



HAL
open science

Les biomarqueurs sanguins en oncologie comparée - état actuel des connaissances en 2020 - application aux cellules myéloïdes suppressives canines

Philippe Colombe

► To cite this version:

Philippe Colombe. Les biomarqueurs sanguins en oncologie comparée - état actuel des connaissances en 2020 - application aux cellules myéloïdes suppressives canines. Médecine vétérinaire et santé animale. 2020. dumas-04795475

HAL Id: dumas-04795475

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04795475v1>

Submitted on 21 Nov 2024

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

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

Copyright

Année 2020

**LES BIOMARQUEURS SANGUINS EN ONCOLOGIE
COMPARÉE - ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES EN
2020 – APPLICATION AUX CELLULES MYELOÏDES
SUPPRESSIVES CANINES**

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

le 15 octobre 2020

par

Philippe, Guillaume, Frédéric COLOMBE

sous la direction de

Dr. Delphine LE ROUX

et avec la participation en tant qu'invité de

Dr. Jérémie BEGUIN

Président du jury :	M. Philippe GRIMBERT	Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL
1^{er} Assesseur :	Mme Delphine LE ROUX	Maître de Conférences à l'EnvA
2nd Assesseur :	Mme Ghita BENCHEKROUN	Maître de Conférences à l'EnvA

Liste des membres du corps enseignant



Directeur : Pr Christophe Degueurce
Directeur des formations : Pr Henry Chateau
Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin
Directeurs honoraires : MM. les Professeurs C. Pilet, B. Toma, A.-L. Parodi, R. Morailon, J.-P. Cotard, J.-P. Mialot & M. Gogny

Département d'Élevage et de Pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)

Chef du département : Pr Grandjean Dominique - **Adjoint :** Pr Blot Stéphane

<p>Unité pédagogique d'anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Fernandez Parra Rocio, Maître de conférences associée - Pr Verwaerde Patrick* <p>Unité pédagogique de clinique équine</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Audigé Fabrice - Dr Bertoni Lélia, Maître de conférences - Dr Bourzac Céline, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Coudry Virginie, Praticien hospitalier - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Praticien hospitalier - Dr Jacquet Sandrine, Praticien hospitalier - Dr Mespoulhès-Rivière Céline, Praticien hospitalier* - Dr Moiroud Claire, Praticien hospitalier - Dr Tanquerel Ludovic, Chargé d'enseignement contractuel <p>Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Benchekroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane* - Dr Canonne-Guibert Morgane, Maître de conférences - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticien hospitalier - Dr Maurey-Guénec Christelle, Maître de conférences 	<p>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cabrera Gonzales Joaquin, Chargé d'enseignement contractuel - Dr Fontbonne Alain, Maître de conférences - Pr Grandjean Dominique* - Dr Hoummady Sara, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Maenhoudt Cindy, Praticien hospitalier - Dr Nudelmann Nicolas, Maître de conférences - Dr Ribeiro dos Santos Natalia, Praticien hospitalier <p>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Decambon Adeline, Maître de conférences - Pr Fayolle Pascal - Dr Manassero Mathieu, Maître de conférences - Pr Viateau-Duval Véronique* <p>Discipline : cardiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Chetboul Valérie - Dr Saponaro Vittorio, Praticien hospitalier <p>Discipline : ophtalmologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences <p>Discipline : nouveaux animaux de compagnie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Pignon Charly, Praticien hospitalier - Dr Volait Laetitia, Praticien hospitalier
---	--

Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP)

Chef du département : Pr Millemann Yves - **Adjoint :** Pr Dufour Barbara

<p>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Bolnot François, Maître de conférences - Pr Cartier Vincent - Dr Gauthier Michel, Maître de conférences associé - Dr Mîmet Narjes, Chargée d'enseignement contractuelle <p>Unité pédagogique de maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Crozet Guillaume, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Dufour Barbara* - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Rivière Julie, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Adjou Karim - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences* - Dr Delsart Maxime, Maître de conférences associé - Pr Millemann Yves - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences 	<p>Unité pédagogique de reproduction animale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Denis Marine, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr Mauffré Vincent, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Dr Barassin Isabelle, Maître de conférences - Pr Bossé Philippe* - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences - Pr Grimard-Ballif Bénédicte - Pr Ponter Andrew <p>Rattachée DPASP</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Wolgust Valérie, Praticien hospitalier
---	---

Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Pr Desquilbet Loïc - **Adjoint :** Pr Pilot-Storck Fanny

<p>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Boissady Emilie, Chargée d'enseignement contractuelle - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Robert Céline* <p>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Boulouis Henri-Jean - Pr Eloit Marc - Dr Lagrée Anne-Claire, Maître de conférences - Pr Le Poder Sophie - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences* <p>Unité pédagogique de biochimie, biologie clinique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Bellier Sylvain* - Dr Deshuillers Pierre, Maître de conférences - Dr Lagrange Isabelle, Praticien hospitalier <p>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques - Dr Laloy Eve, Maître de conférences - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences* <p>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Pr Desquilbet Loïc, (Biostatistique, Epidémiologie) - Dr Legrand Chantal, Maître de conférences associée - Dr Marignac Geneviève, Maître de conférences* - Dr Rose Hélène, Maître de conférences associée 	<p>Unité de parasitologie, maladies parasitaires, dermatologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Dr Briand Amaury, Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel (rattaché au DEPEC) - Dr Cochet-Favre Noëlle, Praticien hospitalier (rattachée au DEPEC) - Pr Guillot Jacques* - Dr Polack Bruno, Maître de conférences - Dr Risco-Castillo Veronica, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Kohlhauer Matthias, Maître de conférences - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences* - Pr Tissier Renaud <p>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Gilbert Caroline (Ethologie) - Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Tiret Laurent (Physiologie, Pharmacologie)* - Dr Titeux Emmanuelle (Ethologie), Praticien hospitalier <p>Discipline : éducation physique et sportive</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. Philips Pascal, Professeur certifié
--	---

* responsable d'unité pédagogique

Professeurs émérites : Pr Combrisson Hélène, Pr Enriquez Brigitte, Pr Panthier Jean-Jacques, Pr Paragon Bernard.

