux des chiens toujours en vie. Cela nous a permis d'identifier **trois individus toujours en vie et présentant une mutation du gène *PTPN11*** dans l'ADNtc du plasma. Le premier cas décrit était celui de la chienne **19963**, atteinte d'un **SH hémophagocytaire fulgurant**. Nous allons ici décrire le second cas (**19856**) et nous expliquerons les particularités du dernier cas (**19857**) dans la sous-partie suivante.

La **découverte de la mutation E76K** chez l'individu **19856** était une découverte **fortuite**, comme pour le cas 19963. Ce sont les deux cas où nous avons décidé de mener une surveillance rapprochée par mise en place **d'examen d'imagerie tomographique tous les trois mois**. Pour le chien 19856, nous avons analysé les prélèvements plasmatiques antérieurs jusqu'à mars 2022. Les prélèvements de mars et juin 2022 étaient négatifs pour la mutation E76K, le **premier prélèvement positif est donc celui d'octobre 2022 (Tableau XXIV)**. Cette mutation a été retrouvée dans les prélèvements plasmatiques ultérieurs, mais à un pourcentage en diminution avec le temps (**Figure 71**). Cette variabilité du taux de mutation retrouvée dans l'ADNtc a déjà été observée lors des résultats précédents, et des hypothèses seront émises dans la partie discussion à ce sujet.

Une remarque peut être faite quant à l'analyse du prélèvement du **31/01/2023** : deux éluions issues de l'étape d'extraction de l'ADN du plasma ont été analysées. La première éluion ne montrait pas de gouttelettes positives, au contraire de **l'éluion 2, qui révélait la présence d'allèles mutants (Figure 72)**. L'hypothèse principale pour cette différence de résultats entre les deux éluions est liée à la **présence d'inhibiteurs de l'enzyme de PCR** (la Taq-polymérase), en quantité plus importante dans la première éluion que dans la deuxième éluion. Cette hypothèse sera discutée par la suite.

Tableau XXIV : Résultats des analyses par ddPCR sur les échantillons plasmatiques du chien 19856, révélant la présence de la mutation E76K du gène *PTPN11* (réalisation personnelle).

ID Cani-DNA	Mutation		Prélèvements plasma									
	E76K	G503V	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
19856	1	0	2021				2022			2023		
			15/03	22/06	05/10	17/12	07/03	07/06	18/10	31/01 e2	24/04	22/05
							0,000%	0,000%	5,150%	2,400%	Douteux	0,270%
				[0-0,0032]	[0-0,0036]	[3,24-7,05]	[0-6,8]	[0-0,016]	[0-0,92]			

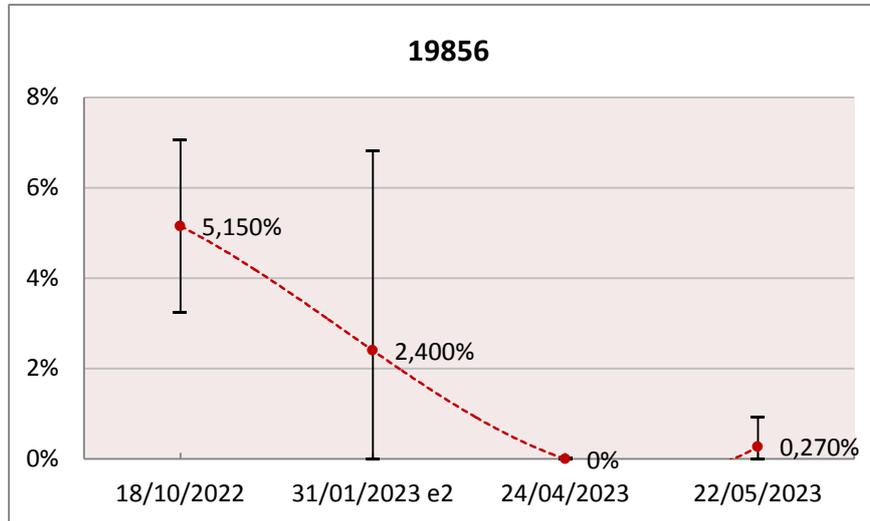


Figure 71 : Courbe de tendance polynomiale représentant l'évolution du ratio d'ADN tumoral circulant muté en fonction du temps, chez l'individu 19856, en vie et sans signe clinique (réalisation personnelle).

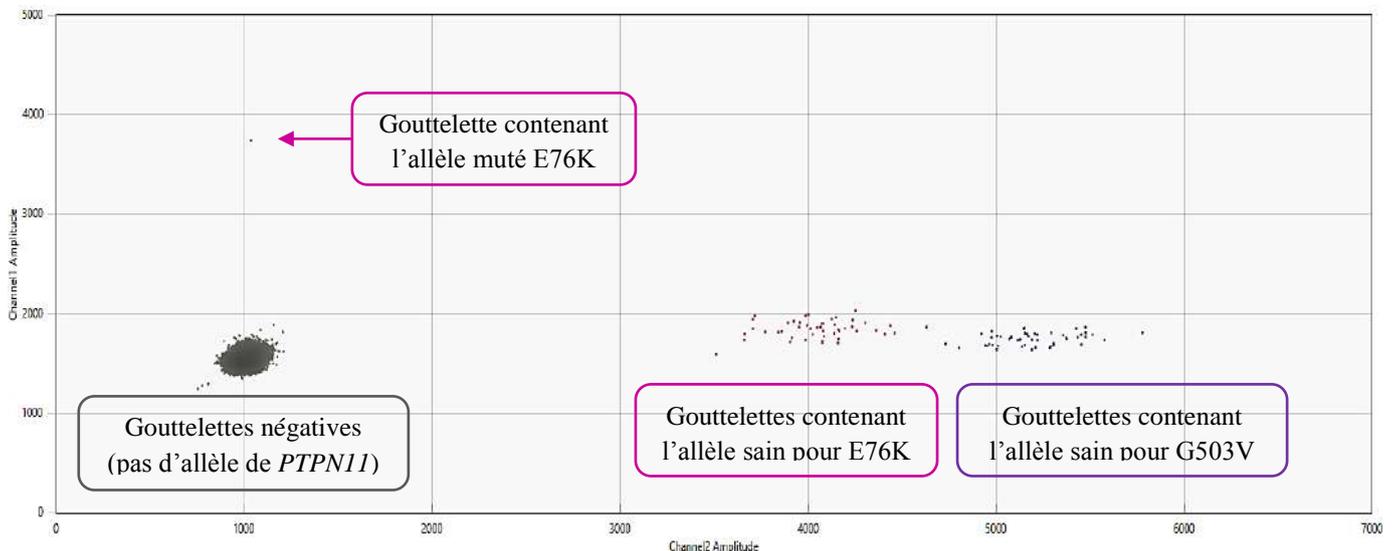


Figure 72 : Graphique de ddPCR sur l'échantillon plasmatique du 31/01/2023 (élution 2) de l'individu 19856 (en vie et sans signe clinique) montrant une gouttelette positive pour la mutation E76K.

Ainsi, pour ce chien, comme pour le cas 19963 décédé d'un SH hémophagocytaire, nous avons réalisé un **premier examen d'imagerie** tomodensitométrique pris en charge financièrement par LabOniris le **24/04/2023**, en ciblant les **régions thoracique et abdominale**. Comme pour la chienne 19963, le compte-rendu de l'examen (Dr Nora Bouhsina) n'a pas fait état de masses identifiables comme tumorales ; bien que l'imagerie splénique et intestinale ne **puisse pas exclure totalement l'hypothèse tumorale** :

- « **Splénomégalie diffuse homogène probablement consécutive à l'anesthésie**. Une infiltration tumorale est peu probable mais ne peut être totalement exclue. »
- « Structure liquidienne dans la région de la jonction **iléocolique** pouvant correspondre à un **nœud lymphatique kystique** ou une **anomalie pariétale** : à surveiller. »
- « **Légère lymphadénopathie jéjunale** probablement de nature réactionnelle. »

La réalisation du scanner à Oniris était également l'occasion de réaliser une nouvelle prise de sang, dont l'ADN tumoral circulant s'est avéré **négatif** pour la mutation E76K de *PTPN11* (Figure 71). De plus, des **nodules cutanés** ayant été remarqués, ils ont été cytoponctionnés, mais la plupart des frottis étaient non interprétables ou ne révélait que des cellules adipeuses.

Ce chien est toujours suivi actuellement, et un **deuxième examen d'imagerie** tomodensitométrique est **prévu le 30/10/2023** ; ce qui nous donnera l'opportunité d'obtenir un nouvel échantillon plasmatique de ce cas et de **poursuivre l'étude de la cinétique du taux de mutation** dans l'ADN tumoral circulant dans le plasma.

3.3.2. Un individu ayant présenté une mutation de *PTPN11* dans l'ADN circulant du plasma, mais décédé sans réalisation d'autopsie

Le troisième individu ayant présenté une mutation de *PTPN11* dans le dernier prélèvement plasmatique collecté lors des analyses ddPCR, alors qu'il était encore en vie, était le cas **19857**. Ce chien avait ses deux derniers prélèvements plasmatiques, en **mars et juin 2022**, présentant des **allèles mutants E76K**, à un taux de mutation respectif de **1% et 3%**. Comme pour le chien décrit ci-dessus (19856), deux éluions ont été analysées pour l'échantillon du 07/06/2022, mais cette-fois-ci les deux montraient une positivité pour la mutation E76K. Le résultat de ddPCR sur l'éluion 2 de l'extraction d'ADN est illustrée ci-dessous (Figure 73).

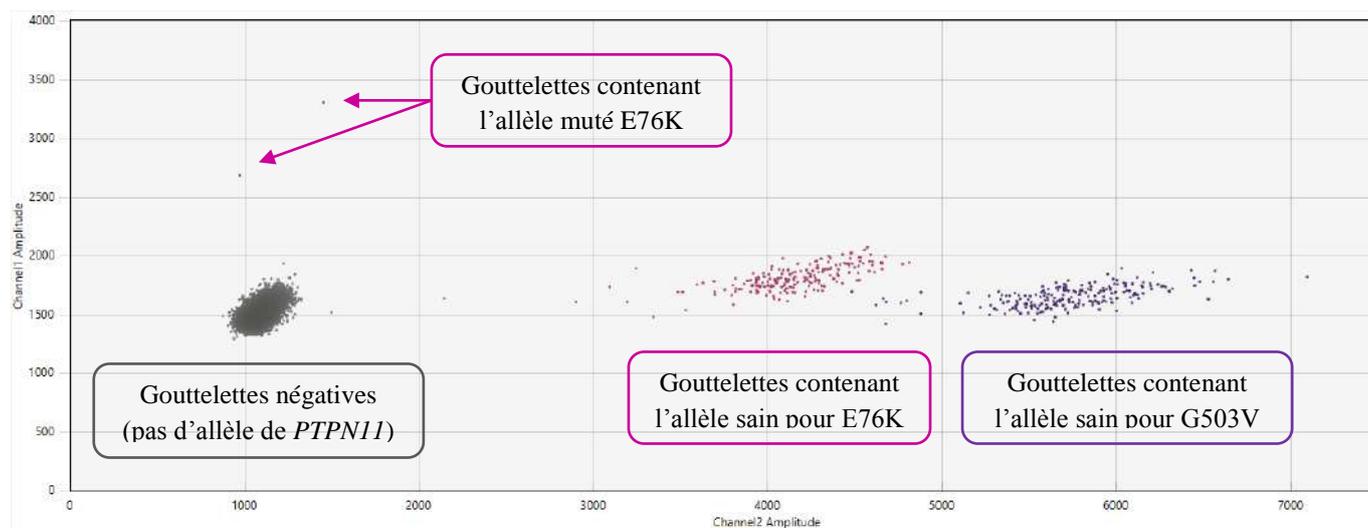


Figure 73 : Graphique de ddPCR sur l'échantillon plasmatique du 07/06/2022 (éluion 2) de l'individu 19857 (décédé sans autopsie) montrant deux gouttelettes positives pour la mutation E76K.

Ce chien n'a pas présenté de signes prodromiques neurologiques ou d'une autre atteinte organique ; pourtant il a **développé en février 2023 un syndrome vestibulaire**. Ces signes neurologiques peuvent être **compatibles avec un SH de localisation encéphalique**, des cas ayant déjà été rapportés, comme dans notre cohorte : cas du chien **19967** décédé d'un SH disséminé avéré, ayant présenté avant son décès des **épisodes de tétanie musculaire avec amaurose** entre les crises, décubitus et polypnée. Des **métastases cérébrales** étaient suspectées mais cela n'a pu être vérifié, les **encéphales étant rarement prélevés à l'autopsie** par les vétérinaires traitants. Deux raisons principales expliquent l'absence d'autopsie du système neurologique : la difficulté à ouvrir la boîte crânienne, et la difficulté de distinguer

des nodules tumoraux, dont la couleur peut être proche de celle de l'encéphale (rosé ou jaune pâle) qu'à celles des autres organes abdominaux et thoraciques (rouge sombre, brun). En outre, demandant des compétences particulières, l'autopsie de l'encéphale est généralement un service payant, plus difficile à faire accepter dans le cadre de démarches bénévoles pour les projets de recherche.

3.3.3. Un individu ayant présenté une mutation de *PTPN11* dans l'ADN des cellules blanches, mais étant décédé d'un lymphome ganglionnaire B

Le chien **19959** (Figure 74) a présenté une **dégradation de l'état général en novembre 2022**, associée à une **adénomégalie rétromandibulaire**, qui s'est étendue aux nœuds lymphatiques **parotidiens, préscapulaires, poplités et axillaires** en décembre 2022. Il a été traité avec des anti-inflammatoires. Lors de cette visite chez le vétérinaire traitant, une numération formule sanguine a montré une **monocytose**, et les nuages de points associés aux leucocytes ont montré un empiètement du nuage de points des lymphocytes sur celui des monocytes. De plus, au frottis sanguin, les lymphocytes sont surreprésentés par rapport aux monocytes, ce qui suggère une sous-estimation de la lymphocytémie et donc une **lymphocytose masquée**. Ces examens complémentaires seraient **très en faveur d'un lymphome multicentrique en phase leucémique**. Quelques jours après, en janvier 2023, il développe un **œdème du fanon** (sous la gorge) par **défait de retour lymphatique** à casue de son adénomégalie. Cet œdème s'est bien résolu sous furosémide. Le 15/01/2023, suite à une **dégradation de son état général**, une euthanasie est décidée. Des cytoponctions ganglionnaires ont été réalisées et les lames ont été évaluées, confirmant le diagnostic de **lymphome, probablement de type B** (Figure 75). Les **mutations de *PTPN11* ont été recherchées** dans l'ADN extrait des cytoponctions ganglionnaires. Comme attendu par la spécificité des mutations de *PTPN11* pour le sarcome histiocytaire, **aucune mutation** n'a été retrouvée dans l'ADN de ce lymphome.

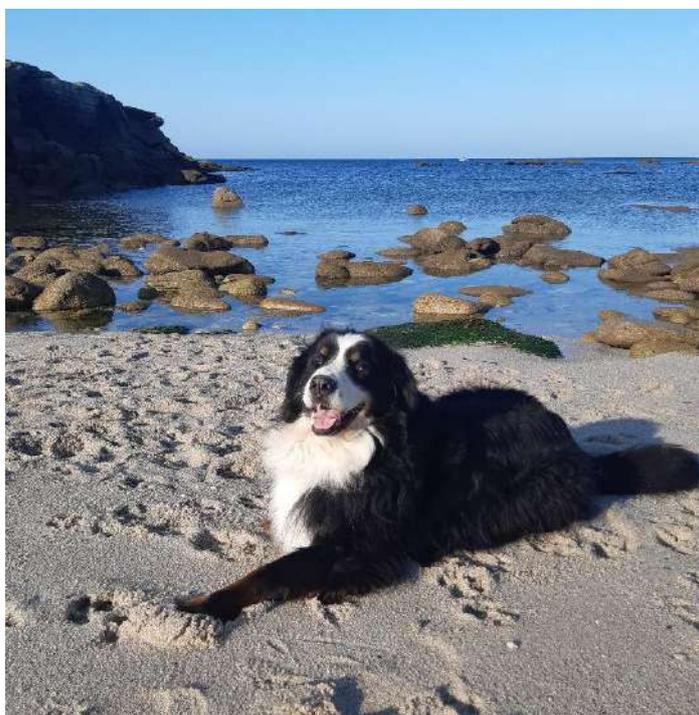


Figure 74 : Photographie du Bouvier Bernois 19959 (source : Mme Alexandra Vincent).

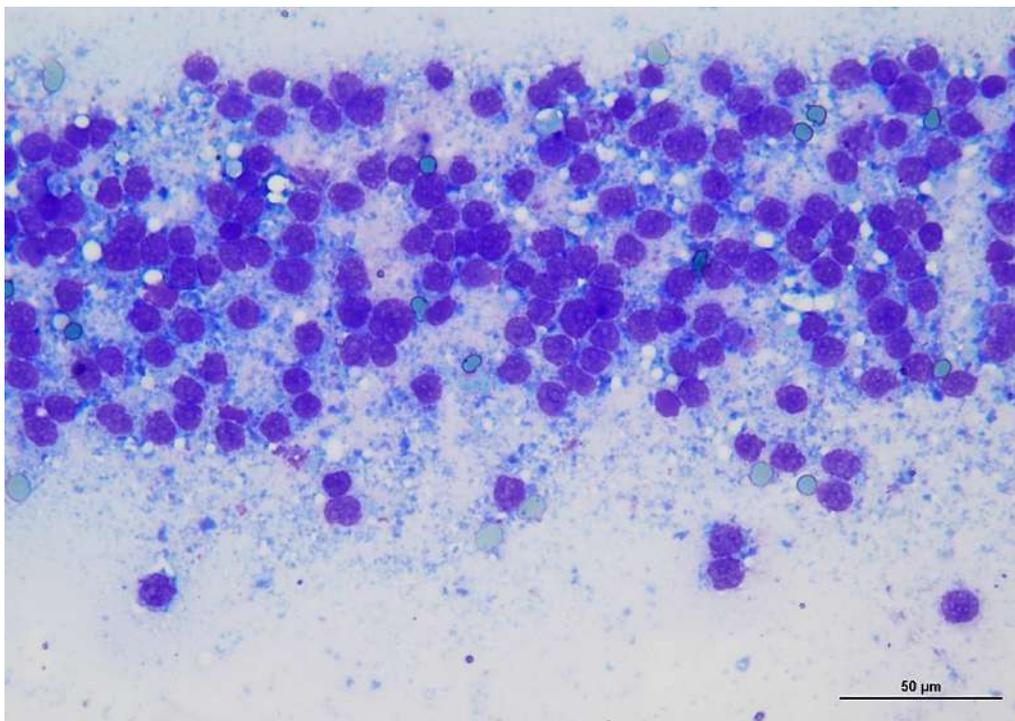


Figure 75 : Vue au microscope optique au grossissement 20 d'une coupe histologique colorée avec la coloration de Giemsa, de lymphocytes tumoraux caractéristiques d'un lymphome malin (cellules rondes, petites et nucléolées), issus d'une cytoponction ganglionnaire du chien 19959 (photographie : Jérôme Abadie, Oniris).

Chez ce chien, comme chez tous les autres individus de notre cohorte, le dernier prélèvement de plasma ainsi que le sang déplété en plasma associé ont été analysés en ddPCR. **Aucune mutation de *PTPN11* n'a été retrouvée dans l'ADN circulant** du plasma ; en revanche, **la mutation G503V a été retrouvée dans le sang** déplété en plasma, et ce résultat a été confirmé à deux reprises.

Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer la coexistence d'une mutation de *PTPN11* dans des cellules circulantes avec le lymphome de ce chien :

- Des **macrophages réactionnels** issus du lymphome pourraient avoir **acquis la mutation E76K** de *PTPN11*. En effet, d'après Hédan et *al.*, la moitié des cas de SH humains apparaîtraient dans un contexte de néoplasie lymphoïde ou myéloïde antérieure, tandis que la seconde moitié est considérée comme étant des proliférations primitives d'histiocytes [7]. Cependant, dans le cas de cellules pré-tumorales de sarcome histiocytaire associées au lymphome, la mutation aurait dû se retrouver dans l'ADN extrait des cytoponctions ganglionnaires du lymphome. Cette **hypothèse n'est donc pas privilégiée** ;
- Des **clones pré-tumoraux de sarcome histiocytaire**, mutés pour *PTPN11*, pourraient être mis en circulation dans le sang depuis les tissus et constituer ainsi une population de monocytes pré-tumoraux. Ces clones cellulaires peuvent avoir **acquis la mutation de *PTPN11* favorisant le développement et la prolifération incontrôlée de cellules histiocyaires**, mais **cela ne suffit pas à leur prolifération incontrôlée** en tant que cellules tumorales. En effet, les cellules **doivent acquérir dix principales propriétés** pour survivre, échapper au système immunitaire, et envahir les tissus (Figure 76) [243]. Il est possible qu'à la date du prélèvement sanguin, des clones pré-tumoraux circulaient dans le sang, mais que ceux-ci, n'ayant pas acquis toutes les

propriétés nécessaires à une cellule cancéreuse, **n'aient pas survécu ; ou bien ces clones constituaient les premières cellules mutées d'un SH en cours de développement** en parallèle du lymphome.

Cette seconde hypothèse semble plus plausible. Ainsi, des **clones pré-tumoraux issus de monocytes pourraient donc circuler dans le sang**. Néanmoins, une autre analyse, sur la **chienne 19963 atteinte d'un SH hémophagocytaire, n'est pas en faveur de cette hypothèse** de l'existence de monocytes pré-tumoraux. En effet, cette chienne ayant des prélèvements plasmatiques positifs pour la mutation G503V, nous nous sommes également intéressés aux prélèvements sanguins déplétés en plasma ainsi qu'aux culots cellulaires. Tous les échantillons de sang déplété en plasma ont été négatifs pour les mutations de *PTPN11*. Concernant les culots cellulaires, nous avons analysé le prélèvement le plus récent en notre possession lors de la phase d'analyses (soit celui du 20/03/2023). Pour **augmenter la sensibilité de détection de la mutation dans l'ADN des monocytes, le culot cellulaire a été trié pour isoler les monocytes grâce à la technique FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)**, permettant de purifier des populations cellulaires spécifiques en se basant sur leurs phénotypes, détectés par cytométrie en flux. Une fois les monocytes isolés, l'ADN en a été extrait et a été analysé par ddPCR ; mais aucune mutation de *PTPN11* n'a été retrouvée. Les clones pré-tumoraux mutés ne seraient donc pas des monocytes circulants.

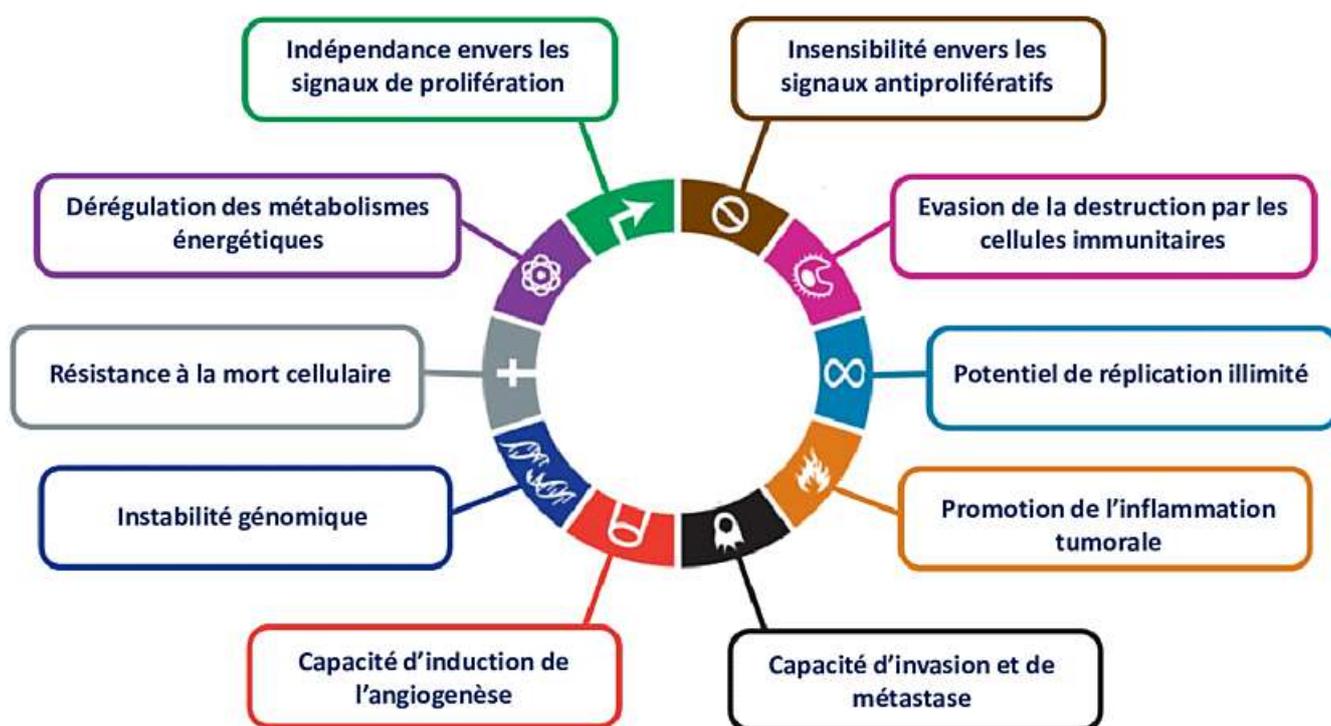


Figure 76 : Caractéristiques phénotypiques des cellules cancéreuses : les caractéristiques des cellules tumorales acquises au cours de leurs mutations. D'après Hanahan et Weinberg, Cell, 2011.