Remerciements

A Mr Philippe Grimbert, Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse. Hommages respectueux.

A Mme Delphine Le Roux, Maitre de conférences à l'EnvA,

Pour avoir accepté de diriger et corriger ce travail, pour son accompagnement et sa bienveillance tout au long de ce travail, et enfin pour m'avoir proposé ce sujet de thèse passionnant. Mes plus sincères et respectueux remerciements.

A Mme Ghita Benchekroun , Maitre de conférences à l'EnvA,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter l'assessorat de cette thèse. Pour ses précieux et toujours pertinents conseils apportés au cours des corrections de ce manuscrit. Mes très sincères remerciements.

A Mr Loïc Desquilbet, Professeur en biostatistiques et épidémiologie clinique à l'EnvA,

Pour son aide précieuse et indispensable apportée dans ce travail. Mes très sincères remerciements.

A Mr Jérémy Béguin, Clinicien chargé de consultation en cancérologie à l'EnvA,

Pour sa participation essentielle à l'élaboration de ce travail. Sincères remerciements.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des figures	3
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations	11
Introduction	17
Première partie : bibliographie	19
1. Définitions et intérêts des biomarqueurs	19
A. <i>Définition générale</i>	19
a. Les biomarqueurs diagnostiques	19
b. Les biomarqueurs de suivi	20
c. Les biomarqueurs pronostiques	20
d. Les biomarqueurs prédictifs	21
e. Les biomarqueurs pharmacodynamiques ou de réponse	21
f. Les biomarqueurs d'innocuité	22
g. Les biomarqueurs de susceptibilité ou de risque	22
B. <i>Les caractéristiques des biomarqueurs</i>	23
a. Caractéristiques intrinsèques d'un biomarqueur	23
b. Autres caractéristiques du test	26
c. Courbe ROC, outil d'analyse des performances du test	29
2. Les biomarqueurs sanguins en oncologie humaine et vétérinaire	32
A. <i>Les biomarqueurs ioniques</i>	33
a. L'ion Cu ²⁺	33
b. Les isotopes du cuivre ⁶⁵ Cu et ⁶³ Cu	34
c. L'ion Zn ²⁺	39
B. <i>Les biomarqueurs protéiques</i>	42
a. L'Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE)	42
b. L'Antigène Carbohydre 15-3 (Carbohydre Antigen 15-3, CA15-3)	47
c. L'Alpha-Foetoprotéine (AFP)	52
d. L'Antigène Spécifique de la Prostate (PSA) et l'Estérase Prostatique Spécifique Canine (CPSE)	63
e. L'hormone Anti-Mullerienne	64
f. La Thymidine Kinase 1	69
C. <i>Les biomarqueurs nucléiques</i>	77
a. Les Acides Désoxyribonucléiques Circulants (ADN)	77
b. Les acides ribonucléiques (ARN) circulants	96
D. <i>Les biomarqueurs cellulaires</i>	111
a. Les cellules tumorales circulantes	111
b. Les Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSCs)	123
Deuxième partie : étude expérimentale	135
1. Introduction	135
2. Matériels et méthodes	135
A. <i>Cohortes de chiens</i>	135
a. Chiens sains de la cohorte 2017	135
b. Chiens atteints de tumeurs, cohorte 2019/2020	136
B. <i>Technique de dosage des MDSCs</i>	137
a. Isolement et marquage des MDSCs	137
b. Cytométrie en flux – Principe et appareil	139
c. Méthode de « gating »	140
C. <i>Analyses statistiques</i>	142
D. <i>Approbation</i>	142

3. Résultats	143
A. <i>Etude caractéristique des cohortes</i>	143
a. Cohorte des chiens sains.....	143
b. Cohorte des chiens atteints de processus néoplasiques	143
B. <i>Dosage des MDSCs chez les chiens sains et les chiens atteints de processus néoplasiques, processus néoplasiques avancés et peu avancés</i>	147
C. <i>Comparaison entre les chiens sains et les chiens atteints de tumeurs mammaires, mastocytomes et lymphomes</i>	149
a. Comparaison entre chiens sains et chiennes atteintes de tumeurs mammaires.....	149
b. Comparaison entre chiens sains et chiens atteints de mastocytomes	152
c. Comparaison entre chiens sains et chiens atteints de lymphomes	153
D. <i>Suivi du dosage de MDSCs chez deux chiens</i>	156
a. Chien 1.....	156
b. Chien 2.....	157
4. Discussion.....	159
A. <i>Valeurs des %MDSCs chez les différents groupes de chiens étudiés</i>	159
B. <i>Comparaison des valeurs de %MDSCs entre les différents groupes de chiens étudiés, et performance diagnostique</i>	160
C. <i>Evolution du %MDSCs chez deux chiens au cours de leur traitement</i>	162
D. <i>Limites</i>	163
E. <i>Perspectives</i>	164
Conclusion	165
Liste des références bibliographiques	169
Annexe 1 :	189
Annexe 2 :	191

Liste des figures

Figure 1 : Distribution des valeurs prises par le test chez les individus sains et malades (Delacour <i>et al.</i> , 2005)	25
Figure 2 : Distribution des résultats dans le cas d'un test chez des individus sains et malades, présentant un chevauchement (Riedinger <i>et al.</i> , 2005).....	25
Figure 3 : Déplacement de la valeur seuil vers les hautes valeurs (Riedinger <i>et al.</i> , 2005).....	26
Figure 4 : Déplacement de la valeur seuil vers les basses valeurs (Riedinger <i>et al.</i> , 2005)	26
Figure 5 : Comparaison des courbes ROC de plusieurs biomarqueurs du cancer de la prostate chez l'homme (De La Taille <i>et al.</i> , 2009).....	30
Figure 6 : Distribution des δCu chez les chiens diagnostiqués avec cancer (groupe 1, n= 35), chez les chiens sains (groupe 2, n = 49), et chez les chiens atteints de maladies non tumorales (groupe 3, n = 33). (Chamel <i>et al.</i> , 2017)	35
Figure 7 : Diagramme en boîte représentant la distribution des valeurs de δCu chez les individus atteints de cancer du sein, les hommes et les femmes sains, ainsi que les cancers colorectaux ayant montré et n'ayant pas montré de décès au cours de l'étude. (Télouk <i>et al.</i> , 2015).....	36
Figure 8 : Courbe ROC associée au dosage de δCu dans le diagnostic de cancer du sein chez la femme d'après les résultats de l'étude de Télouk <i>et al.</i> (2015).	36
Figure 9 : Evolution de δCu sérique chez les 20 femmes atteintes de cancer du sein. Chaque ligne de couleur différente représente une patiente différente. (Télouk <i>et al.</i> , 2015)	37
Figure 10 : Evolution des biomarqueurs ACE, CA19.9, CA15.3 et du δCu chez quatre patients atteints de cancer colorectal ou du sein.....	38
Figure 11 : Diagramme en boîte représentant la distribution des valeurs de δCu dans le sérum (E) et les érythrocytes (F) chez les individus atteints de carcinome hépatocellulaire (HCC) et les individus sains (Control). Composition isotopique du cuivre dans le sérum des patients en fonction de celle dans les érythrocytes (A). (Balter <i>et al.</i> , 2015).....	39
Figure 12 : Analyse de survie chez les patients atteints de cancer pulmonaire pré-traitement, dont la concentration sérique est supérieure à 45 $\mu\text{g}/\text{dL}$ et inférieure à 45 $\mu\text{g}/\text{dL}$. (Issel <i>et al.</i> , 1981).....	41
Figure 13 : Analyse de survie des patients atteints de carcinome gastrique en fonction de la valeur de l'ACE sérique (<i>CEA en anglais</i>). (Wang <i>et al.</i> , 2016)	43
Figure 14 : Évolution des valeurs sériques de CEA avant (M0), 15 jours après (M1) et 45 jours après (M2) exérèse intervention chirurgicale. (Senhorello <i>et al.</i> , 2019)	46
Figure 15 : Analyse de survie des chiennes atteinte de tumeurs mammaires suivant les différentes concentrations sériques d'ACE avant intervention. Baba <i>et al.</i> (2019).....	47

Figure 16 : Corrélation positive ($r = 0,535$, $p < 0,01$) entre la concentration sérique de CA15-3 et les stades d'atteinte tumorale chez les chiennes présentant une tumeur mammaire. (Campos <i>et al.</i> , 2012).....	51
Figure 17 : Analyse de survie des chiennes atteintes de tumeurs mammaires suivant les différentes concentrations sériques de CA15-3 avant intervention. (Baba <i>et al.</i> , 2019).....	52
Figure 18 : Estimations des sensibilités et spécificités pour différentes valeurs seuils (en ng/mL) de la concentration sérique d'AFP dans la détection de CHC selon la revue de Colli <i>et al.</i> (2006). Les cercles noirs indiquent la spécificité et les losanges la sensibilité.....	55
Figure 19 : Courbes de Kaplan-Meier montrant les taux de survie globale et les temps de survie sans récurrence chez des individus atteints de carcinome hépatocellulaires en fonction des valeurs de concentration sérique d'AFP avant traitement (Chan <i>et al.</i> , 2019)......	56
Figure 20 : Courbe de Kaplan-Meier évaluant la survie globale des individus recevant un traitement à base de Sorafenib en fonction de l'évolution de la concentration d'AFP sérique au cours des premières semaines de traitement. (Personeni <i>et al.</i> , 2012).....	58
Figure 21 : Variation de la concentration sérique d'AFP au cours d'une période de 8 jours chez 19 chiens ayant subi une ischémie hépatique sélective (ligne pleine) et un groupe de 7 chiens contrôle (ligne en pointillés). (Madsen et Rikkers, 1984).....	60
Figure 22 : Diagramme en boîte représentant la distribution des valeurs de concentration d'AFP sérique chez des chiens atteints de carcinome hépatocellulaire (n=9), de cholangiocarcinome (n=2), de maladie hépatique non tumorale (n=21), de tumeurs non hépatiques (n=54), et chez des chiens sains (n=20). (Yamada <i>et al.</i> , 1999).....	61
Figure 23 : Variations de la concentration sérique d'AFP suite à l'exérèse de carcinome hépatocellulaire chez quatre chiens. (Kitao <i>et al.</i> , 2006).....	63
Figure 24 : Variations de la concentration sérique d'AFP suite à l'exérèse de carcinome hépatocellulaire chez cinq chiens. (Yamada <i>et al.</i> , 1999).....	63
Figure 25 : Diagramme en boîte montrant les concentrations sériques d'AMH chez les vaches atteintes de TCG (GTCT, n = 9), les vaches présentant une maladie kystique des ovaires (COD, n = 8), et des vaches saines cyclées (PC, n = 25). (El-Sheikh Ali <i>et al.</i> , 2013).....	66
Figure 26 : Diagramme présentant les différentes concentrations sériques en AMH chez des chiennes saines, atteintes de pathologies néoplasiques et non néoplasiques différentes. (Walter <i>et al.</i> , 2018).....	67
Figure 27 : Diagramme montrant les concentration sériques en AMH chez des chiens sains non castrés (C), des chiens présentant une tumeur des cellules de Sertoli (SCT), et des chiens présentant d'autres pathologies testiculaires (TP). (Holst et Dreimanis, 2015).....	68
Figure 28 : Courbes ROC étudiant les capacités de la concentration (à gauche) et de l'activité (à droite) de la thymidine kinase pour diagnostiquer les patientes atteintes de cancer du sein de stade II (Jagarlamudi et Shaw, 2018).....	70
Figure 29 : Activité (A) et concentration (B) sérique de TK1 dans le sang de chiens sains, atteints de tumeurs mammaires bénignes et malignes (Kiran Kumar <i>et al.</i> , 2014).....	73