3.4. Exploitation des réponses au questionnaire évaluant l'intérêt du test auprès des propriétaires de Bouviers Bernois

Pour étudier les perspectives de cette étude, nous avons construit un questionnaire (Annexe 10) à destination des propriétaires de Bouvier(s) Bernois. Aussi bien les personnes ayant eu un Bouvier Bernois que celles en ayant un ou plusieurs, encore aujourd'hui, étaient invitées à répondre à ce questionnaire.

Pour diffuser notre questionnaire à un grand nombre de personnes, en essayant de cibler tout âge et toute catégorie socio-professionnelle, afin d'avoir un échantillon le plus représentatif possible, nous avons utilisé différents moyens de communication :

- **Listes de diffusion par mail d'Oniris VetAgroBio Nantes - École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation**, permettant d'avoir des réponses **d'étudiants** mais aussi **d'employés ou cadres** travaillant sur les deux sites de l'école.
- **Réseaux sociaux :**
 - o **Groupe privé des étudiants de l'école vétérinaire**, permettant de multiplier les supports de diffusion mais aussi d'inciter les étudiants à **transmettre** le questionnaire à leur **famille**, leurs **amis ou connaissances** ayant un ou plusieurs Bouviers Bernois.
 - o **Groupe privé « BOUVIERS BERNOIS DE FRANCE »** : diffusion à de nombreux **propriétaires ou éleveurs** de Bouviers Bernois, grâce à un particulier ayant répondu au préalable au questionnaire.
- Diffusion via un membre du **comité de l'AFBS** (Association Française des Bouviers Suisses) : le comité ayant **refusé** de communiquer ce questionnaire à tous les adhérents, nous n'avons pas pu obtenir autant de réponses d'éleveurs que voulu, afin d'avoir un échantillon plus représentatif des propriétaires de Bouviers Bernois incluant particuliers et éleveurs.

Au total, **311 réponses** ont pu être cumulées. Nous avons réussi à avoir un échantillon de la population de propriétaires de Bouviers Bernois assez représentatif, avec répartitions assez équilibrées entre les différentes tranches d'âge et catégories socio-professionnelles (Figure 77, Figure 78).

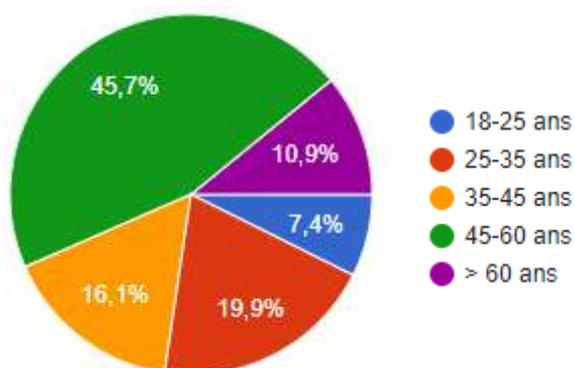


Figure 77 : Répartition des participants selon leur tranche d'âge. Google Forms.

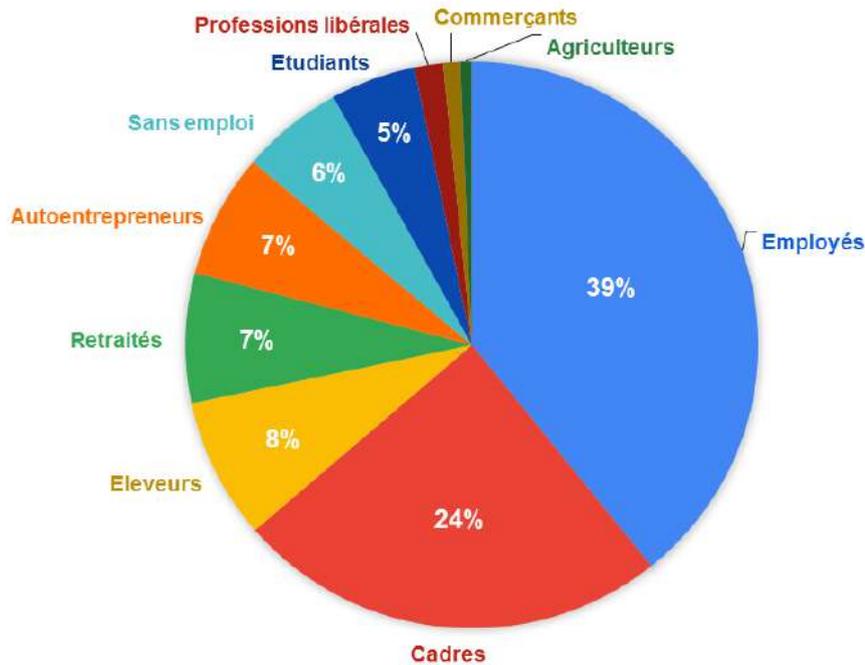


Figure 78 : Répartition des participants selon leur catégorie socio-professionnelle (réalisation personnelle).

La **majorité** des personnes ayant répondu à ce questionnaire sont des **particuliers**, seuls **8% d'éleveurs** ont participé à ce sondage. Ainsi, les trois quarts de la population ayant répondu ne possédaient qu'un seul Bouvier Bernois. Par ailleurs, la **médicalisation** des Bouviers Bernois par les propriétaires ayant répondu est assez **importante** : **plus de 80%** d'entre eux vont régulièrement chez leur vétérinaire traitant pour les rappels vaccinaux ou achats d'antiparasitaires, et 15% n'y vont qu'en cas de problème de santé majeur.

Afin d'estimer l'expérience des propriétaires de Bouviers Bernois entre leur(s) chien(s) et le cancer, les questions suivantes ont été posées :

- « Avez-vous déjà eu un Bouvier Bernois décédé d'un cancer ? »
- « Si oui, de(s) quel(s) cancer(s) est (sont)-il(s) décédé(s) ? »

Il est intéressant de remarquer que les **données obtenues ici sont semblables à celles de la littérature** mentionnées dans la partie bibliographique : les Bouviers Bernois sont une race pour laquelle les **cancers sont la première cause de décès** (43%) ; et dans ces différents cancers, le **sarcome histiocytaire est majoritaire (la moitié des cas ici)** (Figure 79). Cependant, il est possible qu'il y ait un **biais** vis-à-vis de ces réponses : les personnes les plus sensibilisés au cancer et notamment au sarcome histiocytaire sont probablement celles ayant déjà vécu avec un chien atteint ; ces personnes auraient donc pu avoir davantage tendance à répondre au questionnaire, car ils se sentaient concernés par le sujet.

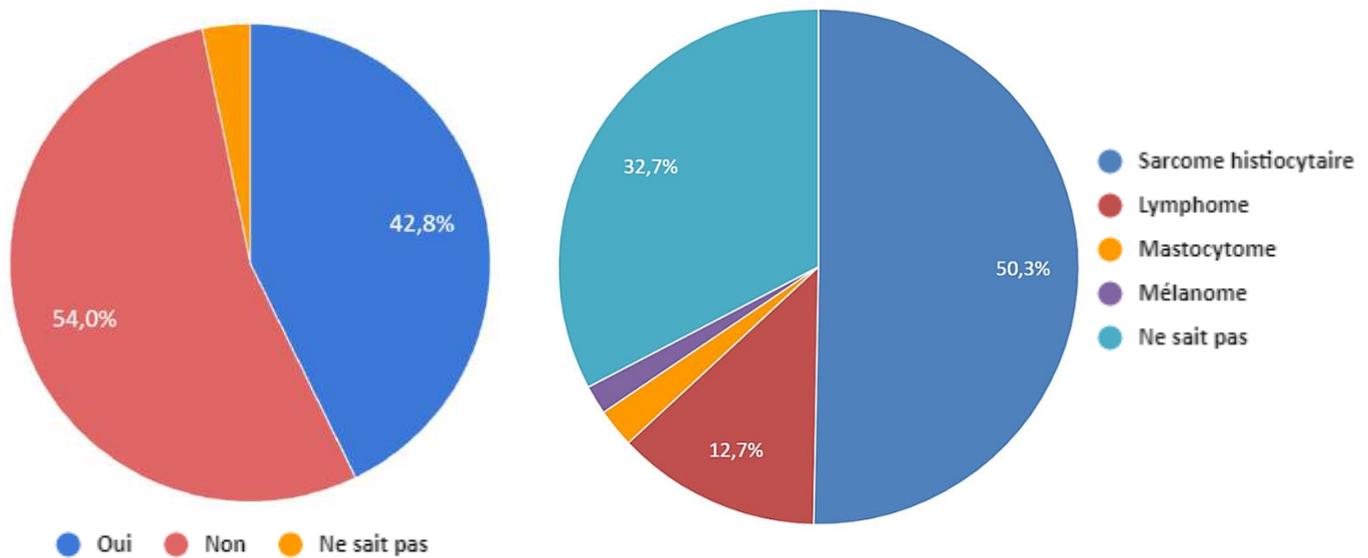


Figure 79 : Répartition des propriétaires de Bouviers Bernois : selon s'ils savent si un de leurs Bouviers Bernois est décédé d'un cancer (à gauche) ; et si oui, répartition des cancers selon leur nature (à droite) (réalisation personnelle).

Le **test de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire** en lui-même était ensuite abordé dans le questionnaire. Après explication du concept de ce test, la **majorité (90%) des personnes seraient prêtes à l'utiliser**. L'espérance de vie moyenne du Bouvier Bernois, son âge moyen au diagnostic du sarcome histiocytaire et la durée de survie moyenne après diagnostic de ce cancer ont été fournis, afin que les propriétaires puissent répondre à la question suivante en connaissance de cause : « À partir de quel âge seriez-vous prêts à tester votre chien ? ». Leurs réponses semblent montrer une **forte motivation** et implication ; en effet, **plus de la moitié des propriétaires seraient prêts à tester leur chien dès 2 à 4 ans d'âge** (Figure 80).

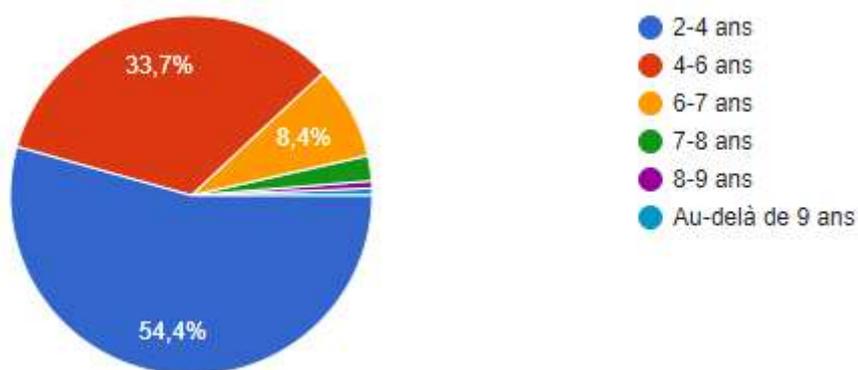


Figure 80 : Répartition des réponses de propriétaires de Bouviers Bernois, selon l'âge à partir duquel ils seraient prêts à effectuer le test de diagnostic précoce sur leur chien. Google Forms.

Concernant le coût de ce test, nous l'avons **estimé à environ 40 euros**, en cumulant le coût des kits d'extraction, les matériels et réactifs nécessaires pour la ddPCR. Nous n'avons **pas pris en compte le coût de la main d'œuvre** ni celui de la **prise du sang** chez le vétérinaire traitant pour le propriétaire.

Sans mentionner cette estimation, nous avons proposé différentes tranches de prix de ce potentiel test aux propriétaires de Bouviers Bernois, afin de **savoir si financièrement, le test pourrait, d'une part être accepté, et d'autre part être rentable**. Le **tiers** des propriétaires envisagent un coût de **20 à 40 euros** tandis qu'un **second tiers** est prêt à investir **40 à 60 euros** dans le test. Nous avons classé leurs réponses selon leur catégorie socio-professionnelle, afin de voir si une corrélation était visible. La répartition des réponses de tranches de prix acceptées selon la catégorie socio-professionnelle est assez homogène, globalement **les propriétaires sont prêts à engager les mêmes moyens financiers, quelle que soit leur catégorie socio-professionnelle** (Figure 81).

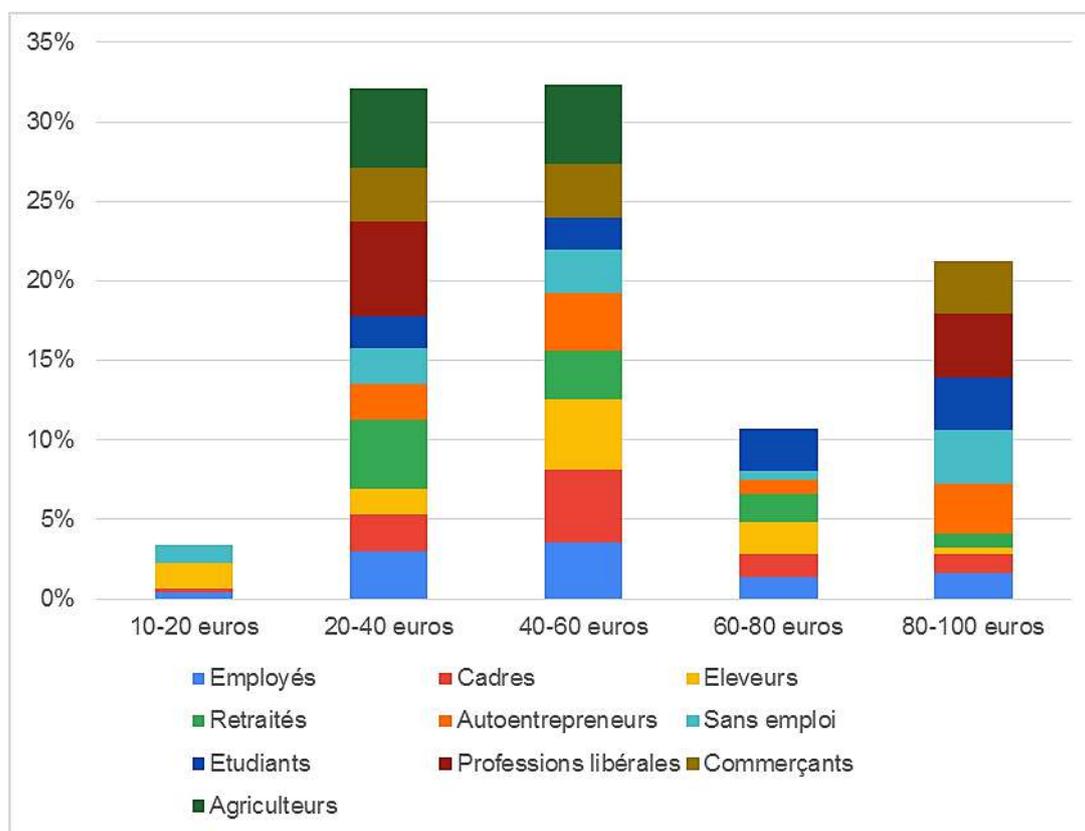


Figure 81 : Répartition des propriétaires de Bouviers Bernois selon le coût qu'ils seraient prêt à investir dans le test de diagnostic précoce, en fonction de leur catégorie socio-professionnelle (réalisation personnelle).

Toujours concernant le coût de ce test, nous avons essayé de savoir si la fréquence de réalisation du test par les propriétaires serait variable selon le coût proposé. Ainsi, nous avons proposé trois prix différents (20, 50 et 80 euros) en demandant, pour chacun de ces prix, à quelle fréquence les propriétaires de Bouviers seraient prêts à réaliser le test. Les **réponses sont assz homogènes pour les trois prix proposés** : ainsi, pour chaque prix, **environ la moitié des propriétaires est prête à réaliser le test tous les ans**, un tiers est prêt à le réaliser tous les six mois ; ce dernier chiffre descendant à un quart lorsque le prix proposé est de 50 euros (Figure 82) et à un cinquième si le test est à 80 euros.

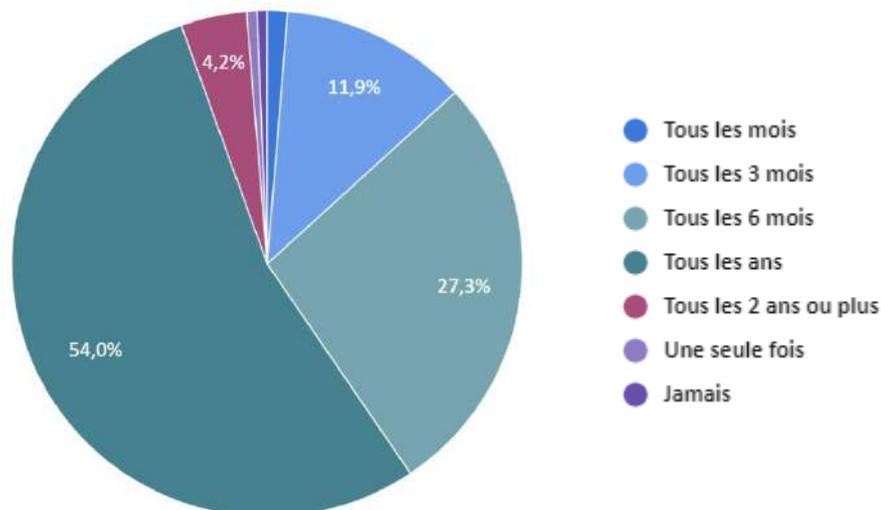


Figure 82 : Répartition des propriétaires de Bouviers Bernois selon la fréquence à laquelle ils réaliseraient le test si son coût était de 50 euros (réalisation personnelle).

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux démarches que les propriétaires de Bouviers Bernois envisageraient de faire si le test est positif, c'est-à-dire si une mutation de *PTPN11* est présente dans l'ADN circulant du plasma, indiquant un développement potentiel de sarcome histiocytaire, dans un avenir proche, mais avec un délai inconnu. Nous avons donc **proposé différents examens complémentaires aux propriétaires** : radiographies ou échographie seulement, radiographies et échographie avec ou sans scanner, et enfin un de ces examens d'imagerie associé à un diagnostic de certitude par histologie sur biopsie ou cytoponction. La motivation des propriétaires semble très importante, **la majorité souhaitant aller jusqu'au diagnostic de certitude (Figure 83)** ! Encore une fois, les réponses sont peut-être **biaisées**, les propriétaires ayant répondu étant certainement ceux qui ont déjà eu de mauvaises expériences avec le cancer de leur chien dans le passé.

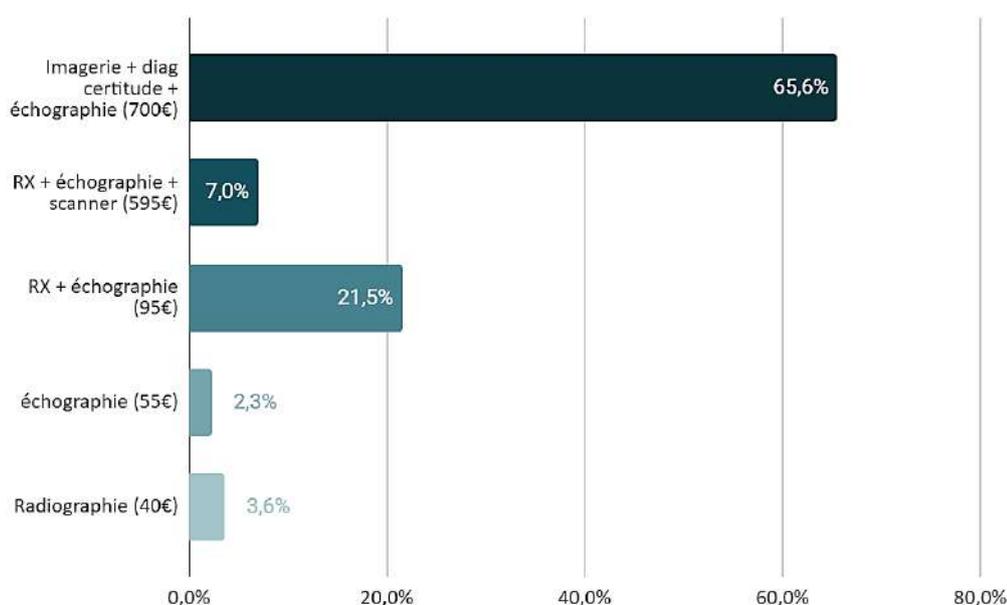


Figure 83 : Répartition des propriétaires de Bouviers Bernois selon les examens complémentaires qu'ils seraient prêts à réaliser si le test de diagnostic précoce est positif (réalisation personnelle).

Selon les résultats des examens complémentaires, deux questions sont amenées à être posées aux propriétaires de Bouviers Bernois :

- « Si le(s) examen(s) complémentaire(s) révèle(nt) effectivement la présence d'une tumeur, seriez-vous prêts à engager une solution thérapeutique ? »

Pour cette question, nous avons proposé les options thérapeutiques actuellement envisageables en cas de diagnostic ou suspicion de sarcome histiocytaire : chirurgie pour un SH localisé sur un organe et non métastasé, radiothérapie, ou chimiothérapie. **Beaucoup de propriétaires** ont commenté cette question en précisant que **tout dépendait du bénéfice apporté au chien** en matière d'amélioration de la survie et du confort de vie si une thérapie était engagée, avec les effets secondaires potentiels qu'elle implique. Nous avons donc réparti ces réponses dans la catégorie « Selon les bénéfices apportés ». Les réponses sont globalement en corrélation avec les réponses précédentes : une grande motivation et implication des propriétaires de Bouviers Bernois sont observées, **une majorité étant prête à faire le maximum possible** pour traiter leur chien (Figure 84).

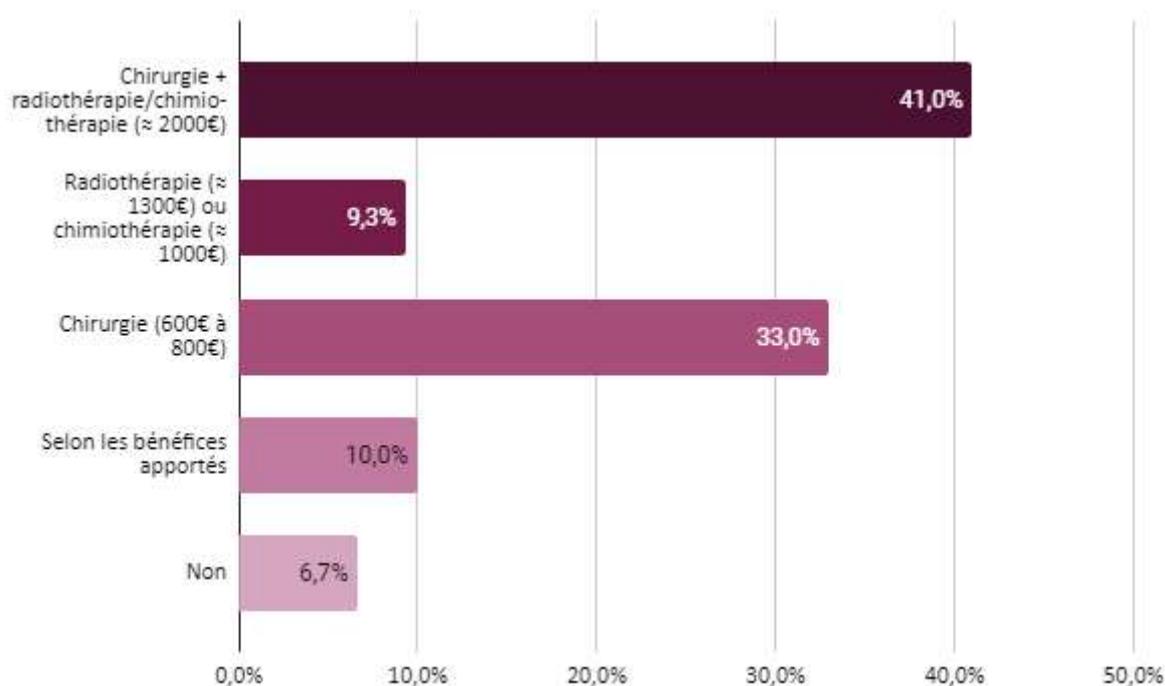


Figure 84 : Solutions thérapeutiques que les propriétaires de Bouviers Bernois sont prêts à engager si les examens complémentaires révèlent une tumeur (réalisation personnelle).