Figure 30 : Distributions des valeurs d'activité de TK1 (A) et de l'index néoplasique (B) illustrées par diagrammes en boîte chez des chiens sains et atteints de différents types tumoraux. Distributions des valeurs d'activité de TK1, de la CRP et de l'index néoplasique chez les chien sains, atteints de tumeurs solides et hématopoïétiques (C). (Selting <i>et al.</i> , 2016).....	74
Figure 31 : Distribution des valeurs d'activité de TK1 chez des chiens sains et chez des chiens atteints de lymphomes en fonction de leur réponse au traitement (A), et évolution au cours de traitement chez les individus ayant présenté une rechute (B). (Boyé <i>et al.</i> , 2019)	75
Figure 32 : Les différents types d'hétérogénéité tumorale identifiés par le génotypage de la tumeur et de l'ADNct. (Scherer, 2020).....	79
Figure 33 : Fractions d'ADNct parmi l'ADNcf isolé chez des patients sains et des patients atteints de cancers colorectaux, du sein, du poumon, ou de l'ovaire (C), et en fonction du stade tumoral (D). (Phallen <i>et al.</i> , 2017)	81
Figure 34 : Courbes ROC étudiant la capacité de l'ADNct à détecter un cancer (48 individus atteints de cancers variés et 46 individus sains), montrant une ASC égale à 0,64 sans sélection par rapport à la taille des fragments d'ADN (courbe verte), à 0,78 après sélection <i>in silico</i> , et à 0,97 après sélection <i>in vitro</i> . (Moulière <i>et al.</i> 2018)	82
Figure 35 : Pourcentages de patients atteints de cancers colorectaux, gastro-oesophagiens, pancréatiques et mammaires sous forme localisée et métastatique présentant une quantité détectable d'ADNct (A). Quantité d'ADNct totale mesurée chez les patients atteints de cancers en fonction du stade d'avancement tumoral (C). (Bettegowda <i>et al.</i> , 2014).....	83
Figure 36 : Courbe de Kaplan-Meier présentant les taux de survie globale en fonction de la quantité élevée (>3,06ng/mL, ligne rouge) ou faible (<3,6ng/mL, ligne noire) d'ADNct (mA) chez les patients atteints de cancer colorectal. (El Messaoudi <i>et al.</i> , 2016).....	84
Figure 37 : Applications de l'analyse de l'ADNct dans la gestion de la maladie au cours du traitement. (Wan <i>et al.</i> , 2017).....	86
Figure 38 : Diagramme (à gauche) montrant la concentration plasmatique d'ADNcf chez les chiens présentant un cancer métastasé (With DM) et non métastasé (Without DM). Courbe ROC (à droite) montrant les capacités diagnostiques de la concentration plasmatique d'ADNcf à détecter la présence de métastases chez les chiens présentant une atteinte néoplasique maligne. (Tagawa <i>et al.</i> , 2019)	89
Figure 39 : Courbes ROC de l'indice de méthylation des séquences LINE-1 contenues dans l'ADNcf des chiens distinguant les chiens sains des chiens atteints de tumeurs mammaires bénignes (B) et malignes (C).....	91
Figure 40 : Diagramme en boîte représentant l'indice de méthylation des séquences LINE-1 au sein de l'ADNcf chez des chiens sains (Healthy), atteints de tumeurs mammaires bénignes (Benign), malignes (Malignant) et d'autres types tumoraux (Other). (Lee <i>et al.</i> , 2019).....	91
Figure 41 : Courbes de Kaplan-Meier étudiant les taux de survie des chiens atteints de processus tumoral en fonction de la concentration d'ADNcf ou d'ADNct.	92
Figure 42 : Evolution de la concentration (ligne continue) et de l'indice d'intégrité (ligne en pointillés) de l'ADNcf selon la réponse au traitement en fonction du temps (en jours). (Tagawa <i>et al.</i> , 2019)	94

Figure 43 : Evolution de la concentration plasmatique d'ADNct incluant la mutation BRAF V595E chez six chiens atteints de carcinome urothélial en fonction de la réponse au traitement au cours du temps (en jours). (Tagawa <i>et al.</i> 2020)	95
Figure 44 : Courbes ROC et détail des capacités diagnostiques des panels de miARN composés des 1 à 13 miARN montrant les meilleures capacités à distinguer les individus malades et sains .97	97
Figure 45 : Expressions de miARN-126 et mi-ARN-214 relatives à l'expression de miARN-16 chez des chiens atteints d'hémangiosarcome (n=10), de splénomégalies bénignes (n=9) et sains (n=10). Courbes ROC montrant les performances diagnostiques de ces deux biomarqueurs. (Heishima <i>et al.</i> , 2015)	103
Figure 46 : Expressions de miARN-126 et mi-ARN-214 relatives à l'expression de miARN-16 chez des chiens sains et atteints de tumeurs épithéliales, non épithéliales et diverses. (Heishima <i>et al.</i> , 2017)	104
Figure 47 : Distributions des expressions plasmatiques de trois miARN ayant montré une différence significative ($p < 0,05$) entre les chiens atteints de lymphome de type T (n=13) et les chiens sains (n=10). (Craig <i>et al.</i> , 2019)	106
Figure 48 : Concentrations plasmatiques de miARN-122 chez des chiens sains (n = 120), atteints de fibrose hépatique (n = 6), de maladie hépatique inflammatoire (n = 19) et de néoplasie hépatique (n = 5). (Bulkowska <i>et al.</i> , 2017)	107
Figure 49 : Courbes de Kaplan Meier montrant les taux de survie chez les chiens atteints de tumeurs épithéliales, d'adénocarcinomes et de mélanome en fonction des concentrations sériques de miARN-126 et -214. (Heishima <i>et al.</i> , 2017)	108
Figure 50 : Courbes de Kaplan Meier montrant les taux de survie globale chez les chiens atteints de lymphome de type T (a) et B (b et c) en fonction des concentrations sériques de miARN-222 (a et b) et -181c (c). (Craig <i>et al.</i> , 2019)	109
Figure 51 : Journal médical historique de Thomas Ashworth, décrivant pour la première fois les cellules tumorales circulantes. (Ashworth T. 1869)	111
Figure 52 : Exemple d'identification de CTC marquées CK+/DAPI+/CD45- par le système CellSearch®. (Paoletti et Hayes., 2016)	112
Figure 53 : Courbes ROC de la méthode CellSearch® et de la méthode 84-1 associée à un marqueur de la vimentine. Valeurs diagnostiques des deux techniques pour la détection du cancer de la prostate en fonction de différentes valeurs seuils. (Satelli <i>et al.</i> , 2017)	113
Figure 54 : Courbes de Kaplan-Meier indiquant le taux de survie globale en fonction du nombre de CTC chez les patients atteints de cancers métastatiques du sein, colorectal et de la prostate avant initiation d'une thérapie de chimiothérapie. Graphiques générés par les données présentées par Cohen et al., (2008), Cristofanilli et al., (2004) et par Bono et al., (2008). (Andree <i>et al.</i> , 2016)..	115
Figure 55 : Courbe de Kaplan-Meier étudiant la durée de survie globale chez les patientes atteintes de cancer du sein de stade IV _{indolent} (<5 CTC/7,5mL, ligne continue) et de stade IV _{agressif} (≥ 5 CTC : ligne discontinue). (Cristofanilli <i>et al.</i> , 2019)	116

Figure 56 : Courbes de Kaplan-Meier montrant le taux de survie chez les chiennes présentant un carcinome mammaire métastaté, en fonction de la présence ou non de CTC (à gauche), ou d'une valeur seuil de 2 CTC / 7,5mL de sang (à droite). (Marconato <i>et al.</i> , 2019)	121
Figure 57 : Nombre de cellules positives au Collagène I par 10 ⁶ leucocytes détectées au cours du temps chez trois chiens. (Wright <i>et al.</i> , 2019)	122
Figure 58 : L'origine des MDSCs. Tiré de <i>Myeloid-derived suppressor cells as regulator of the immune system</i> , Gabrilovich et Nagarai, 2009.	123
Figure 59 : Courbes de Kaplan-Meier montrant le taux de survie globale chez les patientes atteintes de cancer du sein, en fonction des différents stades (I,II,III,IV), présentant un %MDSCs inférieur à 1% (A) ou supérieur à 1% (B). (Gonda <i>et al.</i> 2017)	126
Figure 60 : Diagrammes en boîte représentant les %MDSCs parmi les groupes de chiens sains et atteints de tumeur. (Goulart <i>et al.</i> , 2012)	128
Figure 61 : Préparations de cyto-centrifugation de MDSCs triées par cytométrie de flux, avec une morphologie de G-MDSCs (PMN-MDSC à gauche) et M-MDSCs (à droite), barre d'échelle : 10 µm. (Goulart <i>et al.</i> , 2019)	128
Figure 62 : Diagrammes en boîte représentant des %G-MDSCs parmi les différents groupes sains, inflammatoire non néoplasique, et tumeur. (Goulart <i>et al.</i> , 2019).....	129
Figure 63 : Diagrammes en boîte représentant des %M-MDSCs parmi les différents groupes : sain, inflammatoire non néoplasique, et tumeurs. (Goulart <i>et al.</i> , 2019).....	130
Figure 64 : Comparaison des taux de MDSCs parmi les cellules mononucléées du sang chez des chiens sains par rapport aux chiens atteints de tumeur mammaire bénigne, maligne sans signe de métastase, et malignes avec métastases. * signifie p<0,05, *** signifie p<0,001. (Mucha <i>et al.</i> , 2016)	131
Figure 65 : Diagrammes à boîte montrant les %M-MDSC (A) et %G-MDSC (B) chez les chiens atteints de mélanome (MM) et les chiens sains (Control). Le diagramme en boîte, les barres verticales et les points en A et B représentent l'écart interquartile, les 10e et 90e percentiles et les valeurs aberrantes. * signifie p ≤ 0,001. (Hutchison <i>et al.</i> , 2019)	132
Figure 66 : Diagramme de dispersion montrant l'évolution du %M-MDSC (C) et %G-MDSC (D) au cours du protocole de traitement chez 33 chiens atteints de mélanome. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. (ANOVA * p = 0.003, ** p < 0.001).....	132
Figure 67 : Schéma du fonctionnement des systèmes de filtres et détecteurs d'un cytomètre en flux (Givan <i>et al.</i> , 2001).....	140
Figure 68 : Cytogramme représentant la méthode de gating chez un chien atteint de carcinome transitionnel.....	141
Figure 69 : Vérification position des différentes populations selon taille et granulosité parmi les PBMCs.....	142
Figure 70 : Diagramme en boîte comparant les %MDSCs des chiens avec traitements AIS (n = 6), AINS (n = 5), et sans traitement (n = 31).	146