- « Si le(s) examen(s) complémentaire(s) ne révèle(nt) pas de tumeur, bien que le test de diagnostic précoce soit positif, à quelle fréquence seriez-vous prêts à reproduire des examens complémentaires pour détecter le développement d'une tumeur ? »

Pour cette question, nous avons comparé les réponses avec celles obtenues pour la fréquence de réalisation du test si son coût est de 50 euros. On observe que, si le premier test de diagnostic précoce est positif et que les examens complémentaires ne révèlent pas de processus tumoral, les propriétaires sont prêts à réaliser de nouveaux examens complémentaires à une fréquence plus importante (tous les mois, tous les trois mois ou tous les

six mois) que pour la réalisation de tests de diagnostic précoce ultérieurs, si le premier test est négatif. Ces réponses sont cohérentes avec la motivation des propriétaires à soigner au mieux leurs chiens : **si la suspicion est plus importante (test de diagnostic précoce positif), ils sont prêts à faire un suivi plus rapproché de leur chien** (Figure 85).

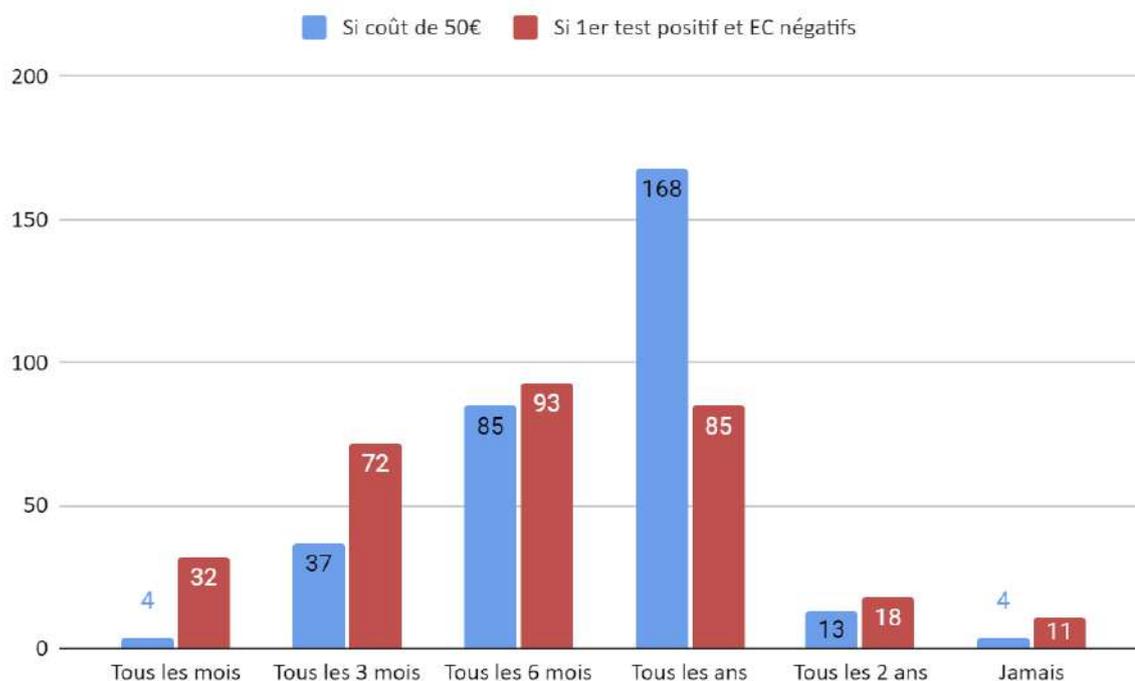


Figure 85 : Comparaison de la fréquence souhaitée de réalisation du test de diagnostic précoce si le premier test est négatif (et a un coût de 50 euros) (en bleu) ; et de la fréquence de réalisation d'examens complémentaires si le test de diagnostic précoce s'avère positif (réalisation personnelle).

Enfin, deux dernières questions étaient proposées afin de savoir si les participants souhaitaient avoir des nouvelles de l'étude ou y participer. Une grande majorité, soit **80% des participants souhaitent avoir des nouvelles de l'étude**, cela est également ressorti dans les commentaires écrits en fin de questionnaire : **plusieurs propriétaires estiment qu'ils ne sont pas assez informés** sur le sujet du sarcome histiocytaire, les thérapies possibles ou futures, ainsi que les projets de recherche en cours sur ce cancer. En revanche, seulement la moitié des participants seraient prêts à participer à cette étude, bien qu'il y ait le biais de réponse d'anciens propriétaires de Bouviers Bernois, qui ont aujourd'hui perdu leur chien.

En résumé, nous avons constaté que **la plupart des propriétaires sont très motivés** pour ce projet de recherche, et seraient prêts à réaliser ce test de diagnostic précoce. En revanche, beaucoup ont précisé que leurs **réponses n'étaient valables que si une prise en charge précoce et spécifique était possible pour améliorer la survie du chien**, sans dégrader sa qualité de vie. Sinon, ils estiment que réaliser ce test n'a pas grand intérêt, autre que celui de savoir que le chien va développer un sarcome histiocytaire à une date inconnue mais possiblement proche ; ce test consisterait alors une « **épée de Damoclès** » au-dessus de leur chien et serait davantage **anxiogène** que bénéfique pour la vie de leur Bouvier Bernois. C'est pourquoi il y aurait tout intérêt à **développer une thérapie ciblée, spécifique** et avec **moins d'effets secondaires néfastes** pour l'animal que les thérapies classiquement utilisées aujourd'hui.

4. Discussion

4.1. Discussion sur les méthodes utilisées

Concernant les méthodes utilisées dans cette étude expérimentale, plusieurs points pourraient être discutés, tels que le choix de notre cohorte (Bouvières Bernois d'élevage uniquement, dans une même région donc environnement similaire, sur une durée de deux ans seulement...), le choix des méthodes analytiques, notamment des kits d'extraction utilisées ou encore le choix de la ddPCR pour la détection des mutations. Nous nous sommes concentrés sur **trois axes principaux : l'étape d'extraction de l'ADN** dans les échantillons plasmatiques, la **sensibilité de notre test de diagnostic** précoce liée au choix de détection des mutations du gène *PTPN11* seulement ; et enfin la **spécificité de notre test de détection** et le problème de définition d'un seuil de faux positifs.

4.1.1. L'impact de l'étape d'extraction de l'ADN circulant dans le plasma sur la sensibilité de la ddPCR

L'ADN circulant dans le plasma est présent en **faible quantité**, et l'ADN tumoral circulant y est encore davantage dilué. Lors des manipulations en laboratoire, il y a un **risque de contaminations par les DNases** (désoxyribonucléases, enzymes hydrolysant l'ADN), ce qui peut diminuer encore la quantité de matériel présent. Cependant, en comparaison avec les techniques d'extraction et de détection de l'ARN, l'ADN est lui plus stable, moins sensible à l'oxydation et les DNases sont moins ubiquitaires que les RNases (ribonucléases, enzymes hydrolysant l'ARN) [19].

De plus, la **demi-vie de l'ADN circulant dans le plasma *in vivo*** est connue et est de cinq heures environ (élimination par les organes de filtration, notamment les reins) ; cependant sa **demi-vie dans le plasma prélevé et conservé dans un tube sec n'est pas connue**. Ainsi, il est possible que si des extractions d'ADN ont été faites trop tardivement après prélèvement, des fragments d'ADN ont pu se dégrader, diminuant la possibilité de détecter une mutation le cas échéant. Cela **pourrait engendrer des faux négatifs lors des analyses par ddPCR**. Pour étudier cette problématique de demi-vie de l'ADN dans un échantillon plasmatique, il est envisagé de **procéder à des extractions et dosages d'ADN à différents instants, sur un même échantillon plasmatique**, afin de voir si il y a une perte ou non de matériel corrélée avec le temps écoulé après prélèvement du plasma.

Enfin, un **problème** qui a été rencontré à plusieurs reprises dans l'analyse de nos résultats est celui des **inhibiteurs de l'enzyme de PCR**, la Taq polymérase. Ces inhibiteurs correspondent notamment à des **sels ou solvants** persistants après élution de l'ADN (dernière étape du protocole d'extraction de l'ADN plasmatique). À plusieurs reprises, nous avons pu observer des **profils de graphiques de ddPCR différents selon l'élution** utilisée pour l'analyse. Ainsi, comme mentionnée dans la sous-partie 3.3.1, l'individu 19856 présentait un prélèvement plasmatique négatif pour la mutation E76K à l'élution 1, mais positif à l'élution 2. Cela peut s'expliquer par une **présence moindre des inhibiteurs dans l'élution 2**. Ainsi, les **inhibiteurs pourraient engendrer des faux négatifs**, si la quantité d'ADN muté est très faible. En effet, à des valeurs plus importantes, les **inhibiteurs semblent simplement décaler le profil du graphique de ddPCR vers le bas**, c'est-à-dire que l'amplitude entre les gouttelettes contenant l'allèle muté et celles contenant l'allèle sain est diminué. De plus, l'élution 2 contient moins de matériel génomique, ce qui peut modifier les ratios d'ADN muté obtenus.

Cela peut s'illustrer grâce aux prélèvements plasmatiques de la chienne 19963 (décédée d'un SH hémophagocytaire) du 18/10/2022 et du 31/01/2023. Deux éluions de chacun de ces deux prélèvements ont été analysées par ddPCR. Les ratios d'ADN muté obtenus sont proches, et les intervalles de confiance se recourent, ce qui reste cohérent pour deux répliquats biologiques (Figure 86). Cependant, la différence observée entre les valeurs moyennes de chaque ratio peut expliquer qu'à un taux de mutation très faible, l'éluion 1 soit négative en raison d'une quantité trop importante d'inhibiteurs, malgré une quantité d'ADN supérieure à l'éluion 2 ; et que seule l'éluion 2 soit retrouvée positive comme dans le cas du chien 19856. La translation vers le bas du profil du graphique de ddPCR par les inhibiteurs est aussi illustrée avec le prélèvement du 31/01/2023 de la chienne 19963, où on voit que l'éluion 2 présente des gouttelettes (contenant un allèle sain ou muté) à une amplitude supérieure et dans un nombre moindre que dans le graphique de l'éluion 1 (Figure 87). Ainsi, les inhibiteurs diminueraient la sensibilité de la ddPCR.

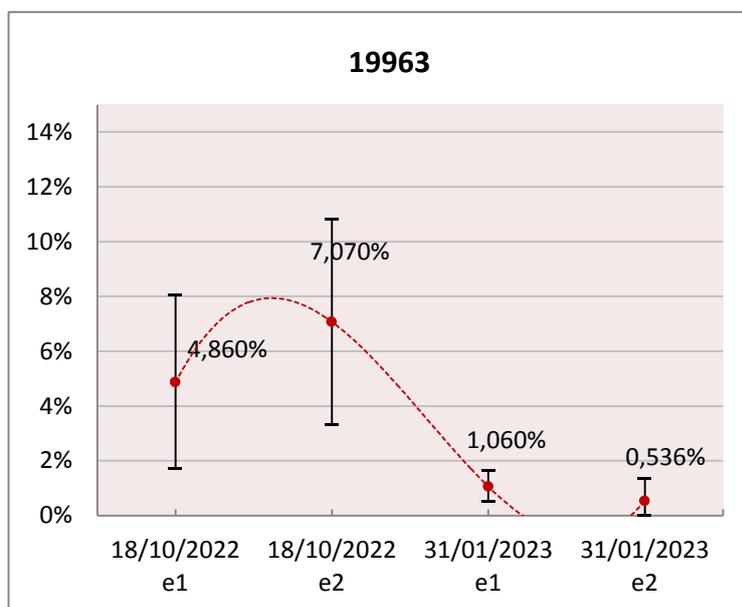


Figure 86 : Illustration de la différence de résultats obtenus selon les éluions, pour deux prélèvements plasmatiques à des dates différentes chez la chienne 19963 (réalisation personnelle).

e1 : éluion 1 ; e2 : éluion 2 de l'extraction d'ADN plasmatique.

Pour les travaux expérimentaux futurs, il serait également intéressant de tester des kits différents d'extraction de l'ADN plasmatique afin de voir si la quantité et l'impact des inhibiteurs peut être diminuée, et ainsi améliorer la reproductibilité des nos analyses.

Il serait aussi envisageable de réaliser des PCR quantitatives de différentes éluions d'ADN plasmatique extrait, avant de réaliser les ddPCR, plus complexes (mais plus coûteuses). Cela permettrait de savoir si l'ADN est détecté en quantité assez importante selon les éluions et malgré la présence d'inhibiteurs, avant de réaliser la ddPCR pour l'échantillon concerné.

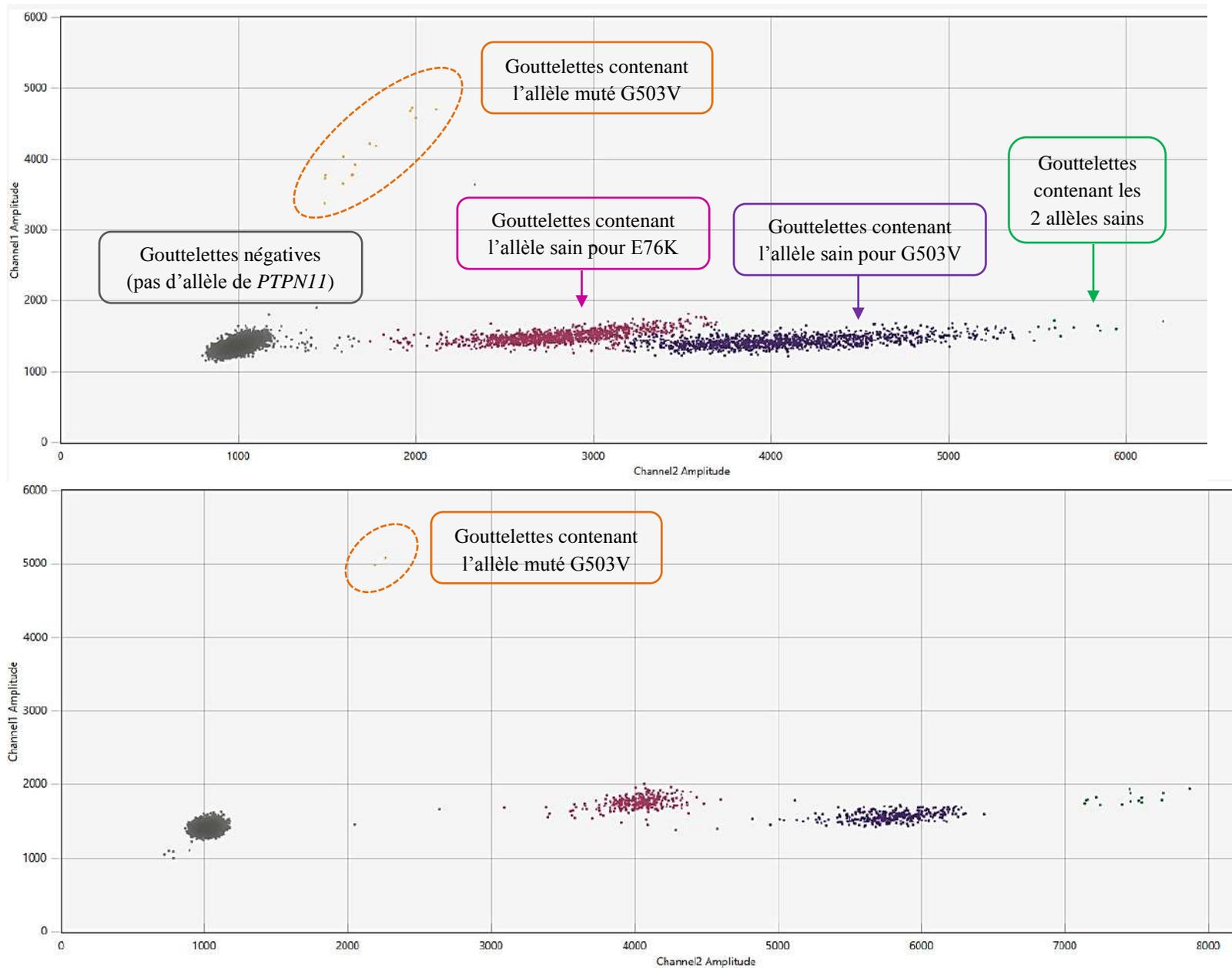


Figure 87 : Graphiques de ddPCR des éluions 1 (en haut) et 2 (en bas) de l'échantillon plasmatique du 31/01/2023 de la chienne 19963 (réalisation personnelle).

4.1.2. Augmenter la sensibilité de la détection du sarcome histiocytaire en recherchant d'autres mutations, sans en diminuer la spécificité

Comme décrit dans la partie bibliographique, les **mutations détectées dans le sarcome histiocytaire** semblent être **exclusives**, aussi bien pour les mutations d'un même gène que pour des mutations de gènes différents [2], [7]. Ainsi, nous pourrions détecter plus de 50% des sarcomes histiocytaires des Bouviers Bernois si nous **associons à notre test la recherche de mutations d'autres gènes**, tels que :

- **TP53** (*Tumor Protein 53* :protéine tumorale 53),
- **PDGFRB** (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor* : récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes),
- **SH3KBP1** (*SH3 domain containing kinase binding protein 1* : protéine 1 de liaison à la kinase contenant le domaine SH3, une protéine adaptatrice dans les voies de signalisation) [9],
- **KRAS** (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*),
- **BRAF** (B-Raf proto-oncogène) [2].

Des **tests de diagnostic précoce de plusieurs cancers sur biopsie liquide** (prise de sang), **recherchant différentes mutations** sont déjà à l'étude en oncologie vétérinaire, et déjà utilisés en médecine humaine. Ces tests de détection multi-cancers (**MCED** : *Multi-Cancer Early Detection*) promettent d'augmenter considérablement la détection précoce de cancers chez les patients humains. Le **premier test MCED** à avoir été approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) peut détecter plus de **cinquante types de cancers** distincts avec un taux de faux positifs inférieur à 1%. Il a été **commercialisé en juin 2021** pour une utilisation **chez l'homme** et est disponible aux États-Unis, sur prescription uniquement, et à destination des patients de plus de 45-50 ans [3], [244].

Dans l'étude de Flory *et al.*, nommée **CANDiD** (*CANcer Detection in Dogs*), un **test de diagnostic précoce multi-cancer a été testé chez 1100 chiens**. Dans l'ensemble, le test de biopsie liquide a démontré une sensibilité de 54,7% ; et pour trois des cancers canins les plus agressifs (lymphome, hémangiosarcome, ostéosarcome), le taux de détection était de 85,4%. Globalement, le test s'est révélé positif pour **trente types de cancers distincts**, dont plusieurs cancers hématologiques. Il a permis une détection d'un cancer avant l'apparition de signes cliniques chez **quatre individus**, ce qui montre une nouvelle fois l'intérêt de la biopsie liquide pour une **détection précoce**. La méthode de détection utilisée dans cette étude était le séquençage haut-débit par la technique de la société **Illumina**, une technique de séquençage nouvelle génération (NGS : *Next Generation Sequencing*) [3].

Cependant, il faut être prudent par rapport à la réalisation d'un test de diagnostic, **le risque de surdiagnostic (faux positifs)** étant présent lorsque de nombreux cancers sont recherchés par détection de multiples mutations [22]. Il est donc aussi important, **dans notre test de diagnostic précoce** par ddPCR, de bien **définir un seuil** en nombre de gouttelettes sur le graphique de ddPCR, **en dessous duquel un individu doit être considéré comme négatif** pour la mutation concernée. La comparaison avec des témoins positifs et négatifs pour la mutation concernée est elle aussi fondamentale pour bien définir ce seuil. Il serait également envisageable de confirmer chaque mutation détectée par un séquençage de Sanger, bien que cette technique soit beaucoup moins sensible. En effet, dans notre étude, un séquençage de Sanger avait été réalisé sur l'ADN circulant du plasma pour les premiers chiens décédés d'un sarcome histiocytaire muté (19967 et 19965). Il s'était révélé négatif, bien que nous détections la mutation E76K de *PTPN11* à faible taux par ddPCR. Cette méthode de confirmation est donc en suspens, sachant que certaines études l'utilisent pour les cas les plus ambigus [7], [8], [138].

4.2. Discussion sur les résultats

Deux des principales interrogations soulevées par nos résultats expérimentaux sont la **localisation préférentielle** des sarcomes histiocytaires de nos cas aux **poumons**, et non à la rate ; et la **variabilité de la quantité d'ADN tumoral circulant muté** retrouvée dans le plasma **selon les dates de prélèvements**. De plus, les résultats de notre sondage auprès des propriétaires de Bouviers Bernois ont révélé une grande motivation à utiliser ce test de diagnostic précoce s'il est un jour commercialisé ; mais cet intérêt est à nuancer avec les commentaires, précisant que **ce test ne serait intéressant que s'il y avait un moyen d'allonger considérablement l'espérance de vie** des Bouviers Bernois atteints de sarcome histiocytaire. C'est dans cette optique que nous allons aborder brièvement les **thérapies ciblées** étudiées pour les mutations de *PTPN11*.

4.2.1. Localisation préférentielle des sarcomes histiocytaires de notre cohorte aux poumons

Cette **localisation préférentielle du SH aux poumons** dans notre cohorte, et non à la rate, peut avoir plusieurs explications ; nous avons ainsi formulé quelques **hypothèses** :

- Le **test génétique SH** est utilisé par les deux élevages sur leurs Bouviers Bernois, afin de mieux diriger la reproduction. Cette pratique semble **limiter l'incidence du SH**, ou du moins **retarder son apparition**, comme nous l'avons vu dans la description de la cohorte, où nous trouvons un âge moyen au diagnostic plus tardif que les valeurs rapportées dans la littérature. Cela pourrait s'expliquer par une **fréquence moindre des allèles prédisposants au SH**, grâce aux accouplements dirigés selon les résultats du test SH. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'une **présence importante d'allèles prédisposants au SH pourrait être corrélée à la localisation préférentielle du SH dans la rate**. Moins un chien présenterait d'allèles prédisposants, moins il aurait de risque de développer un SH de localisation splénique, et moins il aurait de risque de développer un SH précocément.
- Une **seconde hypothèse** expliquant cette localisation préférentielle du SH dans notre cohorte est liée à **l'état primitif ou secondaire des SH pulmonaires**. En effet, dans ce cancer, les **métastases pulmonaires sont fréquentes** et nous ne pouvons savoir dans nos cas si les tumeurs pulmonaires identifiées sont primitives ou secondaires, à l'exception de l'individu **20272**.
En effet, comme indiqué dans le **Tableau XIX**, ce chien présentait une tumeur **pulmonaire et une hépatique**, or **chaque tumeur comporte une mutation différente**, respectivement E76K et G503V. La littérature montrant que deux mutations ne semblent pas pouvoir coexister au sein d'une même tumeur, cela signifie que ces deux tumeurs se sont développées indépendamment l'une de l'autre et qu'elles sont toutes les deux primitives. Nous avons donc ici la **certitude d'avoir un SH pulmonaire primitif**.
Des études, ayant montré également que deux lésions tumorales peuvent présenter deux mutations différentes, ont comparé les individus présentant des lésions tumorales pulmonaires et spléniques. Chez environ 20% de ces individus, les deux tumeurs présentaient des mutations différentes, il y aurait donc **au moins 20% de tumeurs pulmonaires primitives**, tandis que la **majorité (80%)** des tumeurs pulmonaires présentait la même mutation que la rate, et

pouvaient donc potentiellement n'être que des métastases pulmonaires [7], [230]. Le biais des métastases pulmonaires pourrait donc expliquer la surreprésentation de lésions tumorales pulmonaires dans nos cas.

- Une **troisième hypothèse**, plus simple, serait d'expliquer cette différence de localisation préférentielle avec la littérature par le **faible effectif** de chiens atteints de SH étudiés dans notre travail. Cette différence pourrait donc être estompée par une étude sur une cohorte plus large.