Figure 71 : Diagramme en boîte montrant les valeurs de %MDSCs chez les chiens sains et les chiens atteints de processus néoplasiques.....	147
Figure 72 : Diagramme en boîte montrant les valeurs de %MDSCs chez les chiens sains, les chiens atteints de processus néoplasiques peu avancés (n = 23) et avancés (n = 13)	148
Figure 73 : Histogrammes montrant la distribution des valeurs du %MDSCs dans la population de chiens atteints de processus néoplasique (n = 42)	149
Figure 74 : Diagramme en boîte montrant les valeurs de %MDSCs chez les chiens sains et les chiens atteints de tumeurs mammaires (n = 14).	150
Figure 75 : Diagramme en boîte montrant les valeurs de %MDSCs chez les chiens sains et les chiens atteints de tumeurs mammaires bénignes (n = 7) et malignes (n = 3).	151
Figure 76 : Diagramme en boîte montrant les valeurs de %MDSCs chez les chiens sains, les chiens atteints de mastocytomes.	153
Figure 77 : Diagramme en boîtes montrant les valeurs de %MDSCs chez les chiens sains, et chez les chiens atteints de lymphomes (n = 11).....	154
Figure 78 : Courbe ROC évaluant les performances diagnostiques du %MDSCs pour la détection d'un processus néoplasique peu avancé.	155
Figure 79 : Suivi du taux de MDSCs chez un chien atteint de mastocytome cutané au cours du traitement, du 10/10/2018 au 30/01/2019	156
Figure 80 : Suivi du taux de MDSCs et des numérations leucocytaires chez un chien atteint de mastocytome cutané au cours du traitement, de J0 (diagnostic) à J112.....	157
Figure 81 : Suivi du taux de MDSCs chez un chien atteint de lymphome rectal au cours du traitement, du 7/11/2018 au 30/10/2019.....	158
Figure 82 : Suivi du taux de MDSCs et de la numération leucocytaire chez un chien atteint de lymphome rectal au cours du traitement, du 7/11/2018 au 30/10/2019.....	158
Figure 83 : Diagramme des fractions de vrais positifs, vrais négatifs, faux positifs et faux négatifs en fonction des valeurs seuils de %MDSCs	192

Liste des tableaux

Tableau 1 : Distribution des résultats au sein d'une population de N individus, d'un test de sensibilité Se , de spécificité Sp , et dont la prévalence de la maladie recherchée est Pr au sein de cette population.....	27
Tableau 2 : Exemples de valeurs de prédiction positive et négative pour un test diagnostique ayant une sensibilité égale à 99% et une spécificité égale à 98%	28
Tableau 3 : Causes d'une élévation de la concentration sérique d'AFP (Adapté de Wong <i>et al.</i> , 2015)	54
Tableau 4 : Performances diagnostiques de TK1 pour identifier les chiens atteints de tumeurs hématopoïétiques (lymphomes et leucémies).....	72
Tableau 5 : Etudes montrant la différence de quantité d'ADNcf entre des groupes de chiens atteints de processus néoplasiques et des groupes de chiens sains.	88
Tableau 6 : miARN circulants associés à une valeur pronostique chez les patients atteints de TPNPC (adapté de Müller <i>et al.</i> , 2020).....	99
Tableau 7 : Caractéristiques des chiens sains.....	143
Tableau 8 : Caractéristiques des chiens présentant un processus tumoral.....	144
Tableau 9 : Liste des différentes atteintes tumorales incluses dans l'étude	145
Tableau 10 : Caractéristiques des 11 chiens présentant un processus tumoral et recevant un traitement anti-inflammatoire au moment du prélèvement sanguin.....	146
Tableau 11 : Localisation, grade et stade des mastocytomes inclus dans cette étude.....	152
Tableau 12 : Localisation, grade et stade des lymphomes inclus dans cette étude	154
Tableau 13 : Sensibilités, spécificités, valeurs prédictives positives et négatives en fonction des valeurs seuils de %MDSCs pour le diagnostic des chiens atteints de processus néoplasique en phase précoce de développement.....	191

Liste des abréviations

ACE : antigène carcino-embryonnaire (= CEA)

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNcf : ADN libre circulant (Cell-free AND)

ADNct : ADN circulant tumoral

AFP : Alpha-foetoprotéine

AGR2 : Anterior Gradient protein 2

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

ALAT : alamine aminotransférase

AMH : Hormone Anti-Müllerienne

APASL : Asian Pacific Association for the Study of the Liver (Association de l'Asie Pacifique pour l'étude du Foie)

APC : cellule présentatrice d'antigène

ARG1 : arginase 1

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ASAT : aspartate aminotransférase

ASCO : American Society for Clinical Oncology (Société Américaine d'Oncologie Clinique)

ATP8B1 : ATPase Phospholipid Transporting 8B1

AUC : aire sous la courbe (Area Under the Curve)

BCL2 : B cell lymphoma 2

BSA : Bovine Serum Albumin

BV8 : Bombina Variegeta 8

CA15-3 : Antigène carbohydraté 15-3

CAN SINEs : Carnivore-specific short interspersed nuclear elements (petites séquences nucléaires intercalées spécifiques des carnivores)

CCL-2 : Chemokines ligands 2

CD45 : cluster de différenciation 45

CEA : carcinoembryonic antigen (antigène carcinoembryonnaire : ACE)

cfDNA : circulating free DNA (ADN libre circulant)