4.2.2. Variabilité de la quantité d'ADN tumoral circulant (ADNtc)

Nos observations dans la sous-partie 3.2.2, sur les résultats des ddPCR sur les échantillons plasmatiques, ont montré une **fluctuation importante de la quantité d'ADN tumoral circulant muté**, qui n'est donc pas corrélée avec la charge tumorale, comme nous aurions pu le supposer, ou comme certaines études semblent le montrer [3]. Par exemple, dans une étude recherchant la mutation V595E de BRAF chez des chiens touchés par un **carcinome urothélial**, la **quantité d'ADNtc muté semble augmenter** avec la progression de la maladie, notamment lorsqu'il y a **apparition de métastases** ; et elle semble **diminuer lorsqu'il y a une réponse positive au traitement**. Ces observations sont également retrouvées dans une étude sur des chiens atteints de **lymphome multicentrique**, traités par chimiothérapie : corrélation significative entre la taille des nœuds lymphatiques et la quantité d'ADNtc ; et diminution de la quantité d'ADNtc suite au traitement [2]. Cependant, aucune différence significative n'est rapportée entre les concentrations d'ADNtc muté chez des individus avec un cancer de grade T2 et ceux de grade T3 [65].

Dans nos cas, comme dans certaines autres études, la quantité d'ADNtc muté ne semble pas corrélée avec la progression ou la généralisation du cancer, **des diminutions de cette quantité sont même observées dans les derniers prélèvements avant décès** des Bouviers Bernois atteints de SH (individus 20272 et 19965, [Figure 65](#)).

Nous nous sommes donc questionnés, tout d'abord sur les hypothèses pouvant expliquer une fluctuation de la quantité d'ADNtc circulant. La principale hypothèse a déjà été évoquée pour le chien 19959 décédé d'un lymphome de type B. En effet, nous avons évoqué la présence potentielle de **clones pré-tumoraux de sarcome histiocyttaire, mutés pour *PTPN11***, qui pourraient être en circulation dans le sang lorsqu'ils sont relargués par les tissus. Cette hypothèse permettait d'expliquer la présence de la mutation G503V de *PTPN11* dans le culot cellulaire d'un des prélèvements sanguins de ce chien. Si nous reprenons cette hypothèse de clones pré-tumoraux mutés, nous pouvons supposer que ces cellules **relarguent de l'ADN dans le sang**, par nécrose ou apoptose, à partir des organes où elles se développent. Si ces cellules parviennent à acquérir les dix principales propriétés des cellules cancéreuses, elles vont survivre et proliférer, permettant une augmentation du relargage d'ADN tumoral dans le sang ([Figure 76](#)). Au contraire, **si ces cellules ne survivent pas, la quantité d'ADNtc muté** observée à un instant t, **peut diminuer voir devenir nulle** si aucun autre clone pré-tumoral n'a pu être produit. De plus, si la **vitesse de croissance de la tumeur et/ou sa nécrose** sont **importantes** quelques heures avant le prélèvement (temps de survie de l'ADN circulant dans le plasma), **davantage d'ADNtc sera libéré** et donc le taux de mutation retrouvé par ddPCR sera potentiellement plus grand.

4.2.3. Perspectives de thérapie ciblée

Comme l'a montré le sondage réalisé auprès des propriétaires de Bouviers Bernois, le **test de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire** disséminé n'aurait un **réel intérêt que si une thérapie ciblée, spécifique pourrait enrayer ou au moins ralentir son développement** avant apparition de signes cliniques ou avant dégradation de l'état général, sachant que les métastases apparaissent dans 70 à 90% des cas, ce qui amène à une durée de survie moyenne après diagnostic d'environ deux mois. Aujourd'hui, les sarcomes histiocytaires ne répondent que faiblement à la chimiothérapie (notamment à base de lomustine) [138]. Ainsi, une thérapie ciblée, mise en place précocément, serait susceptible d'**améliorer la survie globale** des individus affectés.

Plusieurs études récentes ont été réalisées, en testant des **inhibiteurs spécifiques de la protéine SHP-2**, codée par *PTPN11*. L'inhibiteur qui semble le plus étudié est la **petite molécule allostérique SHP099**. Cet inhibiteur stabilise la protéine SHP-2 de type sauvage dans sa conformation d'auto-inhibition (domaine N-SH2 lié au domaine catalytique PTP). Ainsi, SHP-2 mutée pourrait retrouver sa conformation fermée inactive lors de sa liaison à SHP099 (Figure 88). La **mutation E76K diminue cependant la puissance inhibitrice de SHP099 d'un facteur 100**. En effet, dans la forme mutée E76K de SHP-2, le site actif PTP est exposé tandis que la poche de liaison pour l'inhibiteur allostérique SHP099 est éliminée. La liaison de SHP099 à la SHP-2 mutée pour E76K peut tout de même ramener la structure de cette variante à sa conformation autoinhibée, mais avec une moindre efficacité [192]. Ainsi, **selon la mutation affectant la protéine SHP-2, l'efficacité des inhibiteurs varie**. Cela est également montré dans l'étude de Tani *et al.* en 2020, où l'inhibiteur SHP099 a été testé sur des lignées cellulaires présentant des mutations différentes de *PTPN11* : E76Q, E76A et G503V (la dernière étant la deuxième mutation la plus retrouvée dans notre étude). Les lignées présentant les **mutations E76Q et E76A étaient sensibles à l'inhibiteur SHP099**, mais **pas les lignées présentant la mutation G503V**. L'inhibiteur SHP099 pourrait donc être utilisé comme thérapie ciblée pour les sarcomes histiocytaires canins présentant les mutations E76Q et E76A, mais pas pour ceux mutés pour G503V [245]. La forte sensibilité de ces sarcomes histiocytaires mutés pour E76Q et E76A à l'inhibiteur SHP099 a été **confirmée dans des modèles murins xéno greffés**. Ces modèles ont permis de révéler également une **sensibilité modérée** des cellules tumorales histiocytaires présentant la **mutation A72G**. Enfin, ces modèles ont montré une bonne tolérance à l'inhibiteur SHP099 [246].

Un autre inhibiteur ayant été étudié est le **composé 11a-1**, qui lui **se fixe sur le site actif** (domaine phosphatase PTP) de la protéine SHP-2, et à une poche périphérique unique située à proximité (Figure 88). Son **efficacité a déjà été montrée** en oncologie humaine, pour les **cancers du poumon et du sein**. Cette petite molécule inhibitrice **bloquerait efficacement l'activation de ERK1/2 de la voie MAPK et celle de AKT**, toutes les deux médiées par SHP-2 ; cela permettrait d'atténuer la viabilité, la migration et la formation de colonies des cellules de mélanome, et permettrait de **supprimer** de manière significative la **croissance des xéno greffes de mélanome**. Un **précurseur de 11a-1, le composé IIB-08** a également montré une forte efficacité *in vivo* contre la leucémie à mastocytes et contre le glioblastome multiforme (tumeur cérébrale) chez des modèles murins xéno greffés (Figure 88) [247].

Le **GS-493** est également un **inhibiteur dirigé contre le site actif PTP** (Figure 88). Il a été montré qu'il peut bloquer la diffusion des cellules pancréatiques humaines et atténuer la croissance de lignées cellulaires de cancer du poumon, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles murins xéno greffés [247].

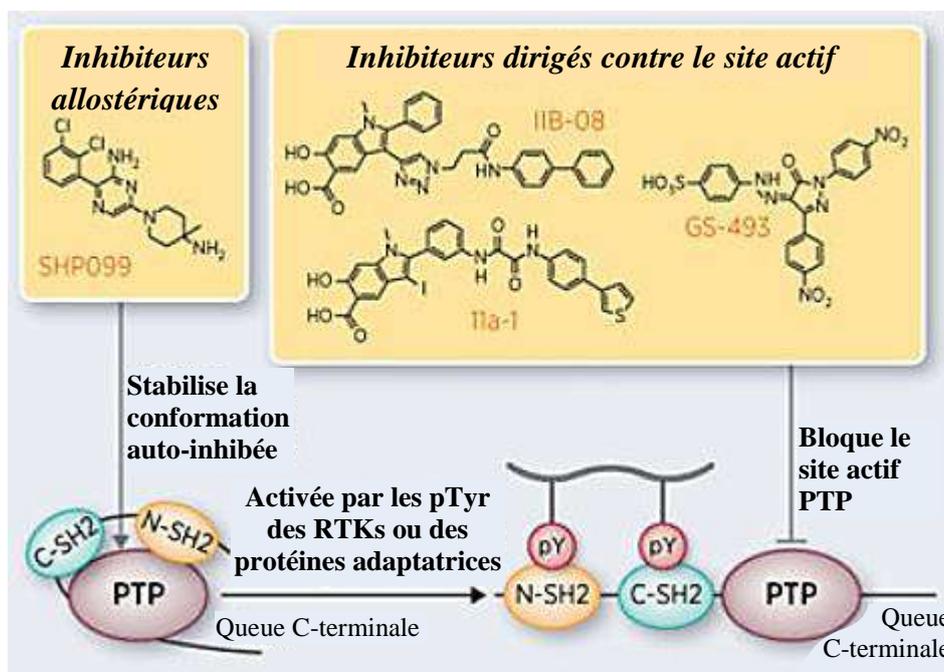


Figure 88 : Structure schématique de la protéine SHP-2, stratégies thérapeutiques ciblées contre le cancer et petites molécules inhibitrices les plus récentes de SHP-2. D'après Frankson *et al.*, 2017.

pTyr : motifs de tyrosines phosphorylées ; *RTKs* : Récepteurs Tyrosine Kinase. [247]

D'autres pistes intéressantes de thérapie ciblée seraient **d'utiliser des inhibiteurs des protéines kinases** (comme MEK) seuls ou en association avec un inhibiteur de la forme mutée de SHP-2. En effet, SHP-2 stimule la voie des MAPK, et inhiber son activation en aval de l'action de SHP-2 pourrait donc aussi être efficace. Ainsi, il a été montré qu'un inhibiteur de MEK, le **tramétinib** (actuellement utilisé en oncologie humaine contre les mélanomes métastatiques présentant des mutations de BRAF [248]), **inhibait significativement des lignées cellulaires de sarcome histiocytaire** en stimulant l'arrêt des cycles cellulaires et l'apoptose des cellules. Des souris xéno-graftées avec ces cellules et recevant du tramétinib avaient une **durée de survie prolongée** par rapport à celles n'en recevant pas. De la même façon, le dasatinib prolonge la durée de survie chez des souris xéno-graftées [8].

Des comparaisons entre un traitement par un inhibiteur de SHP-2 (**GS-493**) et des inhibiteurs de MEK (**tramétinib** et **sorafénib**) ont également été réalisées sur des lignées cellulaires de sarcome histiocytaire mutées pour *PTPN11*. Il a été observé une **meilleure activité antiproliférative des inhibiteurs de MEK par rapport aux inhibiteurs de SHP-2**, avec l'activité **la plus efficace** pour les lignées traitées avec le **tramétinib** [7].

Tous ces résultats expérimentaux sur les mutations du gène *PTPN11* et les thérapies les ciblant ouvrent de **nouvelles perspectives en oncologie humaine**. En effet, comme nous l'avons expliqué, le **sarcome histiocytaire disséminé du Bouvier Bernois est un modèle spontané pertinent** pour l'étude de l'affection homologue humaine, du fait de la forte prédisposition de cette race à développer ce cancer et du fait de l'homogénéité clinique retrouvée. De plus, **l'oncologie comparée entre ces deux espèces est tout à fait appropriée**, étant donné que la physiologie et les manifestations cliniques des maladies chez ces deux espèces sont similaires et que leur organisme est influencé par les mêmes facteurs environnementaux. De plus, **le modèle canin peut être utilisé pour développer des thérapies ciblées** telles que celles présentées ci-dessus. Des **essais *in vitro*** peuvent être faits sur des cellules de SH canins pour tester des molécules thérapeutiques, telles que des inhibiteurs de *PTPN11* ou de la voie MAPK ; puis des **essais précliniques** (phase III du développement d'un médicament) peuvent être effectués sur des chiens atteints de SH [7], [249].

Afin de **contribuer aux recherches** sur le sarcome histiocytaire canin, son diagnostic précoce, et son affection homologue chez l'homme, cette étude expérimentale sera valorisée sous la forme d'une **publication scientifique** dont un résumé (dont la première version est présentée en [Annexe 11](#)) a été soumis pour le **congrès mondial de cancérologie vétérinaire** (WVCC : *World Veterinary Cancer Conference*) à Tokyo en mars 2024.

CONCLUSION

Notre étude s'inscrit dans la continuité des travaux de recherche menés par l'Équipe « Génétique du Chien » de l'Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR UMR 6290 CNRS-UR1). En effet, depuis plus d'une dizaine d'années, le cancer du sarcome histiocytaire y est étudié, en particulier dans la race Bouvier Bernois, où il est prédominant comparativement aux autres races canines.

Comme nous l'avons expliqué en première partie de ce manuscrit, ce cancer, existant majoritairement sous sa forme disséminée et viscérale chez les Bouviers Bernois, est très souvent diagnostiqué trop tardivement pour espérer, après son diagnostic, une durée de survie raisonnable pour le chien et ses propriétaires. Ainsi, l'intérêt des biomarqueurs prend ici tout son sens : en permettant le dépistage ou le diagnostic plus précoce du sarcome histiocytaire, ou encore un suivi plus efficace de la rémission lors du traitement, les biomarqueurs pourraient permettre le dépistage de ce cancer dans cette race, ainsi qu'une meilleure prise en charge pour les chiens concernés.

De plus, les Bouviers Bernois présentent une prédisposition génétique forte pour ce cancer avec de nombreux cas développés au sein d'un même pedigree (environ un quart des cancers du Bouvier Bernois sont des sarcomes histiocytaires), tout en ayant une espérance de vie assez courte permettant d'obtenir des résultats d'études cinétiques plus rapidement que chez l'homme. Ces éléments font de cette race un modèle spontané idéal pour cette affection, qui existe de façon homologue et tout aussi agressive en oncologie humaine, et pour laquelle les rares cas sporadiques rencontrés ne permettent pas d'analyse complète de l'épidémiologie et des facteurs génétiques en cause.

C'est avec cette volonté que différentes études ont été menées depuis plusieurs années, en collaboration entre l'Équipe « Génétique du Chien » de l'IGDR et l'École Nationale Vétérinaire de Nantes-Oniris. L'épidémiologie, la pathologie et les mécanismes génétiques en cause dans cette tumeur agressive ont pu être approfondis et précisés. Au cours des derniers travaux, il a pu être montré que des mutations du gène *PTPN11* seraient associées très fréquemment à ce cancer chez les Bouviers Bernois, à la dissémination des lésions tumorales, à l'agressivité et au pronostic grave de ces formes disséminées [112], [230]. En outre, après étude des mutations de *PTPN11* au sein des cinq tumeurs les plus fréquemment diagnostiquées chez les Bouviers Bernois, il s'avère que les mutations E76K et G503V du gène *PTPN11* seraient spécifiques du sarcome histiocytaire [225]. Enfin, il a été démontré que le sarcome histiocytaire libère des cellules cancéreuses dans le sang, mais également de l'ADN circulant, pouvant être détecté et utilisé comme biomarqueur de ce cancer [2], [230].

Suite à ces différentes études, complémentaires, notre travail se donnait pour objectif d'estimer la pertinence de l'utilisation des mutations du gène *PTPN11* comme biomarqueurs de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire chez le Bouvier Bernois. Dans ce but, nous avons réalisé, sur un peu plus de deux ans, une collecte d'échantillons plasmatiques dans une cohorte de trente-cinq Bouviers Bernois issus de deux élevages différents. Un protocole a été élaboré afin d'extraire l'ADN circulant du plasma et de détecter avec une forte sensibilité les mutations de *PTPN11*, par utilisation de la méthode de la ddPCR (*Digital Droplet PCR*).

Au sein de notre cohorte, vingt-et-un chiens sont décédés au terme de la collecte, dont huit de sarcome histiocytaire. Pour ces huit individus, nous avons recherché les mutations d'intérêt de *PTPN11* (principalement E76K, G503V et quatre autres mutations moins fréquentes) dans les lésions tumorales et

nous avons réalisé, le cas échéant, une étude cinétique visant à évaluer le délai de précocité pour la détection de ces mutations dans l'ADN circulant du plasma. Parmi ces huit chiens atteints de sarcome histiocytaire, six avaient au moins une lésion tumorale présentant une mutation du gène *PTPN11*, mutation qui se retrouvait également dans l'ADN circulant du plasma. En remontant dans les échantillons plasmatiques prélevés avant le décès de chaque animal, nous avons constaté que la mutation concernée de *PTPN11* pouvait être détectée dans l'ADN plasmatique avant l'apparition des signes cliniques liés au cancer. Ce délai de précocité s'étendait de 0 à 14,2 mois avant le décès de l'animal, avec une moyenne de 6,7 mois. Ce diagnostic précoce semble réellement intéressant quand il est comparé avec la date de diagnostic ou de suspicion clinique. En effet, le diagnostic précoce du sarcome histiocytaire, par détection de la mutation, survient en moyenne 155 jours soit 5,24 mois plus tôt que le diagnostic clinique dans les six cas étudiés, avec des valeurs allant jusqu'à 287 jours, soit un peu plus de neuf mois avant toute suspicion clinique. Néanmoins, il serait nécessaire de vérifier l'efficacité de ce test de diagnostic dans des études à plus grandes échelles, c'est-à-dire dans une plus grande population et sur une plus longue durée.

Pour les Bouviers Bernois toujours en vie dans notre cohorte, les derniers prélèvements réalisés ont été testés pour les mutations *PTPN11*. Ainsi, le seul individu toujours en vie, présentant un test positif de détection de ces mutations, est toujours suivi actuellement avec la réalisation d'imagerie par tomodensitométrie tous les trois mois, méthode de surveillance qui pourrait être proposée dans un futur proche pour mettre en évidence le(s) site(s) d'apparition d'un sarcome histiocytaire lorsque le test de diagnostic précoce s'avère positif.

De plus, notre travail a permis de donner un aperçu de l'intérêt que pourrait présenter un tel test de diagnostic précoce auprès des particuliers et éleveurs, en réalisant un sondage à petite échelle. Il en est ressorti que la plupart des propriétaires souhaiteraient utiliser ce test s'il était mis sur le marché ; cependant, beaucoup ont soulevé le fait que réaliser ce test sans connaître le bénéfice en matière de délai de survie supplémentaire et de qualité de vie ne présentait pas un grand intérêt, autre que celui de savoir que le chien va développer un sarcome histiocytaire à une date inconnue mais possiblement proche. Le développement d'une thérapie ciblée sur les mutations de *PTPN11* permettrait donc d'éviter cet écueil, en initiant un traitement plus précoce susceptible d'allonger la durée de survie globale de l'animal. En effet, la détection de cette mutation plasmatique serait susceptible d'argumenter pour la mise en œuvre précoce d'une thérapie ciblée spécifique de cette voie oncogénique mutée, de nature à améliorer la prise en charge de ce cancer. Des résultats préliminaires ont effectivement révélé qu'un chien muté pour *PTPN11*, atteint de sarcome histiocytaire localisé, ne répondait pas à la lomustine, traitement classique de chimiothérapie anti-mitotique et non ciblée, utilisé pour ce cancer.

L'ensemble de ces résultats est encourageant dans la recherche de méthodes de diagnostic précoce moléculaire de cette maladie. Des études ultérieures pourraient donc porter sur l'élaboration d'essais cliniques raisonnés de thérapie ciblée de ce cancer, comme il en existe aujourd'hui pour le mastocytome canin, par exemple. L'intérêt principal ici serait de pouvoir justifier, éthiquement, la mise en place d'un traitement anticancéreux sur un chien avant toute apparition de signes cliniques, en comparant de manière prospective la survie des individus recevant, ou non, ce traitement précoce. En outre, cela permettrait de transposer ces avancées en médecine humaine, rejoignant le concept « *One Health* », qui encourage une approche globale et pluridisciplinaire de la santé des animaux, des hommes et de l'environnement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. Klopfleisch, « Personalised medicine in veterinary oncology: One to cure just one », *The Veterinary Journal*, vol. 205, n° 2, p. 128-135, août 2015, doi: 10.1016/j.tvjl.2015.01.004.
- [2] A. Prouteau *et al.*, « Circulating tumor DNA is detectable in canine histiocytic sarcoma, oral malignant melanoma, and multicentric lymphoma », *Sci Rep*, vol. 11, n° 1, Art. n° 1, janv. 2021, doi: 10.1038/s41598-020-80332-y.
- [3] A. Flory *et al.*, « Clinical validation of a next-generation sequencing-based multi-cancer early detection “liquid biopsy” blood test in over 1,000 dogs using an independent testing set: The CANcer Detection in Dogs (CANDiD) study », *PLOS ONE*, vol. 17, n° 4, p. e0266623, avr. 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0266623.
- [4] P. F. Moore, « A Review of Histiocytic Diseases of Dogs and Cats », *Vet Pathol*, vol. 51, n° 1, p. 167-184, janv. 2014, doi: 10.1177/0300985813510413.
- [5] B. Hedan, C. D. Brito, et A.-S. Guillory, « Cancer chez le chien: prédispositions raciales et formes familiales », *Le Point vétérinaire (Éd. Expert canin)*, vol. 46, n° 354, p. 54-62, 2015.
- [6] G. A. Padgett, B. R. Madewell, E. T. Keller, L. Jodar, et M. Packard, « Inheritance of histiocytosis in Bernese mountain dogs », *J Small Anim Pract*, vol. 36, n° 3, p. 93-98, mars 1995, doi: 10.1111/j.1748-5827.1995.tb02838.x.
- [7] B. Hédan *et al.*, « PTPN11 mutations in canine and human disseminated histiocytic sarcoma », *International Journal of Cancer*, vol. 147, n° 6, p. 1657-1665, 2020, doi: 10.1002/ijc.32991.
- [8] M. Takada *et al.*, « Activating Mutations in PTPN11 and KRAS in Canine Histiocytic Sarcomas », *Genes*, vol. 10, n° 7, Art. n° 7, juill. 2019, doi: 10.3390/genes10070505.
- [9] H. Asada *et al.*, « Whole exome and transcriptome analysis revealed the activation of ERK and Akt signaling pathway in canine histiocytic sarcoma », *Sci Rep*, vol. 13, n° 1, Art. n° 1, mai 2023, doi: 10.1038/s41598-023-35813-1.
- [10] M. J. Myers, E. R. Smith, et P. G. Turfle, « Biomarkers in Veterinary Medicine », *Annual Review of Animal Biosciences*, vol. 5, n° 1, p. 65-87, 2017, doi: 10.1146/annurev-animal-021815-111431.
- [11] M. E. Figueroa et W. E. Rawls, « Biological Markers for Differentiation of Herpes-virus Strains of Oral and Genital Origin », *Journal of General Virology*, vol. 4, n° 2, p. 259-267, 1969, doi: 10.1099/0022-1317-4-2-259.
- [12] Biomarkers Definitions Working Group, « Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework », *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, vol. 69, n° 3, p. 89-95, 2001, doi: 10.1067/mcp.2001.113989.
- [13] Patient Involvement in Cancer Research Program - Canadian Cancer Research Alliance, « UNDERSTANDING CANCER: Biomarker Basics », CCRA - Patient Research Advocates. Consulté le: 25 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ccra-acrc.ca/fr/resources/patient-research-advocates/>
- [14] M. A. Robb, P. M. McInnes, et R. M. Califf, « Biomarkers and Surrogate Endpoints: Developing Common Terminology and Definitions », *JAMA*, vol. 315, n° 11, p. 1107, mars 2016, doi: 10.1001/jama.2016.2240.
- [15] FDA-NIH Biomarker Working Group, « BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource », p. 58, nov. 2021.
- [16] R. M. Califf, « Biomarker definitions and their applications », *Exp Biol Med (Maywood)*, vol. 243, n° 3, p. 213-221, févr. 2018, doi: 10.1177/1535370217750088.
- [17] Institute of Medicine (US) Committee on Qualification of Biomarkers and Surrogate Endpoints in Chronic Disease, *Evaluation of Biomarkers and Surrogate Endpoints in Chronic Disease*. Washington (DC): National Academies Press (US), 2010. Consulté le: 24 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK220297/>
- [18] « S’informer sur le développement d’un biomarqueur », BMK Tools - Biomarqueurs. Consulté le: 3 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://biomarqueurs.aviesan.fr/outils/sinformer/>

- [19] T. R. W. Perera, D. A. Skerrett-Byrne, Z. Gibb, B. Nixon, et A. Swegen, « The Future of Biomarkers in Veterinary Medicine: Emerging Approaches and Associated Challenges », *Animals*, vol. 12, n° 17, Art. n° 17, janv. 2022, doi: 10.3390/ani12172194.
- [20] « Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine ». Consulté le: 3 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.academie-medecine.fr/le-dictionnaire/index.php?q=valeur%20pr%C3%A9dictive>
- [21] S. Srivastava et P. D. Wagner, « The Early Detection Research Network: A National Infrastructure to Support the Discovery, Development, and Validation of Cancer Biomarkers », *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol. 29, n° 12, p. 2401-2410, déc. 2020, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-20-0237.
- [22] C. J. Henry, « Biomarkers in veterinary cancer screening: Applications, limitations and expectations », *The Veterinary Journal*, vol. 185, n° 1, p. 10-14, juill. 2010, doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.005.
- [23] P. Colombe, « Les biomarqueurs sanguins en oncologie comparée - état actuel des connaissances en 2020 - application aux cellules myéloïdes suppressives canines », Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 2020.
- [24] « Genome Wide Association Study », SCNAT savoir - Académie des sciences naturelles. Consulté le: 4 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://sciencesnaturelles.ch/id/rvkP5>
- [25] M. L. Arendt *et al.*, « Genome-Wide Association Study of Golden Retrievers Identifies Germ-Line Risk Factors Predisposing to Mast Cell Tumours », *PLOS Genetics*, vol. 11, n° 11, p. e1005647, nov. 2015, doi: 10.1371/journal.pgen.1005647.
- [26] H. L. Neibergs *et al.*, « Susceptibility loci revealed for bovine respiratory disease complex in pre-weaned holstein calves », *BMC Genomics*, vol. 15, n° 1, p. 1164, déc. 2014, doi: 10.1186/1471-2164-15-1164.
- [27] E. Lipkin *et al.*, « The Use of Kosher Phenotyping for Mapping QTL Affecting Susceptibility to Bovine Respiratory Disease », *PLOS ONE*, vol. 11, n° 4, p. e0153423, avr. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0153423.
- [28] « Doberman Pinscher Dilated Cardiomyopathy », Veterinary Hospital. Consulté le: 4 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://hospital.cvm.ncsu.edu/services/small-animals/genetics/doberman-dcm/>
- [29] S. Gilgenkrantz, « La titine retrouvée en pathologie cardiaque », *Med Sci (Paris)*, vol. 18, n° 6-7, Art. n° 6-7, juin 2002, doi: 10.1051/medsci/20021867661.
- [30] P. Rivera *et al.*, « Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2 », *Cancer Res*, vol. 69, n° 22, p. 8770-8774, nov. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1725.
- [31] M. L. Arendt *et al.*, « PIK3CA is recurrently mutated in canine mammary tumors, similarly to in human mammary neoplasia », *Sci Rep*, vol. 13, n° 1, Art. n° 1, janv. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-27664-7.
- [32] Équipe Génétique du Chien du CNRS de Rennes, « Sarcome Histiocytaire », ANTAGENE. Consulté le: 4 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://antagene.com/maladie/sarcome-histiocytaire>
- [33] A. L. Shearin *et al.*, « The MTAP-CDKN2A locus confers susceptibility to a naturally occurring canine cancer », *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 21, n° 7, p. 1019-1027, juill. 2012, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0190-T.
- [34] « History of the EDRN », Early Detection Research Network. Consulté le: 15 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://edrn.nci.nih.gov/about-edrn/history-of-the-edrn/>
- [35] P. L *et al.*, « 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, janv. 2014, doi: 10.1177/0300985813509388.
- [36] I. Kaszak, O. Witkowska-Piłaszewicz, K. Domrazek, et P. Jurka, « The Novel Diagnostic Techniques and Biomarkers of Canine Mammary Tumors », *Veterinary Sciences*, vol. 9, n° 10, Art. n° 10, oct. 2022, doi: 10.3390/vetsci9100526.

- [37] E. J. Fish *et al.*, « Circulating microRNA as biomarkers of canine mammary carcinoma in dogs », *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 34, n° 3, p. 1282-1290, 2020, doi: 10.1111/jvim.15764.
- [38] P. Petroušková, N. Hudáková, M. Maloveská, F. Humeník, et D. Cizkova, « Non-Exosomal and Exosome-Derived miRNAs as Promising Biomarkers in Canine Mammary Cancer », *Life*, vol. 12, n° 4, Art. n° 4, avr. 2022, doi: 10.3390/life12040524.
- [39] M. Jain *et al.*, « CEA, CA 15-3, and miRNA expression as potential biomarkers in canine mammary tumors », *Chromosome Res*, vol. 29, n° 2, p. 175-188, juin 2021, doi: 10.1007/s10577-021-09652-7.
- [40] B. Q. Pinheiro, F. F. de Magalhães, F. W. da S. Alves, I. N. G. Silva, A. M. R. Faustino, et L. D. M. da Silva, « CA 15-3, CRP, and LDH correlates with prognostic parameters in canine mammary neoplasms », *Anim. Reprod.*, vol. 20, p. e20220086, mars 2023, doi: 10.1590/1984-3143-AR2022-0086.
- [41] S. C. Jena *et al.*, « Surface plasmon resonance immunosensor for label-free detection of BIRC5 biomarker in spontaneously occurring canine mammary tumours », *Sci Rep*, vol. 9, n° 1, Art. n° 1, sept. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-49998-x.
- [42] BRUKER, « Résonance des plasmons de surface », Résonance des plasmons de surface pour une analyse haut débit. Consulté le: 14 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.bruker.com/fr/products-and-solutions/surface-plasmon-resonance.html>
- [43] B. Jimenez Rodriguez *et al.*, « Detection of TP53 and PIK3CA Mutations in Circulating Tumor DNA Using Next-Generation Sequencing in the Screening Process for Early Breast Cancer Diagnosis », *Journal of Clinical Medicine*, vol. 8, n° 8, Art. n° 8, août 2019, doi: 10.3390/jcm8081183.
- [44] K.-H. Lee, T.-J. Shin, W.-H. Kim, et J.-Y. Cho, « Methylation of LINE-1 in cell-free DNA serves as a liquid biopsy biomarker for human breast cancers and dog mammary tumors », *Sci Rep*, vol. 9, n° 1, Art. n° 1, janv. 2019, doi: 10.1038/s41598-018-36470-5.
- [45] J. W. Elliott, P. Cripps, et L. Blackwood, « Thymidine kinase assay in canine lymphoma », *Vet Comp Oncol*, vol. 11, n° 1, p. 1-13, mars 2013, doi: 10.1111/j.1476-5829.2011.00296.x.
- [46] K. A. Selting, C. R. Sharp, R. Ringold, et J. Knouse, « Serum thymidine kinase 1 and C-reactive protein as biomarkers for screening clinically healthy dogs for occult disease », *Vet Comp Oncol*, vol. 13, n° 4, p. 373-384, déc. 2015, doi: 10.1111/vco.12052.
- [47] K. A. Selting, R. Ringold, B. Husbands, et P. O. Pithua, « Thymidine Kinase Type 1 and C-Reactive Protein Concentrations in Dogs with Spontaneously Occurring Cancer », *J Vet Intern Med*, vol. 30, n° 4, p. 1159-1166, 2016, doi: 10.1111/jvim.13954.
- [48] D. H. Thamm *et al.*, « Elevated serum thymidine kinase activity in canine splenic hemangiosarcoma* », *Vet Comp Oncol*, vol. 10, n° 4, p. 292-302, déc. 2012, doi: 10.1111/j.1476-5829.2011.00298.x.
- [49] S. S. Taylor *et al.*, « Serum thymidine kinase activity in clinically healthy and diseased cats: a potential biomarker for lymphoma », *J Feline Med Surg*, vol. 15, n° 2, p. 142-147, févr. 2013, doi: 10.1177/1098612X12463928.
- [50] « Early Cancer Detection Tests: Do They Work? », Golden Retriever Club of America. Consulté le: 15 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://grca.org/about-the-breed/health-research/early-cancer-detection-tests-do-they-work/>
- [51] B. Inc, « BioCurex Introduces OncoPet(tm), a RECAF(tm) Blood Test for Cancer Detection in Companion Animals », GlobeNewswire News Room. Consulté le: 14 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.globenewswire.com/news-release/2009/06/17/399390/1556/en/BioCurex-Introduces-OncoPet-tm-a-RECAF-tm-Blood-Test-for-Cancer-Detection-in-Companion-Animals.html>
- [52] A. da Costa, B. Kohn, A. D. Gruber, et R. Klopffleisch, « Multiple RT-PCR markers for the detection of circulating tumour cells of metastatic canine mammary tumours », *Vet J*, vol. 196, n° 1, p. 34-39, avr. 2013, doi: 10.1016/j.tvjl.2012.08.021.
- [53] A. da Costa, D. Lenze, M. Hummel, B. Kohn, A. D. Gruber, et R. Klopffleisch, « Identification of six potential markers for the detection of circulating canine mammary tumour cells in the

- peripheral blood identified by microarray analysis », *J Comp Pathol*, vol. 146, n° 2-3, p. 143-151, 2012, doi: 10.1016/j.jcpa.2011.06.004.
- [54] I. Kaszak, A. Ruszczak, S. Kanafa, K. Kacprzak, M. Król, et P. Jurka, « Current biomarkers of canine mammary tumors », *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 60, n° 1, p. 66, oct. 2018, doi: 10.1186/s13028-018-0417-1.
- [55] S. Ployetch *et al.*, « Utilizing MALDI-TOF MS and LC-MS/MS to access serum peptidome-based biomarkers in canine oral tumors », *Sci Rep*, vol. 12, n° 1, Art. n° 1, déc. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-26132-y.
- [56] H. von Euler, R. Einarsson, U. Olsson, A.-S. Lagerstedt, et S. Eriksson, « Serum thymidine kinase activity in dogs with malignant lymphoma: a potent marker for prognosis and monitoring the disease », *J Vet Intern Med*, vol. 18, n° 5, p. 696-702, 2004, doi: 10.1892/0891-6640(2004)18<696:stkaid>2.0.co;2.
- [57] N. Manachai, D. Umnuayyonvaree, P. Punyathi, A. Rungsipipat, et K. Rattanapinyopituk, « Impact of serum C-reactive protein level as a biomarker of cancer dissemination in canine lymphoid neoplasia », *Vet World*, vol. 15, n° 12, p. 2810-2815, déc. 2022, doi: 10.14202/vetworld.2022.2810-2815.
- [58] G. B. Gelaleti, B. V. Jardim, C. Leonel, M. G. Moschetta, et D. Ap. P. de C. Zuccari, « Interleukin-8 as a prognostic serum marker in canine mammary gland neoplasias », *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 146, n° 2, p. 106-112, avr. 2012, doi: 10.1016/j.vetimm.2012.02.005.
- [59] M. I. Carvalho *et al.*, « Assessing the Interleukin 35 Immunoexpression in Malignant Canine Mammary Tumors: Association With Clinicopathological Parameters and Prognosis », *Anticancer Res*, vol. 39, n° 4, p. 2077-2083, avr. 2019, doi: 10.21873/anticancer.13319.
- [60] S. H.-C. Yuan, S.-C. Chang, P.-Y. Chou, Y. Yang, et H.-P. Liu, « The Implication of Serum Autoantibodies in Prognosis of Canine Mammary Tumors », *Animals*, vol. 12, n° 18, Art. n° 18, janv. 2022, doi: 10.3390/ani12182463.
- [61] S. E. Lana, T. L. Jackson, R. C. Burnett, P. S. Morley, et A. C. Avery, « Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma », *J Vet Intern Med*, vol. 20, n° 2, p. 329-334, 2006, doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[329:uopcrf]2.0.co;2.
- [62] H. Thiemeyer *et al.*, « An RNA-Seq-Based Framework for Characterizing Canine Prostate Cancer and Prioritizing Clinically Relevant Biomarker Candidate Genes », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, n° 21, Art. n° 21, janv. 2021, doi: 10.3390/ijms222111481.
- [63] A. Kycko et M. Reichert, « Proteomics in the Search for Biomarkers of Animal Cancer », *Current Protein and Peptide Science*, vol. 15, n° 1, p. 36-44, févr. 2014.
- [64] H. P. Von Euler, P. Rivera, A.-C. Aronsson, C. Bengtsson, L.-O. Hansson, et S. K. Eriksson, « Monitoring therapy in canine malignant lymphoma and leukemia with serum thymidine kinase 1 activity--evaluation of a new, fully automated non-radiometric assay », *Int J Oncol*, vol. 34, n° 2, p. 505-510, févr. 2009.
- [65] M. Tagawa *et al.*, « Quantitative analysis of the BRAF V595E mutation in plasma cell-free DNA from dogs with urothelial carcinoma », *PLOS ONE*, vol. 15, n° 4, p. e0232365, avr. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0232365.
- [66] A. K. Luu, G. A. Wood, et A. M. Vilorio-Petit, « Recent Advances in the Discovery of Biomarkers for Canine Osteosarcoma », *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 8, 2021, Consulté le: 16 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.734965>
- [67] S. M. Nguyen, D. H. Thamm, D. M. Vail, et C. A. London, « Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document », *Vet Comp Oncol*, vol. 13, n° 3, p. 176-183, sept. 2015, doi: 10.1111/vco.12032.
- [68] C. R. Taylor, « Introduction to Predictive Biomarkers: Definitions and Characteristics », in *Predictive Biomarkers in Oncology*, S. Badve et G. L. Kumar, Éd., Cham: Springer International Publishing, 2019, p. 3-18. doi: 10.1007/978-3-319-95228-4_1.
- [69] R. M. Gil da Costa, « C-kit as a prognostic and therapeutic marker in canine cutaneous mast cell tumours: From laboratory to clinic », *The Veterinary Journal*, vol. 205, n° 1, p. 5-10, juill. 2015, doi: 10.1016/j.tvjl.2015.05.002.

- [70] OncologyPRO, « PARP inhibitors in cancer treatment ». Consulté le: 17 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://oncologypro.esmo.org/oncology-in-practice/anti-cancer-agents-and-biological-therapy/parp-inhibition-and-dna-damage-response-ddr/parp-inhibitors/mode-of-action/parp-inhibitors-in-cancer-treatment>
- [71] P. Thumser-Henner, K. J. Nytko, et C. Rohrer Bley, « Mutations of BRCA2 in canine mammary tumors and their targeting potential in clinical therapy », *BMC Veterinary Research*, vol. 16, n° 1, p. 30, janv. 2020, doi: 10.1186/s12917-020-2247-4.
- [72] B. Meyer *et al.*, « Expression pattern of the HMGB1 gene in sarcomas of the dog », *Anticancer Res*, vol. 24, n° 2B, p. 707-710, 2004.
- [73] G. T. Selvarajah, J. Kirpensteijn, M. E. van Wolferen, N. A. S. Rao, H. Fieten, et J. A. Mol, « Gene expression profiling of canine osteosarcoma reveals genes associated with short and long survival times », *Mol Cancer*, vol. 8, p. 72, sept. 2009, doi: 10.1186/1476-4598-8-72.
- [74] G. T. Selvarajah et J. Kirpensteijn, « Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma », *The Veterinary Journal*, vol. 185, n° 1, p. 28-35, juill. 2010, doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.010.
- [75] L. Simeon, « Les biomarqueurs cardiaques : utilisation pratique », *LaDT*, n° 184, p. 4-9, avr. 2021.
- [76] J. Gallay-Lepoutre, M. C. Bélanger, et M. E. Nadeau., « Prospective evaluation of Doppler echocardiography, tissue Doppler imaging and biomarkers measurement for the detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity in dogs: A pilot study », *Research in Veterinary Science*, vol. 105, p. 153-159, avr. 2016, doi: 10.1016/j.rvsc.2016.02.001.
- [77] J. D. Rizzo *et al.*, « American Society of Clinical Oncology/American Society of Hematology clinical practice guideline update on the use of epoetin and darbepoetin in adult patients with cancer », *J Clin Oncol*, vol. 28, n° 33, p. 4996-5010, nov. 2010, doi: 10.1200/JCO.2010.29.2201.
- [78] T. J. Smith *et al.*, « Recommendations for the Use of WBC Growth Factors: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update », *J Clin Oncol*, vol. 33, n° 28, p. 3199-3212, oct. 2015, doi: 10.1200/JCO.2015.62.3488.
- [79] « Definition of liquid biopsy - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI ». Consulté le: 22 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/liquid-biopsy>
- [80] A. R. Thierry et R. Tanos, « La biopsie liquide - Une voie possible pour le dépistage du cancer », *Med Sci (Paris)*, vol. 34, n° 10, Art. n° 10, oct. 2018, doi: 10.1051/medsci/2018208.
- [81] P. Colombe, J. Béguin, G. Benchekroun, et D. Le Roux, « Blood biomarkers for canine cancer, from human to veterinary oncology », *Veterinary and Comparative Oncology*, vol. 20, n° 4, p. 767-777, 2022, doi: 10.1111/vco.12848.
- [82] « CIRCAN : recherche sur les biopsies liquides en cancérologie | Hospices Civils de Lyon - CHU de Lyon ». Consulté le: 26 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.chu-lyon.fr/circan-recherche-biopsies-liquides-cancer>
- [83] M. R. Ossandon *et al.*, « Circulating Tumor DNA Assays in Clinical Cancer Research », *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, vol. 110, n° 9, p. 929-934, sept. 2018, doi: 10.1093/jnci/djy105.
- [84] T. M. Butler, P. T. Spellman, et J. Gray, « Circulating-tumor DNA as an early detection and diagnostic tool », *Current Opinion in Genetics & Development*, vol. 42, p. 14-21, févr. 2017, doi: 10.1016/j.gde.2016.12.003.
- [85] C. Alix-Panabières et K. Pantel, « Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy », *Cancer Discovery*, vol. 6, n° 5, p. 479-491, mai 2016, doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1483.
- [86] L. A. Diaz et A. Bardelli, « Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA », *J Clin Oncol*, vol. 32, n° 6, p. 579-586, févr. 2014, doi: 10.1200/JCO.2012.45.2011.
- [87] H. Schwarzenbach, D. S. B. Hoon, et K. Pantel, « Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients », *Nat Rev Cancer*, vol. 11, n° 6, Art. n° 6, juin 2011, doi: 10.1038/nrc3066.
- [88] J.-A. Letendre et R. Goggs, « Measurement of plasma cell-free DNA concentrations in dogs with sepsis, trauma, and neoplasia », *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, vol. 27, n° 3, p. 307-314, mai 2017, doi: 10.1111/vec.12592.

- [89] G. Beffagna *et al.*, « Circulating Cell-Free DNA in Dogs with Mammary Tumors: Short and Long Fragments and Integrity Index », *PLoS One*, vol. 12, n° 1, p. e0169454, janv. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0169454.
- [90] M. Tagawa, G. Shimbo, H. Inokuma, et K. Miyahara, « Quantification of plasma cell-free DNA levels in dogs with various tumors », *J Vet Diagn Invest*, vol. 31, n° 6, p. 836-843, nov. 2019, doi: 10.1177/1040638719880245.
- [91] B. Hédan et A. Prouteau, « L'ADN tumoral circulant, un biomarqueur d'avenir en oncologie vétérinaire », vol. 425/426, p. 59-63, janv. 2022.
- [92] K. Saukkonen *et al.*, « Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock », *Clin Chem*, vol. 54, n° 6, p. 1000-1007, juin 2008, doi: 10.1373/clinchem.2007.101030.
- [93] W.-L. Huang *et al.*, « Liquid biopsy genotyping in lung cancer: ready for clinical utility? », *Oncotarget*, vol. 8, n° 11, p. 18590-18608, janv. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.14613.
- [94] « Safe-SeqS ». Consulté le: 31 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://emea.illumina.com/science/sequencing-method-explorer/kits-and-arrays/safe-seqs.html>
- [95] A. M. Newman *et al.*, « Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA », *Nat Biotechnol*, vol. 34, n° 5, p. 547-555, mai 2016, doi: 10.1038/nbt.3520.
- [96] « Applications of Tagged Amplicon Sequencing on Disease Research - CD Genomics ». Consulté le: 1 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.cd-genomics.com/diseasepanel/applications-of-tagged-amplicon-sequencing-on-disease-research.html>
- [97] L. Marconato *et al.*, « Detection and Prognostic Relevance of Circulating and Disseminated Tumour Cell in Dogs with Metastatic Mammary Carcinoma: A Pilot Study », *Cancers (Basel)*, vol. 11, n° 2, p. 163, févr. 2019, doi: 10.3390/cancers11020163.
- [98] T. Wright *et al.*, « Flow Cytometric Detection of Circulating Osteosarcoma Cells in Dogs », *Cytometry A*, vol. 95, n° 9, p. 997-1007, sept. 2019, doi: 10.1002/cyto.a.23847.
- [99] « Les biomarqueurs circulants, c'est quoi ? | Institut Curie ». Consulté le: 28 octobre 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://curie.fr/dossier-pedagogique/les-biomarqueurs-circulants-cest-quoi>
- [100] K. Heishima *et al.*, « MicroRNA-214 and MicroRNA-126 Are Potential Biomarkers for Malignant Endothelial Proliferative Diseases », *Int J Mol Sci*, vol. 16, n° 10, p. 25377-25391, oct. 2015, doi: 10.3390/ijms161025377.
- [101] W. Oosthuizen *et al.*, « Sensitivity and specificity of microRNA-122 for liver disease in dogs », *J Vet Intern Med*, vol. 32, n° 5, p. 1637-1644, sept. 2018, doi: 10.1111/jvim.15250.
- [102] S. Ployetch, S. Roytrakul, J. Jaresithikunchai, N. Phaonakrop, S. Krobthong, et G. Suriyaphol, « Salivary proteomics of canine oral tumors using MALDI-TOF mass spectrometry and LC-tandem mass spectrometry », *PLOS ONE*, vol. 14, n° 7, p. e0219390, juill. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0219390.
- [103] L. Franco-Martínez *et al.*, « Changes in Serum and Salivary Proteins in Canine Mammary Tumors », *Animals*, vol. 10, n° 4, Art. n° 4, avr. 2020, doi: 10.3390/ani10040741.
- [104] A. Baykal et Ö. Turna, « Current invasive and non-invasive biomarkers in canine mammary tumors », *J Ist Vet Sci*, vol. 5, n° 1, Art. n° 1, avr. 2021, doi: 10.30704/http-www-jivs-net.892668.
- [105] L. Y. Pang et D. Argyle, « Cancer stem cells and telomerase as potential biomarkers in veterinary oncology », *The Veterinary Journal*, vol. 185, n° 1, p. 15-22, juill. 2010, doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.008.
- [106] A. Londoño-Vallejo, C. Lenain, et E. Gilson, « Cibler les télomères pour forcer les cellules cancéreuses à rentrer en sénescence », *Med Sci (Paris)*, vol. 24, n° 4, Art. n° 4, avr. 2008, doi: 10.1051/medsci/2008244383.
- [107] G. A. Kwong, S. Ghosh, L. Gamboa, C. Patriotis, S. Srivastava, et S. N. Bhatia, « Synthetic biomarkers: a twenty-first century path to early cancer detection », *Nat Rev Cancer*, vol. 21, n° 10, Art. n° 10, oct. 2021, doi: 10.1038/s41568-021-00389-3.
- [108] Frédérique NGUYEN, « Carcinomes mammaires canins et félins - UE105 Anatomie Pathologique et Cancérologie Spéciales », ONIRIS, 2021.
- [109] V. Shinde *et al.*, « Applications of Pathology-Assisted Image Analysis of Immunohistochemistry-Based Biomarkers in Oncology », *Vet Pathol*, vol. 51, n° 1, p. 292-303, janv. 2014, doi: 10.1177/0300985813511124.