CHC : Carcinome hépatocellulaire

CHOP : cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone

CHUVA : Centre Hospitalier Vétérinaire d'Alfort

CK18 : cytokératine 18

CLDN7 : Claudin 7

CMySP : Cellules myéloïdes du sang périphérique

COX : cyclooxygénase

CpG : Cytosine-phosphorothioate-guanine

CPSE : Canine Prostate Specific-arginine Esterase

CR : réponse complète

CRP : Protéine C-réactive

CT : chimiothérapie

CTC : cellules tumorales circulantes

CTC-ETI : Circulating Tumor Cell – Endocrine Therapy Index (Indice de thérapie endocrinienne par les cellules circulantes tumorales)

Cu : Cuivre

CXCL-5 : Motif Chemokine Ligand 5

DAPI : Di Aminido Phenyl Indol

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EASL : European Association for the Study of the Liver (Association Européenne pour l'étude du Foie)

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

EGF : facteur de croissance épidermique

EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor (récepteur du facteur de croissance épidermique)

EIQ : Espace Inter-Quartile

ENVA : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

EORTC : European Organisation for Research and Treatment of Cancer (Organisation européenne pour la recherche et le traitement du cancer)

EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule (molécules d'adhésion des cellules épithéliales)

EPI : tumeur épithéliale

ER : estrogen receptor (récepteur des oestrogènes)

ESMO : European Society for Medical Oncology (Société européenne pour l'oncologie médicale)

ESR1 : estrogen receptor 1

Fab : Fragment antigen binding (anticorps de souris anti-anticorps)

FACS : fluorescence-activated cell sorting (trieur de cellules par fluorescence)

FDA : Food and Drug Administration (Administration américaine de la nourriture et des médicaments)

FITC : fluorescein isothiocyanate (IsoThioCyanate de Fluorescéine)

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor (facteur de croissance hématopoïétique granulocytaire humain)

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

G-MDSC : cellules myéloïdes suppressives polynucléaires

HER2 (ErbB2) : human epidermal growth factor receptor 2 (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain)

HGF : facteur de croissance des hépatocytes

HM : tumeur mésoenchymateuse / mésodermique hématopoïétique

HMW-MAA : Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (antigène associé au mélanome de haut poids moléculaire humain)

HR : Hazard Ratio

HT : hormonothérapie

IFN : Interféron

IgG : immunoglobulines G

IL-10 : interleukine 10

IMCs : cellules myéloïdes immatures

iNOS : induced Nitric Oxid Synthase

ISET : isolement par taille des cellules tumorales

LDH : Lactate Déshydrogénase

LINE : long interspersed nuclear elements (Eléments nucléaires longs intercalés)

LPAM : Melphalan

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MCT : mastocytome cutané

MDSCs : myeloid derived suppressor cells (Cellules myéloïdes suppressives)

MHCII : major histocompatibility complex class II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II)

miARN : microARN

MIT : mitoxantrone

MM9 : metalloprotéases matricielles 9

M-MDSC : cellules myéloïdes suppressives monocytaires

NCCN : National Comprehensive Cancer Network (réseau national américain de lutte contre le cancer)

NGS : méthode de séquençage de nouvelle génération (ou méthode de séquençage à haut débit) (Next-Generation Sequencing-based methods)

NHM : tumeur mésenchymateuse non hématopoïétique

NIH : National Institute of Health (Institut national de la santé)

NK : Natural Killer

NM : mélanome

OR : Odd Ratio

PAL : phosphatase alcaline

PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique

PBS : Tampon Phosphate Alcalin

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PD : Progressive disease (maladie progressive)

PG : prostaglandine

PGE2 : prostaglandine E2

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PMN-MDSC : polymorphonuclear MDSC (cellules myéloïdes suppressives polynucléaires)

PR : réponse partielle

PSA : Antigène Spécifique de la Prostate

Q2 : 2^e Quartile

ROC : Receiver Operating Characteristic

ROS : Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)

RPM : rotation par minute

RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction

SD : Stable disease (maladie stable)

Se : Sensibilité

Sp : Spécificité

TGF : Transforming Growth Factor (facteur transformant)

TK1 : Thymidine Kinase 1

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNM : tumor nodes metastasis (tumeur primitive, adénopathies régionales, métastases)

TP53 : Tumor Protein 53

V7-AR : androgen-receptor splice variant 7

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor)

Zn : Zinc

Introduction

L'utilisation de biomarqueurs représente un enjeu majeur dans le domaine de l'oncologie en médecine humaine comme vétérinaire et dont la connaissance croissante ces deux dernières décennies, a permis une meilleure prise en charge des patients atteints de tumeurs. En effet, les biomarqueurs tumoraux permettent notamment d'améliorer la détection d'un processus tumoral, de le caractériser, d'observer son évolution, et également d'établir un pronostic. Dans certains cas, les biomarqueurs permettent de prédire la réponse au traitement et ainsi d'adapter au mieux ce dernier, ils peuvent également se révéler intéressants en tant que cible thérapeutique lorsqu'ils participent à la croissance ou la dispersion de la tumeur.

Ainsi, le champ d'application des biomarqueurs en oncologie est vaste, et les nouvelles technologies permettent encore à l'heure actuelle d'en découvrir de nouveaux types, tel que les microARN (miARN), les exosomes ou encore les cellules tumorales circulantes.