- [110] J. P. B. O'Connor *et al.*, « Imaging biomarker roadmap for cancer studies », *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 14, n° 3, Art. n° 3, mars 2017, doi: 10.1038/nrclinonc.2016.162.
- [111] J. Gardiner, « Histiocytic Lineages », Histiocytosis / School of Veterinary Medicine. Consulté le: 8 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.histiocytosis.ucdavis.edu/histiocytosis/histiocytic-lineages>
- [112] J. Ascencio, L. Martignat, J. Abadie, U. de Nantes, et agroalimentaire et de l'alimentation Oniris - Ecole nationale vétérinaire, « Les mutations de PTPN11 dans le sarcome histiocytaire canin : association aux sous-types cliniques et données pronostiques », Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, 2021.
- [113] A. K. Fulmer et G. E. Mauldin, « Canine histiocytic neoplasia: An overview », *Can Vet J*, vol. 48, n° 10, p. 1041-1050, oct. 2007.
- [114] R. Kushwah et J. Hu, « Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system », *Immunology*, vol. 133, n° 4, p. 409-419, août 2011, doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03457.x.
- [115] Y. Kato *et al.*, « The class A macrophage scavenger receptor CD204 is a useful immunohistochemical marker of canine histiocytic sarcoma », *J Comp Pathol*, vol. 148, n° 2-3, p. 188-196, févr. 2013, doi: 10.1016/j.jcpa.2012.06.009.
- [116] F. Pierezan, J. Mansell, A. Ambrus, et A. Rodrigues Hoffmann, « Immunohistochemical expression of ionized calcium binding adapter molecule 1 in cutaneous histiocytic proliferative, neoplastic and inflammatory disorders of dogs and cats », *J Comp Pathol*, vol. 151, n° 4, p. 347-351, nov. 2014, doi: 10.1016/j.jcpa.2014.07.003.
- [117] K. M. Boes et A. C. Durham, « Bone Marrow, Blood Cells, and the Lymphoid/Lymphatic System », *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, p. 724-804.e2, 2017, doi: 10.1016/B978-0-323-35775-3.00013-8.
- [118] V. K. Affolter et P. F. Moore, « Localized and Disseminated Histiocytic Sarcoma of Dendritic Cell Origin in Dogs », *Vet Pathol*, vol. 39, n° 1, p. 74-83, janv. 2002, doi: 10.1354/vp.39-1-74.
- [119] P. F. Moore, V. K. Affolter, et W. Vernau, « Canine Hemophagocytic Histiocytic Sarcoma: A Proliferative Disorder of CD11d+ Macrophages », *Vet Pathol*, vol. 43, p. 632-645, 2006.
- [120] J. Abadie *et al.*, « Epidemiology, Pathology, and Genetics of Histiocytic Sarcoma in the Bernese Mountain Dog Breed », *Journal of Heredity*, vol. 100, n° suppl_1, p. S19-S27, juill. 2009, doi: 10.1093/jhered/esp039.
- [121] S. A. Erich, F. Constantino-Casas, J. M. Dobson, et E. Teske, « Morphological Distinction of Histiocytic Sarcoma from Other Tumor Types in Bernese Mountain Dogs and Flatcoated Retrievers », *In Vivo*, vol. 32, n° 1, p. 7-17, 2018, doi: 10.21873/invivo.11198.
- [122] K. Kennedy, R. Thomas, et M. Breen, « Canine Histiocytic Malignancies—Challenges and Opportunities », *Vet Sci*, vol. 3, n° 1, p. 2, janv. 2016, doi: 10.3390/vetsci3010002.
- [123] C. Mullin et C. A. Clifford, « Histiocytic Sarcoma and Hemangiosarcoma Update », *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, vol. 49, n° 5, p. 855-879, sept. 2019, doi: 10.1016/j.cvsm.2019.04.009.
- [124] J. Gardiner, « Overview of Histiocytic Diseases - Public Version », Histiocytosis / School of Veterinary Medicine. Consulté le: 8 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.histiocytosis.ucdavis.edu/histiocytosis/overview>
- [125] J. Gardiner, « Overview of Histiocytic Diseases - DVM Version », Histiocytosis / School of Veterinary Medicine. Consulté le: 12 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.histiocytosis.ucdavis.edu/histiocytosis/overview-histiocytic-diseases-dvm-version>
- [126] M. Pf et R. A., « Malignant histiocytosis of Bernese mountain dogs », *Veterinary pathology*, vol. 23, n° 1, janv. 1986, doi: 10.1177/030098588602300101.
- [127] N. G. Dervisis, M. Kiupel, Q. Qin, et L. Cesario, « Clinical prognostic factors in canine histiocytic sarcoma », *Vet Comp Oncol*, vol. 15, n° 4, p. 1171-1180, déc. 2017, doi: 10.1111/vco.12252.
- [128] K. M. Boerkamp *et al.*, « Gene expression profiling of histiocytic sarcomas in a canine model: the predisposed flatcoated retriever dog », *PLoS One*, vol. 8, n° 8, p. e71094, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0071094.

- [129] S. A. Erich, J. M. Dobson, et E. Teske, « Comparison of the Clinical Characteristics of Histiocytic Sarcoma in Bernese Mountain Dogs and Flat-Coated Retrievers », *Veterinary Sciences*, vol. 9, n° 9, Art. n° 9, sept. 2022, doi: 10.3390/vetsci9090498.
- [130] SHAIKEN L. C., EVANS S. M., et GOLDSCHMIDT M. H., « Radiographic findings in canine malignant histiocytosis », *Veterinary Radiology*, p. 237-242, 1991.
- [131] L. Nielsen, S. N. Andreasen, S. D. Andersen, et A. T. Kristensen, « Malignant histiocytosis and other causes of death in Bernese mountain dogs in Denmark », *Veterinary Record*, vol. 166, n° 7, p. 199-202, 2010, doi: 10.1136/vr.b4756.
- [132] S. A. Erich, G. R. Rutteman, et E. Teske, « Causes of death and the impact of histiocytic sarcoma on the life expectancy of the Dutch population of Bernese mountain dogs and Flat-coated retrievers », *The Veterinary Journal*, vol. 198, n° 3, p. 678-683, déc. 2013, doi: 10.1016/j.tvjl.2013.09.062.
- [133] M. Beaujard, « Causes de mortalité des chiens à l'école nationale vétérinaire de Toulouse entre septembre 2007 et septembre 2017: étude rétrospective », other, 2018. Consulté le: 8 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://oatao.univ-toulouse.fr/21385/>
- [134] Équipe Génétique du Chien du CNRS de Rennes, « Sarcome histiocytaire – Canine genetics ». Consulté le: 23 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://dog-genetics.genouest.org/sarcome-histiocytaire/>
- [135] Équipe Génétique du Chien du CNRS de Rennes, « CRB Cani-DNA | Institut de Génétique & Développement de Rennes », IGDR - Institut de Génétique & Développement de Rennes. Consulté le: 15 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://igdr.univ-rennes.fr/crb-cani-dna>
- [136] J. Gardiner, « Histiocytic sarcoma complex - general considerations », *Histiocytosis / School of Veterinary Medicine*. Consulté le: 19 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.histiocytosis.ucdavis.edu/histiocytosis/histiocytic-sarcoma-complex-general-considerations>
- [137] B. Hedan *et al.*, « Molecular cytogenetic characterization of canine histiocytic sarcoma: A spontaneous model for human histiocytic cancer identifies deletion of tumor suppressor genes and highlights influence of genetic background on tumor behavior », *BMC Cancer*, vol. 11, p. 201, mai 2011, doi: 10.1186/1471-2407-11-201.
- [138] T. Thaiwong, S. Sirivisoot, M. Takada, V. Yuzbasiyan-Gurkan, et M. Kiupel, « Gain-of-function mutation in PTPN11 in histiocytic sarcomas of Bernese Mountain Dogs », *Veterinary and Comparative Oncology*, vol. 16, n° 2, p. 220-228, 2018, doi: 10.1111/vco.12357.
- [139] ANTAGENE, « Sarcome Histiocytaire », ANTAGENE. Consulté le: 15 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://antagene.com/maladie/sarcome-histiocytaire>
- [140] A. Ruple et P. S. Morley, « Risk Factors Associated with Development of Histiocytic Sarcoma in Bernese Mountain Dogs », *J Vet Intern Med*, vol. 30, n° 4, p. 1197-1203, juill. 2016, doi: 10.1111/jvim.13964.
- [141] E. Masson, « Syndrome d'Evans : attention aux diagnostics par excès », *Rev Med*, vol. 33, n° 3, p. 155-158, févr. 2012, doi: 10.1016/j.revmed.2011.12.006.
- [142] L. E. Barrett, R. E. Pollard, A. Zwingenberger, A. Zierenberg-Ripoll, et K. A. Skorupski, « Radiographic characterization of primary lung tumors in 74 dogs », *Vet Radiol Ultrasound*, vol. 55, n° 5, p. 480-487, 2014, doi: 10.1111/vru.12154.
- [143] S. Tsai, J. Sutherland-Smith, K. Burgess, R. Ruthazer, et A. Sato, « Imaging characteristics of intrathoracic histiocytic sarcoma in dogs », *Vet Radiol Ultrasound*, vol. 53, n° 1, p. 21-27, 2012, doi: 10.1111/j.1740-8261.2011.01863.x.
- [144] Cruz-Arambulo, R. Wrigley, et B. Powers, « Sonographic features of histiocytic neoplasms in the canine abdomen », *Veterinary radiology & ultrasound: the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, vol. 45, n° 6, déc. 2004, doi: 10.1111/j.1740-8261.2004.04095.x.
- [145] L. N. Nielsen, F. McEvoy, L. R. Jessen, et A. T. Kristensen, « Investigation of a screening programme and the possible identification of biomarkers for early disseminated histiocytic sarcoma in Bernese Mountain dogs », *Veterinary and Comparative Oncology*, vol. 10, n° 2, p. 124-134, 2012, doi: 10.1111/j.1476-5829.2011.00285.x.

- [146] M. Takahashi *et al.*, « Clinical Characteristics and Prognostic Factors in Dogs with Histiocytic Sarcomas in Japan », *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 76, n° 5, p. 661-666, 2014, doi: 10.1292/jvms.13-0414.
- [147] K. A. Skorupski, C. O. Rodriguez, E. L. Krick, C. A. Clifford, R. Ward, et M. S. Kent, « Long-term survival in dogs with localized histiocytic sarcoma treated with CCNU as an adjuvant to local therapy* », *Veterinary and Comparative Oncology*, vol. 7, n° 2, p. 139-144, 2009, doi: 10.1111/j.1476-5829.2009.00186.x.
- [148] L. E. Craig, M. E. Julian, et J. D. Ferracone, « The diagnosis and prognosis of synovial tumors in dogs: 35 cases », *Vet Pathol*, vol. 39, n° 1, p. 66-73, janv. 2002, doi: 10.1354/vp.39-1-66.
- [149] K. W. Marlowe *et al.*, « Primary pulmonary histiocytic sarcoma in dogs: A retrospective analysis of 37 cases (2000-2015) », *Veterinary and Comparative Oncology*, vol. 16, n° 4, p. 658-663, 2018, doi: 10.1111/vco.12437.
- [150] J. Fidel *et al.*, « Histiocytic sarcomas in flat-coated retrievers: a summary of 37 cases (November 1998-March 2005) », *Vet Comp Oncol*, vol. 4, n° 2, p. 63-74, juin 2006, doi: 10.1111/j.1476-5810.2006.00090.x.
- [151] « Definition of lomustine - NCI Drug Dictionary - NCI ». Consulté le: 20 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/lomustine>
- [152] « Lomustine - an overview | ScienceDirect Topics ». Consulté le: 20 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/lomustine>
- [153] K. A. Skorupski *et al.*, « CCNU for the Treatment of Dogs with Histiocytic Sarcoma », *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 21, n° 1, p. 121-126, 2007, doi: 10.1111/j.1939-1676.2007.tb02937.x.
- [154] K. m. Rassnick *et al.*, « Phase II, Open-Label Trial of Single-Agent CCNU in Dogs with Previously Untreated Histiocytic Sarcoma », *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 24, n° 6, p. 1528-1531, 2010, doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0588.x.
- [155] J. Elliott, « Lomustine chemotherapy for the treatment of presumptive haemophagocytic histiocytic sarcoma in Flat-coated Retrievers », *Aust Vet J*, vol. 96, n° 12, p. 502-507, déc. 2018, doi: 10.1111/avj.12767.
- [156] R. M. Doka, S. E. Suter, M. L. Mastromauro, A. L. Bennett, et P. R. Hess, « Doxorubicin for treatment of histiocytic sarcoma in dogs: 31 cases (2003-2017) », *J Am Vet Med Assoc*, vol. 260, n° 14, p. 1827-1833, sept. 2022, doi: 10.2460/javma.21.11.0498.
- [157] C. Cannon, A. Borgatti, M. Henson, et B. Husbands, « Evaluation of a combination chemotherapy protocol including lomustine and doxorubicin in canine histiocytic sarcoma », *Journal of Small Animal Practice*, vol. 56, n° 7, p. 425-429, 2015, doi: 10.1111/jsap.12354.
- [158] K. A. Kezer, L. G. Barber, et S. H. Jennings, « Efficacy of dacarbazine as a rescue agent for histiocytic sarcoma in dogs », *Vet Comp Oncol*, vol. 16, n° 1, p. 77-80, mars 2018, doi: 10.1111/vco.12314.
- [159] S. L. Mason, R. Finotello, et L. Blackwood, « Epirubicin in the treatment of canine histiocytic sarcoma: sequential, alternating and rescue chemotherapy », *Vet Comp Oncol*, vol. 16, n° 1, p. E30-E37, mars 2018, doi: 10.1111/vco.12329.
- [160] R. M. Wouda, M. E. Miller, E. Chon, et T. J. Stein, « Clinical effects of vinorelbine administration in the management of various malignant tumor types in dogs: 58 cases (1997-2012) », *J Am Vet Med Assoc*, vol. 246, n° 11, p. 1230-1237, juin 2015, doi: 10.2460/javma.246.11.1230.
- [161] C. d. Tripp *et al.*, « Tolerability of Metronomic Administration of Lomustine in Dogs with Cancer », *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 25, n° 2, p. 278-284, 2011, doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0684.x.
- [162] T. N. Leach *et al.*, « Prospective trial of metronomic chlorambucil chemotherapy in dogs with naturally occurring cancer », *Vet Comp Oncol*, vol. 10, n° 2, p. 102-112, juin 2012, doi: 10.1111/j.1476-5829.2011.00280.x.
- [163] M. Bondarenko, « Chimiothérapie métronomique : stratégie thérapeutique prometteuse de prise en charge de l'hétérogénéité intratumorale par action sur le métabolisme énergétique pour contrôler la

- résistance aux traitements anti-cancéreux », These de doctorat, Aix-Marseille, 2021. Consulté le: 18 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2021AIXM0658>
- [164] M. Brossette, « La chimiothérapie métronomique chez le chien : étude bibliographique et rétrospective entre 2012 et 2021 », VETAGRO SUP, CAMPUS VETERINAIRE DE LYON, 2021.
- [165] M. Takada, M. Parys, E. Gregory-Bryson, P. Vilar Saavedra, M. Kiupel, et V. Yuzbasiyan-Gurkan, « A novel canine histiocytic sarcoma cell line: initial characterization and utilization for drug screening studies », *BMC Cancer*, vol. 18, p. 237, mars 2018, doi: 10.1186/s12885-018-4132-0.
- [166] S. Hafeman, C. London, R. Elmslie, et S. Dow, « Evaluation of liposomal clodronate for treatment of malignant histiocytosis in dogs », *Cancer Immunol Immunother*, vol. 59, n° 3, p. 441-452, mars 2010, doi: 10.1007/s00262-009-0763-y.
- [167] S. D. Hafeman, D. Varland, et S. W. Dow, « Bisphosphonates significantly increase the activity of doxorubicin or vincristine against canine malignant histiocytosis cells », *Vet Comp Oncol*, vol. 10, n° 1, p. 44-56, mars 2012, doi: 10.1111/j.1476-5829.2011.00274.x.
- [168] B. E. Favara *et al.*, « Contemporary classification of histiocytic disorders. The WHO Committee On Histiocytic/Reticulum Cell Proliferations. Reclassification Working Group of the Histiocyte Society », *Med Pediatr Oncol*, vol. 29, n° 3, p. 157-166, sept. 1997, doi: 10.1002/(sici)1096-911x(199709)29:3<157::aid-mpo1>3.0.co;2-c.
- [169] J. Krooks, M. Minkov, et K. Rappersberger, « Histiocytoses: A Review of the Most Recent Classification System », *Practical Dermatology*, vol. 18, n° 4, p. 41-52, avr. 2018.
- [170] J.-F. Emile *et al.*, « Revised classification of histiocytoses and neoplasms of the macrophage-dendritic cell lineages », *Blood*, vol. 127, n° 22, p. 2672-2681, juin 2016, doi: 10.1182/blood-2016-01-690636.
- [171] S. Dalia, M. Jaglal, P. Chervenick, H. Cualing, et L. Sokol, « Clinicopathologic characteristics and outcomes of histiocytic and dendritic cell neoplasms: the moffitt cancer center experience over the last twenty five years », *Cancers (Basel)*, vol. 6, n° 4, p. 2275-2295, nov. 2014, doi: 10.3390/cancers6042275.
- [172] J. A. Vos, S. L. Abbondanzo, C. L. Barekman, J. W. Andriko, M. Miettinen, et N. S. Aguilera, « Histiocytic sarcoma: a study of five cases including the histiocyte marker CD163 », *Mod Pathol*, vol. 18, n° 5, p. 693-704, mai 2005, doi: 10.1038/modpathol.3800346.
- [173] A. Kommalapati, S. H. Tella, M. Durkin, R. S. Go, et G. Goyal, « Histiocytic sarcoma: a population-based analysis of incidence, demographic disparities, and long-term outcomes », *Blood*, vol. 131, n° 2, p. 265-268, janv. 2018, doi: 10.1182/blood-2017-10-812495.
- [174] M. Rault, « Modèles spontanés de sarcomes chez l'Homme : le sarcome histiocytaire et le dermatofibrosarcome protubérant du chien », These de doctorat, Rennes 1, 2016. Consulté le: 27 février 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2016REN1B022>
- [175] M. Abitbol, « ADN, génotype et phénotype », Centrale Canine - LOF Select. Consulté le: 25 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.centrale-canine.fr/lofselect/articles/adn-genotype-et-phenotype>
- [176] « PTPN11 protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11 [Canis lupus familiaris (dog)] - Gene - NCBI ». Consulté le: 25 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Canis+lupus+familiaris+PTPN11>
- [177] M. Stein-Gerlach, C. Wallasch, et A. Ullrich, « SHP-2, SH2-containing protein tyrosine phosphatase-2 », *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 30, n° 5, p. 559-566, mai 1998, doi: 10.1016/s1357-2725(98)00002-8.
- [178] « PTPN11 protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI ». Consulté le: 25 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5781>
- [179] M. Tartaglia et B. D. Gelb, « PTPN11 (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type, 11) », Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Consulté le: 25 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: [https://atlasgeneticsoncology.org/gene/41910/ptpn11-\(protein-tyrosine-phosphatase-non-receptor-type-11\)](https://atlasgeneticsoncology.org/gene/41910/ptpn11-(protein-tyrosine-phosphatase-non-receptor-type-11))

- [180] « PTPN11 - protein-tyrosine-phosphatase - Canis lupus familiaris (Dog) | UniProtKB | UniProt ». Consulté le: 25 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A8I3P815/entry#sequences>
- [181] « PTPN11 - Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt ». Consulté le: 25 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q06124/entry>
- [182] M. Tartaglia *et al.*, « Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome », *Nat Genet*, vol. 29, n° 4, p. 465-468, déc. 2001, doi: 10.1038/ng772.
- [183] A. Ostman, C. Hellberg, et F. D. Böhmer, « Protein-tyrosine phosphatases and cancer », *Nat Rev Cancer*, vol. 6, n° 4, p. 307-320, avr. 2006, doi: 10.1038/nrc1837.
- [184] M. G. Mohi et B. G. Neel, « The role of Shp2 (PTPN11) in cancer », *Curr Opin Genet Dev*, vol. 17, n° 1, p. 23-30, févr. 2007, doi: 10.1016/j.gde.2006.12.011.
- [185] « Src — acadpharm ». Consulté le: 25 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://dictionnaire.acadpharm.org/w/Src>
- [186] T. Matozaki, Y. Murata, Y. Saito, H. Okazawa, et H. Ohnishi, « Protein tyrosine phosphatase SHP-2: a proto-oncogene product that promotes Ras activation », *Cancer Sci*, vol. 100, n° 10, p. 1786-1793, oct. 2009, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01257.x.
- [187] M. Marasco, J. Kirkpatrick, T. Carlomagno, J. S. Hub, et M. Anselmi, « Experiment-guided molecular simulations define a heterogeneous structural ensemble for the PTPN11 tandem SH2 domains », *Chemical Science*, vol. 14, n° 21, p. 5743-5755, 2023, doi: 10.1039/D3SC00746D.
- [188] N. K. Tonks, « Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 7, n° 11, p. 833-846, nov. 2006, doi: 10.1038/nrm2039.
- [189] C.-K. Qu, « Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response », *Biochim Biophys Acta*, vol. 1592, n° 3, p. 297-301, nov. 2002, doi: 10.1016/s0167-4889(02)00322-1.
- [190] P. Hof, S. Pluskey, S. Dhe-Paganon, M. J. Eck, et S. E. Shoelson, « Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2 », *Cell*, vol. 92, n° 4, p. 441-450, févr. 1998, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80938-1.
- [191] D. Barua, J. R. Faeder, et J. M. Haugh, « Structure-Based Kinetic Models of Modular Signaling Protein Function: Focus on Shp2 », *Biophys J*, vol. 92, n° 7, p. 2290-2300, avr. 2007, doi: 10.1529/biophysj.106.093484.
- [192] J. R. LaRochelle *et al.*, « Structural reorganization of SHP2 by oncogenic mutations and implications for oncoprotein resistance to allosteric inhibition », *Nat Commun*, vol. 9, n° 1, Art. n° 1, oct. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-06823-9.
- [193] H. F. Lodish *et al.*, *Molecular cell biology*, 6th ed. New York: W.H. Freeman, 2008. Consulté le: 22 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://catdir.loc.gov/catdir/toc/ecip0710/2007006188.html>
- [194] K. Newkirk, E. Brannick, et D. Kusewitt, « Neoplasia and Tumor Biology1 », in *Pathologic Basis of Veterinary Disease Expert Consult*, 2017, p. 286-321.e1. doi: 10.1016/B978-0-323-35775-3.00006-0.
- [195] G. Favre, « Le devenir des thérapeutiques ciblant la voie RAS/RAF/MEK/ERK en cancérologie : l'exemple des mélanomes », présenté à Le devenir des thérapeutiques ciblant la voie RAS/RAF/MEK/ERK en cancérologie : l'exemple des mélanomes, in *Bull. Acad. Natle Méd*, vol. 198, févr. 2014, p. 321-338. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.academie-medecine.fr/wp-content/uploads/2015/06/pages-321-338.pdf>
- [196] C. Niogret, W. Birchmeier, et G. Guarda, « SHP-2 in Lymphocytes' Cytokine and Inhibitory Receptor Signaling », *Front Immunol*, vol. 10, p. 2468, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02468.
- [197] S. C. Wei, C. R. Duffy, et J. P. Allison, « Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy », *Cancer Discovery*, vol. 8, n° 9, p. 1069-1086, sept. 2018, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0367.
- [198] M. G. Mohi *et al.*, « Prognostic, therapeutic, and mechanistic implications of a mouse model of leukemia evoked by Shp2 (PTPN11) mutations », *Cancer Cell*, vol. 7, n° 2, p. 179-191, févr. 2005, doi: 10.1016/j.ccr.2005.01.010.

- [199] Y.-J. Guo, W.-W. Pan, S.-B. Liu, Z.-F. Shen, Y. Xu, et L.-L. Hu, « ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis », *Exp Ther Med*, vol. 19, n° 3, p. 1997-2007, mars 2020, doi: 10.3892/etm.2020.8454.
- [200] P. Bandaru, Y. Kondo, et J. Kuriyan, « The Interdependent Activation of Son-of-Sevenless and Ras », *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 9, n° 2, p. a031534, févr. 2019, doi: 10.1101/cshperspect.a031534.
- [201] C. Lorenzo et F. McCormick, « SPRED proteins and their roles in signal transduction, development, and malignancy », *Genes Dev*, vol. 34, n° 21-22, p. 1410-1421, nov. 2020, doi: 10.1101/gad.341222.120.
- [202] S. Jakob *et al.*, « Nuclear Protein Tyrosine Phosphatase Shp-2 Is One Important Negative Regulator of Nuclear Export of Telomerase Reverse Transcriptase », *J Biol Chem*, vol. 283, n° 48, p. 33155-33161, nov. 2008, doi: 10.1074/jbc.M805138200.
- [203] D. Xu *et al.*, « Non-lineage/stage-restricted effects of a gain-of-function mutation in tyrosine phosphatase Ptpn11 (Shp2) on malignant transformation of hematopoietic cells », *J Exp Med*, vol. 208, n° 10, p. 1977-1988, sept. 2011, doi: 10.1084/jem.20110450.
- [204] G. Coulombe *et al.*, « SHP-2 Phosphatase Prevents Colonic Inflammation by Controlling Secretory Cell Differentiation and Maintaining Host-Microbiota Homeostasis », *J Cell Physiol*, vol. 231, n° 11, p. 2529-2540, nov. 2016, doi: 10.1002/jcp.25407.
- [205] M. Tartaglia *et al.*, « Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease », *Am J Hum Genet*, vol. 78, n° 2, p. 279-290, févr. 2006, doi: 10.1086/499925.
- [206] M. I. Kontaridis, K. D. Swanson, F. S. David, D. Barford, et B. G. Neel, « PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects », *J Biol Chem*, vol. 281, n° 10, p. 6785-6792, mars 2006, doi: 10.1074/jbc.M513068200.
- [207] J. P. Athota *et al.*, « Molecular and clinical studies in 107 Noonan syndrome affected individuals with PTPN11 mutations », *BMC Medical Genetics*, vol. 21, mars 2020, doi: 10.1186/s12881-020-0986-5.
- [208] M. Tartaglia *et al.*, « Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia », *Nat Genet*, vol. 34, n° 2, p. 148-150, juin 2003, doi: 10.1038/ng1156.
- [209] M. C. Digilio *et al.*, « Grouping of multiple-lentigines/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene », *Am J Hum Genet*, vol. 71, n° 2, p. 389-394, août 2002, doi: 10.1086/341528.
- [210] E. Legius, C. Schrandt-Stumpel, E. Schollen, C. Pulles-Heintzberger, M. Gewillig, et J.-P. Fryns, « PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome », *J Med Genet*, vol. 39, n° 8, p. 571-574, août 2002, doi: 10.1136/jmg.39.8.571.
- [211] M. C. Digilio *et al.*, « Familial aggregation of genetically heterogeneous hypertrophic cardiomyopathy: a boy with LEOPARD syndrome due to PTPN11 mutation and his nonsyndromic father lacking PTPN11 mutations », *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, vol. 70, n° 2, p. 95-98, févr. 2004, doi: 10.1002/bdra.10148.
- [212] M. L. Loh *et al.*, « Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis », *Blood*, vol. 103, n° 6, p. 2325-2331, mars 2004, doi: 10.1182/blood-2003-09-3287.
- [213] M. Tartaglia *et al.*, « Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia », *Blood*, vol. 104, n° 2, p. 307-313, juill. 2004, doi: 10.1182/blood-2003-11-3876.
- [214] « Cancers de l'enfant : le neuroblastome | Institut Curie ». Consulté le: 6 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://curie.fr/dossier-pedagogique/cancers-de-lenfant-le-neuroblastome>
- [215] M. Bentires-Alj *et al.*, « Activating mutations of the noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia », *Cancer Res*, vol. 64, n° 24, p. 8816-8820, déc. 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1923.
- [216] S. Lee, « Qu'est-ce que le neuroblastome? », Société canadienne du cancer. Consulté le: 6 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/neuroblastoma/what-is-neuroblastoma>

- [217] J. Zhang, F. Zhang, et R. Niu, « Functions of Shp2 in cancer », *J Cell Mol Med*, vol. 19, n° 9, p. 2075-2083, sept. 2015, doi: 10.1111/jcmm.12618.
- [218] Q. Liu, K. Tomaszewicz, L. Hutchinson, J. L. Hornick, B. Woda, et H. Yu, « Somatic mutations in histiocytic sarcoma identified by next generation sequencing », *Virchows Arch*, vol. 469, n° 2, p. 233-241, août 2016, doi: 10.1007/s00428-016-1965-2.
- [219] S. Batra, S. Martin, M. Nassiri, A. Qureshi, et T. Markel, « Histiocytic Sarcoma Associated with Coombs Negative Acute Hemolytic Anemia: A Rare Presentation », *Case Reports in Oncological Medicine*, vol. 2016, p. 1-5, juin 2016, doi: 10.1155/2016/3179147.
- [220] Q. Zhang, A. Shibani, B. Sadikovic, C. J. Howlett, et L.-C. Ang, « An aggressive multifocal primary CNS histiocytosis with PTPN11 (Shp2) mutation », *Neuropathol Appl Neurobiol*, vol. 44, n° 2, p. 240-243, févr. 2018, doi: 10.1111/nan.12404.
- [221] S. Voruz *et al.*, « Response to MEK inhibition with trametinib and tyrosine kinase inhibition with imatinib in multifocal histiocytic sarcoma », *Haematologica*, vol. 103, n° 1, p. e39-e41, janv. 2018, doi: 10.3324/haematol.2017.179150.
- [222] V. Shanmugam, G. K. Griffin, E. D. Jacobsen, C. D. M. Fletcher, L. M. Sholl, et J. L. Hornick, « Identification of diverse activating mutations of the RAS-MAPK pathway in histiocytic sarcoma », *Mod Pathol*, vol. 32, n° 6, p. 830-843, juin 2019, doi: 10.1038/s41379-018-0200-x.
- [223] C. Egan *et al.*, « Genomic profiling of primary histiocytic sarcoma reveals two molecular subgroups », *Haematologica*, vol. 105, n° 4, p. 951-960, avr. 2020, doi: 10.3324/haematol.2019.230375.
- [224] T. Niihori *et al.*, « Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia », *J Hum Genet*, vol. 50, n° 4, p. 192-202, 2005, doi: 10.1007/s10038-005-0239-7.
- [225] T. Moal, J. Abadie, S. Bézieau, et C. Ibisch, « Étude du gène PTPN11 et de ses mutations dans les principales tumeurs affectant les Bouviers Bernois », Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, 2022.
- [226] J. Phallen *et al.*, « Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA », *Science Translational Medicine*, vol. 9, n° 403, p. eaan2415, août 2017, doi: 10.1126/scitranslmed.aan2415.
- [227] N. Bracco, J. Abadie, C. Ibisch, U. de Nantes, et agroalimentaire et de l'alimentation Oniris - Ecole nationale vétérinaire, « Le sarcome histiocytaire canin : étude rétrospective des caractéristiques épidémiocliniques et des facteurs pronostiques sur une cohorte de 93 cas », Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes Atlantique, 2019.
- [228] E. Thiéry, M. Abitbol, U. C. Bernard (Lyon), et V. Sup, « Etude d'une cohorte de Bouviers bernois génotypés pour des allèles de prédisposition au sarcome histiocytaire », Université Claude Bernard Lyon 1, 2020.
- [229] A. Lamory, « Causes de mortalité chez le Bouvier Bernois, enquête épidémiologique sur l'histiocytose maligne du Bouvier Bernois », Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 2014.
- [230] S. Bouchard, « Sarcome histiocytaire disséminé du chien: lien entre profil génétique et localisation anatomique », Thèse d'exercice, Nantes Université. Pôle Santé. UFR Médecine et Techniques Médicales, Nantes, France, 2020.
- [231] M. Klopfenstein, J. Howard, M. Rossetti, et U. Geissbühler, « Life expectancy and causes of death in Bernese mountain dogs in Switzerland », *BMC Vet Res*, vol. 12, n° 1, p. 153, juill. 2016, doi: 10.1186/s12917-016-0782-9.
- [232] P. Hartmann, K. F. Stock, et O. Distl, « Life expectancy and causes of death in Bernese mountain dogs. », *Praktische Tierarzt*, vol. 92, n° 6, p. 472-478, 2011.
- [233] V. J. Adams, K. M. Evans, J. Sampson, et J. L. N. Wood, « Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK », *J Small Anim Pract*, vol. 51, n° 10, p. 512-524, oct. 2010, doi: 10.1111/j.1748-5827.2010.00974.x.
- [234] « UCSC Genome Browser Home ». Consulté le: 9 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://genome.ucsc.edu/index.html>
- [235] « NucleoSpin Tissue, Mini kit for DNA from cells and tissue », MACHEREY-NAGEL. Consulté le: 1 mars 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.mn-net.com/fr/nucleospin-tissue-mini-kit-for-dna-from-cells-and-tissue-740952.50>

- [236] L. Martignat, « Outils & Techniques de Biologie Moléculaire - Document de Cours », Oniris, ENVN (Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes), 2018.
- [237] « NucleoSnap cfDNA kit for cell-free DNA from plasma », MACHEREY-NAGEL. Consulté le: 2 mars 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.mn-net.com/fr/nucleosnap-cfdna-kit-for-cell-free-dna-from-plasma-740300.50>
- [238] C. Bianchi, « UTILISATION DE LA DIGITALE PCR BIORAD POUR LA DETECTION DE MUTATIONS ». 12 janvier 2023.
- [239] « ddPCR ou PCR digitale », CHUV. Consulté le: 5 mars 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.chuv.ch/fr/log/accueil/prestations/ddpcr-ou-pcr-digitale>
- [240] C. Audebert, « PCR digitale | biorigami », Biorigami. Consulté le: 10 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.biorigami.com/?tag=pcr-digitale>
- [241] S. L. Klahn, B. E. Kitchell, et N. G. Dervisis, « Evaluation and comparison of outcomes in dogs with periarticular and nonperiarticular histiocytic sarcoma », *J Am Vet Med Assoc*, vol. 239, n° 1, p. 90-96, juill. 2011, doi: 10.2460/javma.239.1.90.
- [242] K. Paździor-Czapula, T. Rotkiewicz, I. Otrocka-Domagala, M. Gesek, et A. Śmiech, « Morphology and immunophenotype of canine cutaneous histiocytic tumours with particular emphasis on diagnostic application », *Vet Res Commun*, vol. 39, n° 1, p. 7-17, 2015, doi: 10.1007/s11259-014-9622-1.
- [243] « Figure 13 : Caractéristiques phénotypiques des cellules cancéreuses Les... », ResearchGate. Consulté le: 12 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Caracteristiques-phenotypiques-des-cellules-cancereuses-Les-caracteristiques-des_fig12_324121784
- [244] « GRAIL Presents Interventional PATHFINDER Study Data at 2021 ASCO Annual Meeting and Introduces Galleri, a Groundbreaking Multi-Cancer Early Detection Blood Test », GRAIL. Consulté le: 12 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://grail.com/press-releases/grail-presents-interventional-pathfinder-study-data-at-2021-asco-annual-meeting-and-introduces-galleri-a-groundbreaking-multi-cancer-early-detection-blood-test/>
- [245] H. Tani, S. Kurita, R. Miyamoto, K. Ochiai, K. Tamura, et M. Bonkobara, « Canine histiocytic sarcoma cell lines with SHP2 p.Glu76Gln or p.Glu76Ala mutations are sensitive to allosteric SHP2 inhibitor SHP099 », *Vet Comp Oncol*, vol. 18, n° 2, p. 161-168, juin 2020, doi: 10.1111/vco.12524.
- [246] H. Tani, R. Miyamoto, T. Nagashima, M. Michishita, K. Tamura, et M. Bonkobara, « Molecular characterization of canine SHP2 mutants and anti-tumour effect of SHP2 inhibitor, SHP099, in a xenograft mouse model of canine histiocytic sarcoma », *Vet Comp Oncol*, vol. 20, n° 1, p. 109-117, mars 2022, doi: 10.1111/vco.12751.
- [247] R. Frankson, Z.-H. Yu, Y. Bai, Q. Li, R.-Y. Zhang, et Z.-Y. Zhang, « Therapeutic Targeting of Oncogenic Tyrosine Phosphatases », *Cancer Res*, vol. 77, n° 21, p. 5701-5705, nov. 2017, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1510.
- [248] « Prévention et gestion des effets indésirables : tramétinib - Molécules de S à Z (d.c.i) ». Consulté le: 12 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Medicaments/Prevention-suivi-et-gestion-des-effets-indesirables/Molecules-de-S-a-Z-d.c.i/Trametinib>
- [249] M. P. Starkey, T. J. Scase, C. S. Mellersh, et S. Murphy, « Dogs really are man's best friend--canine genomics has applications in veterinary and human medicine! », *Brief Funct Genomic Proteomic*, vol. 4, n° 2, p. 112-128, juill. 2005, doi: 10.1093/bfgp/4.2.112.
- [250] « Code international des acides aminés ». Consulté le: 4 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://acces.ens-lyon.fr/biotic/evolut/phylogene/documentation/html/codeAA.htm>

ANNEXES

Annexe 1 : Biomarqueurs tissulaires et liquides des tumeurs des glandes mammaires. D'après Kzszak *et al.*, 2022. [36]

Biomarker/Biomarkers	Function	Main Finding
cyclin D1, cyclin E1,	Cell cycle	cyclin D1 overexpression is commonly related with metastasis and shorter life expectancy
Ki-67, PCNA	Proliferation	expression of Ki-67 and PCNA positively correlates with cancer progression
HER-2	Proliferation	there is a correlation between HER-2 expression and tumor mitotic index, high histological grade, and tumor size
PD-1	Apoptosis	most canine mammary tumor show expression of the PD-L1
p53	Apoptosis	p53 expression was connected with high proliferative activity and high histological grade
E-cadherin	Cell adhesion	downregulation of E-cadherin expression is connected with increased tumor growth and disease spreading, tumor malignancy, the aggressiveness of metastases, and short life expectancy
CEA, CA 15-3	Cell adhesion	both positively correlate with the presence of metastases, tumor dimension, and histological grade, it is recommended for them to be evaluated together
ER, PR	Hormone receptors	the expression of ER or PR was more common in non-malignant tumors, and usually was connected with better clinical outcome
5-hydroxyindolacetic acid, serotonin, indoxyl sulphate, and kynurenic acid, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine and epinephrine	Metabolites of tyrosine and tryptophan	detected in samples of the urine in CMTs patients
HYAL-1	Gene encoding lysosomal hyaluronidase	a possible biomarker linked with cell growth, migration, invasion, and angiogenesis
BRCA1, BRCA2	Genes involved in DNA repair	The 97.9% of dogs with CMT had one up to three genetic variations out of the seven
miR-214 and miR-126	miRNA	remarkably up-regulated in serum of bitches with mammary carcinoma
miR-18a	miRNA	seemed to be a good prognostic factor
miR-21	miRNA	be more sensitive than other commonly used markers
CD204+ macrophages	Inflammatory cell infiltration	In dogs with III grade CMTs, the number of CD204-positive macrophages was greater than in grades I and II
LT CD3+, LTCD4+	Inflammatory cell infiltration	high CD3+ and CD4+ cells in the tumor tissue correlate with shorter survival time
LT FoxP3+	Inflammatory cell infiltration	a big number of intratumoral FoxP3+ cells was related to defective differentiation of tumors, high histological grade of malignancy, and increased angiogenesis, thus guarded prognosis
COX-2	Inflammatory markers	increased expression is correlated with the histological grade of malignancy
VEGF, TNF- α , TGF- β 1	pro-inflammatory and pro-tumoral cytokines and chemokines	CMT cytokines expression seems to be a marker of canine mammary tumors malignancy
MCP-1, MCP-2, PDGF-BB, RANTES, SCF	pro-inflammatory cytokines	expressed in tumors with higher aggressiveness
IL-35	interleukin	connected with worse overall survival by increased histological grade of malignancy, mitotic index, neoplastic intravascular emboli, and lymph node metastasis
CXCR3, CCR2, IL-4, IL-12p40	pro-inflammatory cytokines and interleukines	cytokines connected with T lymphocyte activity are upregulated

**Annexe 2 : Biomarqueurs tissulaires utilisés pour les ostéosarcomes canins localisés aux membres.
D'après Luu *et al*, 2023. [66]**

Molecule/factor	Diagnostic	Disease-free interval (DFI)	Overall survival (OS)	Other
Tissue biopsies				
EGFR	High levels of EGFR mRNA in OSA compared to normal bone	Higher levels of EGFR protein associated with shorter DFI	Higher levels of EGFR protein associated with shorter OS	
B catenin		Moderate/high cytoplasmic protein levels associated with metastasis (35); No association found in (36)	No association with survival (36)	No difference in B catenin mRNA and protein levels between patients with high vs. normal ALP (37)
HER2	40% of canine OSA tissue had higher levels of HER2 mRNA than normal bone		HER2 negative tumors had 115-day shorter survival time	
PDGFalpha and beta/PDGFRalpha and beta		No association	No association	
Notch/HES1	High levels of Notch 2 receptor, HES1, and HES5 mRNA in bone tumor samples compared to normal bone	HES1 mRNA higher patients with DFI > 300; Low levels of HES1 protein associated with shorter DFI		
TAZ/YAP and pSmad2		High levels of pSmad2 and YAP immunolabelling associated with earlier metastasis	High levels of pSmad2 and YAP immunolabelling associated with shorter survival; no associations with mRNA levels	
IGFR1			High levels associated with shorter OS	
PTI IR1/PTI IrP			High levels of PTI IR associated with survival; not significant for PTI IrP	
TP53			Moderate/high nuclear TP53 associated with shorter OS	
Survivin		Nuclear survivin correlated with longer DFI	High immunoreactivity predicted shorter DFI (14) Nuclear survivin correlated with longer OS	Nuclear survivin correlated with caspase 3
CDKN2A (P16)		Presence of P16 staining had no associations with metastasis	Presence of P16 staining trending toward a shorter survival time (not significant)	
Ezrin		High levels of Ezrin associated with shorter DFI		
CD204 ⁺ macrophages		High CD204 ⁺ macrophages in tumor tissue associated with improved DFI (47)		CD204 ⁺ macrophages are higher in pulmonary metastases (48)
CD3 ⁺ and FOXP3 ⁺ cells				CD3 ⁺ lymphocytes and FOXP3 ⁺ cells in primary OSA tissue correlated with those in metastatic lesions; T- and B-lymphocytes are higher in pulmonary metastases
miR-223-3p, miR-130a-3p, let-7b-5p		miR-223-3p, miR-130a-3p, and let-7b-5p was able to determine high DFI risk (123.5 days) from low DFI risk (392 days)		

Annexe 3 : Comparaison des signes cliniques chez des Flat-Coated Retriever et chez des Bouviers Bernois atteints de sarcome histiocytaire. D'après Erich *et al.*, 2022. [129]

Parameter	FCR	BMD	<i>p</i> -Value
Number of dogs	289	365	
Pale mucous membranes	67 (23.3%)	151 (41.4%)	<0.001
Icterus	9 (3.1%)	26 (7.1%)	0.023
Pyrexia	35 (12.2%)	92 (25.3%)	<0.001
Lameness	114 (39.5%)	87 (23.8%)	<0.001
Front leg	89 (78.1%)	38 (43.7%)	<0.001
Hind leg	25 (21.9%)	44 (56.3%)	
Neurologic Symptoms	13 (4.5%)	14 (3.8%)	0.776
Ataxia	2	7	
Epilepsy	2	2	
Paresis/paralysis	10	10	
Weight loss	46 (15.9%)	132 (36.2%)	<0.001
Ascites	5 (1.7%)	15 (4.1%)	0.078
Anorexia	75 (26.0%)	207 (56.7%)	<0.001
Vomiting	19 (6.6%)	29 (7.9%)	0.504
Diarrhea	5 (1.7%)	10 (2.7%)	0.389
Polydipsia	21 (7.3%)	30 (8.2%)	0.652
Dyspnoea	19 (6.6%)	38 (10.4%)	0.080
Coughing	13 (4.5%)	41 (11.2%)	0.001
Lethargy	98 (33.9%)	215 (58.9%)	<0.001

Annexe 4 : Résultats des analyses sanguines selon les races (Flat-Coated Retrievers (FCR) ou Bouviers Bernois (BMD : *Bernese Mountain Dogs*)) et selon le type de sarcome histiocytaire (localisé (LHS : *Localized Histiocytic Sarcoma*) ou disséminé (DHS : *Disseminated Histiocytic Sarcoma*)). D'après Erich *et al.*, 2022. [129] – PCV : *Packed Cell Volume* (hématocrite)

Parameter	FCR	BMD	<i>p</i> -Value	LHS	DHS	<i>p</i> -Value
Anemia						
PCV < ref.value	58/78 (74.4%)	124/160 (77.0%)	0.650	46/67 (68.7%)	136/171 (79.5%)	0.075
PCV < 0.30 l/l	24/78 (30.8%)	63/160 (39.1%)	0.384	9/67 (13.4%)	78/171 (45.6%)	<0.001
Leukocytosis	15/44 (34.1%)	72/108 (66.7%)	<0.001	20/39 (51.3%)	67/113 (59.3%)	0.383
Thrombocytopenia	14/41 (34.1%)	52/94 (55.3%)	0.027	7/31 (22.6%)	59/104 (56.7%)	0.003
Elevated AP	34/43 (79.1%)	60/87 (69.0%)	0.316	21/33 (63.6%)	70/93 (75.2%)	0.200
Hypoalbuminemia	26/41 (63.4%)	61/94 (64.9%)	0.869	14/36 (38.9%)	65/99 (65.7%)	0.626
Hypercalcemia	0/23 (0%)	15/53 (28.3%)	<0.001	4/23 (17.4%)	11/53 (20.8%)	0.735
Abn. coagulation	4/5	8/17	0.179	1/3	11/19	0.427

Code international des acides aminés

- **G** - Glycine (Gly)
- **P** - Proline (Pro)
- **A** - Alanine (Ala)
- **V** - Valine (Val)
- **L** - Leucine (Leu)
- **I** - Isoleucine (Ile)
- **M** - Methionine (Met)
- **C** - Cysteine (Cys)
- **F** - Phenylalanine (Phe)
- **Y** - Tyrosine (Tyr)
- **W** - Tryptophan (Trp)
- **H** - Histidine (His)
- **K** - Lysine (Lys)
- **R** - Arginine (Arg)
- **Q** - Glutamine (Gln)
- **N** - Asparagine (Asn)
- **E** - Glutamic Acid (Glu)
- **D** - Aspartic Acid (Asp)
- **S** - Serine (Ser)
- **T** - Threonine (Thr)

Annexe 6 : Mutations génomiques identifiées par séquençage de l'exome entier et confirmées par séquençage de Sanger, chez cinq chiens atteints de sarcome histiocytaire. D'après Asada *et al.*, 2023. [9]

Dog	Gene name	Gene ID	Amino acid change	Chromosome
Dog 1	CCDC136	ENSCAFG00000023734	p.R870W	14
	TP53	ENSCAFG00000016714	p.I151fs	5
Dog 2	BBX	ENSCAFG00000009867	p.D53Y	33
	N4BP2	ENSCAFG00000015929	p.S1282F	3
	PDGFRB	ENSCAFG00000018214	p.D881_I882delinsV	4
Dog 3	ATRX	ENSCAFG00000017252	p.L2119fs	X
	GARNL3	ENSCAFG00000020142	p.R204*	9
	IITR2C	ENSCAFG00000029120	p.R156H	X
	NR3C2	ENSCAFG00000007813	p.R780*	15
	NRXN3	ENSCAFG00000030472	p.V262A	8
	SH3KBP1	ENSCAFG00000013075	p.R423*	X
	TP53	ENSCAFG00000016714	p.D11fs	5
Dog 4	NAV3	ENSCAFG00000005746	p.A343T	15
	PTPN11	ENSCAFG00000008894	p.G503V	26
	ZMYM3	ENSCAFG00000017043	p.R295C	X
Dog 5	AKAP4	ENSCAFG00000015984	p.Q669*	X
	ASMT	ENSCAFG00000024670	p.G168R	X
	C7	ENSCAFG00000018608	p.L726S	4
	CLCA4	ENSCAFG00000020244	p.M325T	6
	COL11A1	ENSCAFG00000019985	p.P1193T	6
	FBN1	ENSCAFG00000014548	p.E2759G	30
	FRAS1	ENSCAFG00000008752	p.I1313fs	32
	FREM2	ENSCAFG00000006019	p.D1252Y	25
	GGNBP2	ENSCAFG00000017839	NA	9
	LAMA1	ENSCAFG00000018597	p.S3027F	7
	MLEC	ENSCAFG00000010408	p.E109K	26
	MTX2	ENSCAFG00000013416	p.L157_Y159del	36
	NUGGC	ENSCAFG00000008347	p.R651fs	25
	OPCML	ENSCAFG00000009842	p.N40H	5
	PDGFD	ENSCAFG00000032342	p.S265T	5
	PTPN11	ENSCAFG00000008894	p.E76K	26
	RELN	ENSCAFG00000025345	p.I819M	18
	RIPK1	ENSCAFG00000009321	p.L659fs	35
	SLC6A13	ENSCAFG00000015769	p.R413H	27
SMARCA1	ENSCAFG00000014421	p.R652C	37	

Annexe 7 : Protocole joint au kit de prélèvement sanguin avec un questionnaire clinique, à destination des vétérinaires traitants, dans le cadre de l'étude génétique sur le sarcome histiocytaire menée par l'Équipe « Génétique du Chien de l'IGDR (UMR 6290 CNRS-UR1).



Équipe « Génétique du chien »
UMR 6290 CNRS – Université de Rennes 1
2 avenue du Pr Léon Bernard 35 043 Rennes Cedex
Tél : 02 23 23 45 09 Mail : cani-dna@univ-rennes1.fr
<http://dog-genetics.genouest.org>



Etude génétique sur le Sarcome Histiocytaire

Dans le cadre du travail de recherche que nous menons sur les causes génétiques du Sarcome Histiocytaire (chez le Bouvier bernois, le Flat Coated Retriever, le Rottweiler et d'autres races), en collaboration avec les Drs P. Devauchelle (ENVA) et J. Abadie (ENVN), nous souhaiterions recueillir des échantillons sanguins de chiens sains et atteints ainsi que leurs apparentés.

Pouvez-vous nous envoyer :

- **5 ml de sang** sur anticoagulant (EDTA) (bien mélanger le tube par retournement pour éviter la coagulation du sang). **Centrifuger le tube et renvoyer séparément le culot de cellules (dans le tube EDTA) et le plasma (dans tube sec).**
- **Un questionnaire clinique à remplir** (fourni par nos soins) **et une copie du pedigree**

Et si le chien est malade :

- **un prélèvement de tumeur et un prélèvement de tissu sain** (même organe mais sain à au moins 3 cm de la tumeur). **Couper** chaque prélèvement en 2 petits fragments de quelques mm³. En mettre un dans le tube contenant la solution **RNA-later** (fournie par nos soins). *Rem : La solution RNA later (Quiagen) se garde à température ambiante et doit être manipulée avec des gants.* Mettre le second échantillon dans un tube de **formol** (fourni par nos soins) pour une contre-analyse histologique faite à l'ENVN.

A noter sur chaque tube : le prélèvement (tumeur ou sain), la nature de l'organe prélevé, le nom du chien et la date.

Dès les prélèvements effectués, mettre à 4° C et envoyer **rapidement** par la poste (ex : lettre MAX) à température ambiante hors week-end et jours fériés.

Ce prélèvement n'engage aucuns frais supplémentaires pour le propriétaire : soit le vétérinaire consent à la gratuité de l'acte dans le cadre de la recherche, soit le vétérinaire transmet une facture à l'ordre du **CNRS UMR 6290**. Le **remboursement par virement bancaire** du CNRS ne s'effectuera que sur présentation d'un RIB et du numéro de SIRET de la clinique.

Les prélèvements qui nous sont envoyés entreront anonymement dans le cadre d'une étude globale. Il n'y aura donc pas de résultat individuel.

Nous vous remercions chaleureusement de votre collaboration, cette étape de recrutement est indispensable à la réussite de ces recherches. N'hésitez pas à nous contacter ou à consulter notre site pour tous renseignements complémentaires.

Dr Catherine ANDRE

Annexe 8 : Protocole d'extraction d'ADN avec le kit « NucleoSpin® Tissue, Mini kit for DNA from cells and tissue » du laboratoire MACHEREY-NAGEL. [235]

1 Prepare sample

Tissue

Cut 25 mg human or animal tissue into small pieces. Place the sample in a microcentrifuge tube (not provided). Proceed with step 2.

Samples that are difficult to lyse can be ground under liquid nitrogen or may be treated in a mechanical homogenizer (Polytron®, Ultra-Turrax®): Add 25 mg of tissue to a 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided), add 50–75 µL phosphate buffered saline (PBS) and homogenize.

Cultured cells

Resuspend up to 10^7 cells in a final volume of 200 µL Buffer T1. Add 25 µL Proteinase K solution and 200 µL Buffer B3. Vortex to mix and incubate the sample at 70 °C for 10–15 min. **Proceed with step 4.**

2 Pre-lyse sample

Add 180 µL Buffer T1 and 25 µL Proteinase K solution. Vortex to mix. Be sure that the samples are completely covered with lysis solution.



+180 µL T1
+25 µL
Proteinase K
Mix

If processing several samples, Proteinase K and Buffer T1 may be premixed directly before use. Do not mix Buffer T1 and Proteinase K more than 10–15 min before addition to the sample: Proteinase K tends to self-digest in Buffer T1 without substrate.

Incubate at 56 °C until complete lysis is obtained (**at least 1–3 h**). Vortex occasionally during incubation or use a shaking incubator.



56 °C,
1–3 h
or
56 °C,
overnight

Samples can be incubated overnight as well. If RNA-free DNA is crucial for downstream applications, a RNase digest may be performed: Add 20 µL RNase A (10 mg/mL) solution (not included; see ordering information) and incubate for an additional 5 min at room temperature.

3 Lyse sample

Vortex the samples. Add 200 µL Buffer B3, vortex vigorously and incubate at 70 °C for 10 min. Vortex briefly.



+200 µL B3
70 °C,
10 min

If insoluble particles are visible, centrifuge for 5 min at high speed (e.g., 11,000 x g) and transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube (not provided).

4 Adjust DNA binding conditions

Add 210 µL ethanol (96–100 %) to the sample and vortex vigorously.



+210 µL
ethanol
Vortex

After addition of ethanol a stringy precipitate may become visible. This will not affect the DNA isolation. Be sure to load all of the precipitate on the column in the following step.

5	Bind DNA	<p>For each sample, place one NucleoSpin® Tissue Column into a Collection Tube. Apply the sample to the column. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g. Discard Collection Tube with flowthrough and place the column in a new Collection Tube (provided).</p> <p><i>If the sample is not drawn completely through the matrix, repeat the centrifugation step at 11,000 x g. Discard flowthrough.</i></p>		Load samples
				11,000 x g, 1 min
6	Wash silica membrane			
	1 st wash	<p>Add 500 µL Buffer BW. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g. Discard flowthrough and place the column back into the Collection Tube.</p>		+500 µL BW 11,000 x g, 1 min
	2nd wash	<p>Add 600 µL Buffer B5 to the column and centrifuge for 1 min at 11,000 x g. Discard flowthrough and place the column back into the Collection Tube.</p>		+600 µL B5 11,000 x g, 1 min
7	Dry silica membrane	<p>Centrifuge the column for 1 min at 11,000 x g. Residual ethanol is removed during this step.</p>		11,000 x g, 1 min
				
8	Elute highly pure DNA	<p>Place the NucleoSpin® Tissue Column into a 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided) and add 100 µL Buffer BE. Incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge 1 min at 11,000 x g.</p> <p><i>For alternative elution procedures see section 2.3.</i></p>		+100 µL BE RT, 1 min
				11,000 x g, 1 min

Annexe 9 : Protocole d'extraction d'ADN avec le kit « NucleoSnap® cfDNA kit for cell-free DNA plasma » du laboratoire MACHEREY-NAGEL. [237]

The procedure below describes the isolation of cell-free DNA from 3 mL human EDTA plasma or urine. 1–5 mL sample can be processed as needed by adjusting the volumes of Proteinase K, lysis buffer, and ethanol as follows:

Sample volume [mL]	Proteinase K [µL]	Buffer VL [mL]	Ethanol [mL]
1	15	1	1
2	30	2	2
3	45	3	3
4	60	4	4
5	75	5	5

Before starting the preparation:

- Prepare plasma or urine sample according to section 3.3.
- Set water bath or heating block for 50 mL tubes to 56 °C (for lysate incubation).
- Set up vacuum manifold (please follow the instructions provided by the manufacturer).

Protocol for 3 mL sample

1 Prepare sample

Plasma: Centrifuge plasma for at least **10 min** at **4,500 x g** in order to remove residual cells and cell debris. Use supernatant, discard sediment.

Urine: Centrifuge urine for at least **5 min** at **4,500 x g** in order to remove residual cells and cell debris. Use supernatant, discard sediment.

Note: The supernatant may still contain suspended matter (e.g., lipids). This floating material does not interfere with further processing.



**4,500 x g,
10 min**



2 Lyse sample

Add **45 µL Proteinase K** to a 50 mL tube. Add **3 mL sample** to the tube. Carefully **mix** the contents of the tube without moistening the tube lid.

Incubate **5 min** at **room temperature** (18–25 °C). Add **3 mL Buffer VL** to the tube. **Mix** the tube contents by vortexing for approximately 20 s in order to obtain a homogenous lysate.

Incubate tube at **56 °C** for **5 min** (e.g., in a water bath).



**+ 45 µL
Proteinase K
+ 3 mL sample**

**Mix
RT, 5 min**

+ 3 mL VL

**Mix
56 °C, 5 min**

3 Prepare binding conditions

Carefully open the tube lid and add **3 mL ethanol** (96–100 %).

Mix the tube contents by vortexing for approximately 10 s in order to obtain a homogenous lysate.



**+ 3 mL
ethanol
(96–100 %)**

Mix

4 Bind DNA

Place the NucleoSnap® cfDNA Column onto a vacuum manifold (do not apply vacuum yet).

Note: The use of reusable NucleoVac Stop-cocks is recommended (not provided, see ordering information, section 7.2)

Add **500 µL Column Conditioner CC** to the column.

Apply vacuum (**approximately 0.4–0.6 bar*** differential pressure) until the solution has passed the column (usually several seconds). Release vacuum.

Note: Perform adding Column Conditioner CC and applying vacuum 1–5 min before adding the lysate to the NucleoSnap® Column.

Apply the **lysate from step 3** to the NucleoSnap® Column.

Apply vacuum (**approximately 0.4 bar*** differential pressure). Wait until the lysate has passed through the column. Approximate duration:

for 3 mL lysate (corresponding to 1 mL sample): up to 5 min;

for 9 mL lysate (corresponding to 3 mL sample): up to 10 min;

for 15 mL lysate (corresponding to 5 mL sample): up to 15 min.

The vacuum can be adjusted to $\geq 0.6 \text{ bar}^*$ at the end of this step in case the lysate has not yet completely passed the column.

Close stopcocks for each column as soon as the lysate has passed the column!



+ 500 µL CC
0.4–0.6 bar*,
30 s
Load lysate
0.4 bar*,
5–15 min

5 Wash silica membrane

Add **1 mL Buffer VW1** to the column.

Apply vacuum (**approximately 0.2–0.4 bar*** differential pressure) until the wash buffer has completely passed through the column. Approximate duration is up to one minute. Release vacuum.

Add **500 µL Buffer WB** to the column.

Apply vacuum (**approximately 0.2–0.4 bar*** differential pressure) until the wash buffer has passed through the column. Approximate duration is 30 s. Release vacuum.



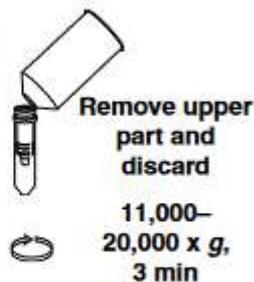
+ 1 mL VW1
0.2–0.4 bar*,
1 min
+ 500 µL WB
0.2–0.4 bar*,
30 s

6 Dry silica membrane

Remove the NucleoSnap[®] Column from the vacuum manifold and insert it into a Collection Tube (2 mL, provided). **Remove the upper part of the column and discard it.**

Note: Tightly hold the upper part of the column in one hand and the labeled Collection Tube (2 mL) holding the NucleoSnap[®] Column in the other hand. Carefully snap off the upper part of the column. Do not label the lower (spin) part of the NucleoSnap[®] Column because the ink might be washed off.

Centrifuge the lower part of the column in the Collection Tube for **3 min** at **full speed** (> 11,000 x g up to 20,000 x g). Discard the Collection Tube with residual flow through and insert the column into a fresh Collection Tube (1.5 mL, provided).



7 Elute DNA

Add **50 µL Elution Buffer** to the column. Incubate **3 min** at **room temperature**. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.

Store eluted DNA at 4 °C for short-term and at -20 °C for long-term storage.

Note: For alternative elution procedures see section 3.4.



Annexe 10 : Questionnaire à destination des propriétaires de Bouviers Bernois pour estimer leur intérêt vis-à-vis du test de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire chez leur(s) chien(s). Réalisation personnelle, Google Forms.

Projet de recherche - Test de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire chez le Bouvier Bernois

Dans le cadre de ma thèse d'exercice de docteur vétérinaire et dans le cadre d'un travail de recherche mené par l'équipe de la génétique du chien du CNRS de Rennes, un test sanguin de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire est en phase d'élaboration.

Le sarcome histiocytaire est un cancer touchant 25% des Bouviers Bernois et diminuant nettement leur espérance de vie. Le diagnostic est souvent posé lors de l'apparition des signes cliniques, moment où le cancer est déjà très évolué dans l'organisme. La moyenne de survie au diagnostic est aujourd'hui de 49 jours. Le sarcome histiocytaire disséminé, forme la plus agressive et ciblée par notre test, atteint plus fréquemment les viscères, notamment la rate, le foie, les poumons et les nœuds lymphatiques internes, rendant la mise en évidence des lésions plus complexes et le diagnostic plus tardif.

Le test de diagnostic que nous souhaitons concevoir permettrait de révéler la présence d'une ou plusieurs mutations spécifiquement associée(s) au développement d'un sarcome histiocytaire. Ce test se ferait grâce à une simple prise de sang chez votre vétérinaire traitant.

Si un tel test de diagnostic précoce est mis en place, nous souhaiterions connaître les motivations à l'utiliser et à engager, si le résultat s'avère positif, d'éventuels examens complémentaires ou des traitements en prévention du développement de ce cancer. Les examens complémentaires évoqués aujourd'hui seraient de l'imagerie (échographie, radiographie, voire scanner). Pour le traitement, il peut s'agir d'un retrait chirurgical de la tumeur si elle est repérée, ou bien d'une chimiothérapie ou radiothérapie préventive.

Crédit photographie : Mars, élevage de la Vallée de l'Hyrôme

*** Indique une question obligatoire**

Vous - Caractérisation du propriétaire

1. Dans quelle tranche d'âge vous situez-vous ? *

Une seule réponse possible.

- 18-25 ans
- 25-35 ans
- 35-45 ans
- 45-60 ans
- > 60 ans

2. Vous êtes : *

Une seule réponse possible.

- Eleveur *Passer à la question 4*
- Particulier

Vous - Caractérisation du propriétaire

3. Quelle est votre catégorie socio-professionnelle ? *

Une seule réponse possible.

- Etudiant Employé Cadre
 En recherche d'emploi Autoentrepreneur Autre :

Votre (vos) Bouvier(s) Bernois

4. Combien de Bouviers Bernois possédez-vous ? *

Une seule réponse possible.

- 1
 2
 3
 4
 5
 Entre 5 et 10
 Plus de 10

5. Depuis combien de temps avez-vous un ou des Bouviers Bernois ? *

Une seule réponse possible.

- Moins de 5 ans Entre 5 et 10 ans Plus de 10 ans

6. Rendez-vous régulièrement visite à votre vétérinaire traitant ? *

Une seule réponse possible.

- Non, jamais
 Occasionnellement, lorsqu'il y a un problème de santé majeur
 Oui, régulièrement, notamment pour les rappels vaccinaux et/ou les antiparasitaires (vermifuges, antitiques, antipuces)

7. Avez-vous déjà eu un Bouvier Bernois décédé d'un cancer ? *

Une seule réponse possible.

- Oui
 Non *Passer à la question 9*
 Ne sait pas *Passer à la question 9*

8. Si oui, de(s) quel(s) cancer(s) est (sont)-il(s) décédé(s) ? * Plusieurs réponses possibles.

- Sarcome histiocytaire (anciennement appelée histiocytose maligne)
- Lymphome
- Mastocytome
- Mélanome
- Ne sait pas
- Autre : _____

Le sarcome histiocytaire - Diagnostic chez votre (vos) Bouvier(s) Bernois

9. Si un test de diagnostic précoce pour le sarcome histiocytaire est conçu, souhaiteriez-vous l'utiliser ? *

Une seule réponse possible.

- Oui
- Non *Passer à la question 19*
- Ne sait pas

Le sarcome histiocytaire - Diagnostic chez votre (vos) Bouvier(s) Bernois

Pour rappel, le test de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire se fait grâce à une simple prise de sang chez votre vétérinaire traitant. Dans le cas où vous souhaiteriez utiliser ce test, et sachant que :

- o l'espérance de vie moyenne d'un bouvier bernois se situe entre 8 et 9 ans
- o l'âge moyen au diagnostic du sarcome histiocytaire est de 6.6 ans
- o après diagnostic, la moyenne de survie est de moins de deux mois

10. À partir de quel âge seriez-vous prêts à tester votre chien ? * Une seule réponse possible.

- 2-4 ans
- 4-6 ans
- 6-7 ans
- 7-8 ans
- 8-9 ans
- Au-delà de 9 ans

11. Quel montant seriez-vous prêts à payer, objectivement ? *

Une seule réponse possible.

- 10-20 euros
- 20-40 euros
- 40-60 euros
- 60-80 euros
- 80-100 euros

12. Si le coût du test est d'environ 20 euros, à quelle fréquence seriez-vous prêts à le réaliser ? *

Une seule réponse possible.

- Tous les mois Tous les 3 mois Tous les 6 mois Tous les ans
 Autre : _____

13. Si le coût du test est d'environ 50 euros, à quelle fréquence seriez-vous prêts à le réaliser ? *

Une seule réponse possible.

- Tous les mois Tous les 3 mois Tous les 6 mois Tous les ans
 Autre : _____

14. Si le coût du test est d'environ 80 euros, à quelle fréquence seriez-vous prêts à le réaliser ? *

Une seule réponse possible.

- Tous les mois Tous les 3 mois Tous les 6 mois Tous les ans Autre : ...

Le sarcome histiocytaire - Diagnostic chez votre (vos) Bouvier(s) Bernois

Le sarcome histiocytaire disséminé, forme la plus agressive et ciblée par notre test, atteint plus fréquemment la rate, le foie, les poumons et les nœuds lymphatiques.

Si le test de diagnostic précoce est positif, cela signifierait que le cancer se développe dans l'organisme de votre chien. Des examens complémentaires peuvent alors être utiles pour identifier la localisation et la gravité de ce cancer.

15. Si le test s'avère positif pour le sarcome histiocytaire, seriez-vous prêts à engager des examens complémentaires ? * Plusieurs réponses possibles.

- Non
 Oui, a minima des radiographies thoraciques (coût : environ 40 euros) Oui, a minima une échographie abdominale (coût : environ 55 euros) Oui, radiographies et échographie (coût : environ 95 euros)
 Oui, un scanner, permettant de détecter une masse plus petite dans le corps entier (coût : environ 500 euros)
 Oui, un examen d'imagerie, associé à une biopsie ou une cytoponction de la masse, et à une analyse histologique, seule façon d'avoir un diagnostic de certitude sur la nature de la masse (coût : entre 100 et 120 euros à ajouter au prix de l'imagerie)
 Autre : ...

16. Cochez "Oui" si vous avez sélectionné au moins un examen complémentaire dans la question précédente, sinon cochez "Non" : *

Une seule réponse possible.

- Oui
 Non *Passer à la question 19*

Le sarcome histiocytaire - Diagnostic chez votre (vos) Bouvier(s) Bernois

Dans le cas où le test de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire se révèle être positif, et que vous engagez au moins un examen complémentaire :

17. Si le(s) examen(s) complémentaire(s) révèle(nt) effectivement la présence d'une tumeur, seriez-vous prêts à engager une solution thérapeutique ? *

Une seule réponse possible.

- Oui, si cela nécessite simplement une chirurgie (ordre de grandeur : 600 à 800 euros)
- Oui, une radiothérapie ou une chimiothérapie (radiothérapie : environ 1300 euros ; chimiothérapie : variable selon le protocole choisi et le nombre de séances, environ 5 séances à 200 euros la séance soit 1000 euros)
- Oui, une chirurgie et une radiothérapie ou chimiothérapie
- Non
- Autre : ...

18. Si le(s) examen(s) complémentaire(s) ne révèle(nt) pas de tumeur, bien que le test de diagnostic précoce soit positif, à quelle fréquence seriez-vous prêts à reproduire des examens complémentaires pour détecter le développement d'une tumeur ? *

Une seule réponse possible.

- Tous les mois Tous les 3 mois Tous les 6 mois Tous les ans Tous les 2 ans
- Autre : _____

Merci pour votre participation !

Vos réponses permettront d'évaluer la pertinence de mettre en place ce test de diagnostic précoce pour les éleveurs et pour les particuliers propriétaires de Bouviers Bernois.

19. Avez-vous des questions / commentaires ?

20. Souhaiteriez-vous avoir des nouvelles de l'étude ? *

- Oui Non

21. Souhaiteriez-vous participer à cette étude ? *

- Oui Non

22. Si vous avez répondu oui à une ou les deux questions précédentes, vous pouvez laisser votre adresse mail :

Annexe 11 : Première version du résumé qui a été soumis pour le congrès mondial de cancérologie vétérinaire (WVCC : *World Veterinary Cancer Conference*) à Tokyo en mars 2024. Rédaction par Benoit Hédan, Jérôme Abadie.

Early detection of cancer using circulating tumor DNA in liquid biopsies: a first step to improve clinical care of Histiocytic Sarcoma through the follow-up of 30 Bernese Mountain Dogs.

Alice Guyon¹, Armel Houel², Typhaine Moal¹, Charline Bianchi², Jérôme Denis^{3,4}, ..., Richard Guyon², Catherine André^{1,2}, Jérôme Abadie⁵ and Benoit Hédan^{1,2}

¹ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique, 44307 Nantes, France.

² Institut Génétique et Développement de Rennes, CNRS-UMR6290, Université de Rennes1, 35000 Rennes, France.

³ Sorbonne University, Paris, France.

⁴ INSERM UMR_S 938, Endocrinology and Oncology Biochemistry Department, APHP Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France.

Histiocytic sarcoma (HS) is a rare cancer in dogs, but some breeds are particularly affected, notably Bernese Mountain Dogs, Rottweilers and Retrievers. Because of its aspecific symptoms and aggressiveness, this cancer is diagnosed at an advanced stage. In the absence of effective treatments, this cancer is devastating for affected dogs. Early detection of cancer is necessary to improve the efficiency of therapeutic opportunities. We previously developed liquid biopsy assay to detect HS with *PTPN11* mutations, and explore the interest of these assay for an early and easy diagnostic procedure.

For this purpose, we initiated a 2-year follow-up study involving 30 at-risk BMDs based on age (≥ 6 years). Every 3 months, we collected plasmas and extract DNA. When HS is diagnosed by cytology or histology, tumor DNA was extracted to test the presence of *PTPN11* mutations, and droplet digital PCR was used to detect *PTPN11* mutations in circulating DNA (ctDNA) from the plasma previously collected of dogs who died from HS with *PTPN11* mutations.

After the two-year follow-up period, five dogs died from HS with *PTPN11* mutations. Importantly, we were able to detect these mutations on average 7.3 months (median 5.5 months) before the onset of clinical symptoms, with a range of 2 to 14 months. For one dog, who developed the aggressive hematophagocytic form of HS, we were able to detect the mutation 7 months before the symptoms/death while a CT scan 2 months prior the symptoms/death did not detect any potential HS.

Based on these preliminary results, from a prospective cohort of 30 BMDs, we can conclude that our method is capable to detect HS several months before the onset of clinical symptoms with better sensitivity than clinical and imaging techniques. This early diagnosis is an essential step towards improving the clinical management of such cancers in veterinary and human medicine.

Alice GUYON

Mise au point d'un test de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire chez le Bouvier Bernois par détection des mutations du gène *PTPN11* dans l'ADN circulant du plasma.

Development of an early diagnostic tool for histiocytic sarcoma in Bernese Mountain dog by detecting PTPN11 gene mutations in circulating plasma DNA.

Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire : Nantes, le 26 octobre 2023

RESUME

Le sarcome histiocytaire (SH) canin est un cancer particulièrement agressif et d'évolution rapide, notamment chez les Bouviers Bernois, où il se développe principalement sous sa forme disséminée et peut être responsable de la moitié des décès par maladie dans cette race, notamment en raison de son diagnostic trop tardif. Dans ce contexte, un biomarqueur permettant un diagnostic précoce présenterait un réel intérêt, afin de leur faire bénéficier d'une prise en charge médicale plus précoce et ainsi espérer améliorer la durée de survie de ces animaux. Des études génétiques ont identifié le gène *PTPN11*, codant pour la protéine SHP-2, comme potentiel oncogène spécifique du sarcome histiocytaire du Bouvier Bernois. Des mutations de *PTPN11* entraînent une altération de la structure de SHP-2 et son activation constitutive, engendrant une stimulation accrue de la voie de signalisation *Mitogen-Activated-Protein-Kinase*, d'où une prolifération incontrôlée des cellules histiocytaires. En outre, il a été montré que des mutations du gène *PTPN11* pouvaient être détectées dans l'ADN circulant du plasma à l'aide de techniques de séquençage nouvelle génération.

L'étude expérimentale menée dans ce travail a permis de suivre une cohorte de 35 Bouviers Bernois sur plus de deux ans, par des prélèvements sanguins réguliers. Six individus sont décédés d'un sarcome histiocytaire présentant une mutation de *PTPN11* (diagnostic confirmé par analyse histopathologique). Les prélèvements sanguins antérieurs et séquentiels de ces chiens ont été analysés par extraction d'ADN puis détection des mutations de *PTPN11* par ddPCR (*digital droplet Polymerase Chain Reaction*). La mutation concernée de *PTPN11* se retrouvait dans le plasma des chiens de 1,11 jusqu'à 11 mois avant leur décès ; et en moyenne 129 jours (et jusqu'à 287 jours) avant le diagnostic clinique de suspicion posé par le vétérinaire traitant. Ces résultats sont extrêmement prometteurs pour l'oncologie vétérinaire où un test de diagnostic précoce du sarcome histiocytaire pourrait être développé ; mais également pour la maladie homologue humaine, pour laquelle une des mutations étudiées chez les Bouviers Bernois et détectée dans cette étude a été identifiée chez des patients humains atteints de SH.

MOTS CLES :

- Sarcome histiocytaire
- Bouvier Bernois (race canine)
- Diagnostic précoce
- ADN
- Analyse de sang
- Mutation génétique

DATE DE SOUTENANCE : 26 octobre 2023