Il existe de nombreuses natures de biomarqueurs ; ionique, protéique, glucidique, lipidique, nucléiques et enfin cellulaire. Ils se retrouvent aussi bien au sein de la tumeur que dans son environnement. Ainsi certains biomarqueurs sont dosés à partir des prélèvements histologiques de la tumeur, tandis que d'autres peuvent être dosés dans des fluides tel que le sang, l'urine, le liquide cérébro-spinal ou encore la salive. Dans ce travail, nous nous intéresserons notamment aux biomarqueurs tumoraux dosés à partir d'un échantillon sanguin, et particulièrement aux cellules myéloïdes suppressives (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs).

Parmi les biomarqueurs cellulaires se trouvent les MDSCs. Il s'agit d'un groupe de cellules myéloïdes immatures comprenant les précurseurs des macrophages, granulocytes, et des cellules dendritiques. Elles possèdent notamment une activité immunomodulatrice impliquée dans certains processus physiologiques ou pathologiques, par exemple lors de la gestation (Köstlin *et al.*, 2017) ou lors d'inflammations (Ray *et al.*, 2013) tels que des inflammations chroniques, des infections, des traumatismes ou encore des processus néoplasiques. Lorsqu'un processus inflammatoire intervient chez un individu, les MDSCs sont produites en plus grande quantité dans la moelle osseuse, qu'elles quittent pour gagner le compartiment vasculaire et les organes impliqués dans le but d'y exercer une action anti-inflammatoire. On comprend donc qu'elles interviennent lors d'une tumeur qui, dans les premières phases, s'accompagne d'un environnement péri-tumoral inflammatoire. Ainsi, il a été montré que le taux de MDSCs présent dans le sang périphérique est supérieur chez un individu atteint d'une néoplasie que chez un individu sain, en médecine humaine et vétérinaire (Diaz-Montero *et al.*, 2009 ; Goulart *et al.*, 2012).

Une étude récemment menée à l'École nationale vétérinaire d'Alfort (ENVA) a montré la possibilité d'identifier et quantifier les MDSCs par cytométrie en flux au sein du BioPôle, centre d'analyses médicales présent sur le site de l'ENVA et travaillant étroitement avec le centre hospitalier universitaire vétérinaire d'Alfort (Nadal *et al.*, 2018). De plus, cette étude a montré une différence significative entre le pourcentage moyen de MDSCs parmi les cellules mononucléées du sang périphérique, mesuré chez des chiens sains et celui mesuré chez des chiens présentant une atteinte tumorale, avec une valeur supérieure chez les chiens atteints d'un processus tumoral. Toutefois,

l'effectif étudié ne fut pas assez important et trop hétérogène, pour utiliser le dosage des MDSCs dans le sang comme outil diagnostique, notamment à l'aide d'une valeur seuil permettant de suspecter fortement une tumeur avancée avec présence de métastases. De plus, les individus inclus dans cette étude n'ayant pas été suivis sur le long terme, il ne fut pas possible d'établir une valeur pronostique du taux de MDSCs sanguin, ni d'étudier sa variation au cours du temps lors d'un traitement. C'est donc sur ces aspects liés au dosage des MDSCs que le travail expérimental de cette thèse portera, en complétant l'étude réalisée par Nadal *et al.* (2018).

Ce travail se compose de deux parties. La première partie, étude bibliographique, vise à définir la notion de biomarqueur, en exposer les intérêts dans le domaine de l'oncologie, et enfin d'établir un état des lieux comparatif des connaissances actuelles concernant les biomarqueurs sanguins en oncologie vétérinaire et humaine.

La deuxième partie détaillera le travail expérimental concernant les MDSCs, effectué dans le but d'appuyer et compléter les résultats obtenus lors de l'étude de Nadal *et al.* (2018), d'établir si le dosage sanguin des MDSCs peut ou non être un outil diagnostique, pronostique, et de suivi d'un processus tumoral.

Première partie : bibliographie

1. Définitions et intérêts des biomarqueurs

En 2015, dans le but d'accorder la communauté scientifique sur la notion du terme de biomarqueur et l'utilisation qui en est faite, la Food and Drug Administration (FDA) et le National Institute of Health (NIH) ont conjointement élaboré un glossaire : le BEST (Biomarkers, Endpoints, and other Tools) (FDA-NIH Biomarker Working Group, 2016). Les définitions abordées dans cette partie sont issues de cette ressource.

A. Définition générale

Un biomarqueur est une caractéristique définie qui est mesurée comme un indicateur d'un processus biologique normal ou pathogène, ou de la réponse à une exposition ou une intervention, incluant les interventions thérapeutiques. Les caractéristiques moléculaires, histologiques, radiographiques ou physiologiques sont des types de biomarqueurs.

Les biomarqueurs sont utilisés à plusieurs fins distinctes en clinique comme dans les études pharmaceutiques. Ainsi il existe plusieurs catégories de biomarqueurs en fonction de leur utilisation : les biomarqueurs de diagnostic, de suivi, de pronostic, de susceptibilité ou risque, les biomarqueurs prédictifs, les biomarqueurs pharmacodynamiques et enfin les biomarqueurs de sécurité.

a. Les biomarqueurs diagnostiques

Un biomarqueur diagnostique est utilisé pour détecter ou confirmer la présence d'une maladie ou d'un état d'intérêt, ou pour identifier les individus avec un sous-type de maladie.

L'utilisation de biomarqueurs diagnostiques est centrale dans la pratique médicale. Elle est souvent le moyen d'affirmer la présence d'une affection nécessitant la mise en place d'un traitement particulier. Il est fréquent que leur utilisation permette de faire la distinction entre plusieurs affections étant possiblement à l'origine d'un même symptôme ou d'un ensemble de symptômes peu spécifiques. Par exemple, le taux de glucose sanguin peut être utilisé comme biomarqueur diagnostique de diabète de type 2.

Aussi, certaines maladies sont caractérisées en plusieurs sous-types, comme c'est le cas pour les lymphomes qui peuvent être de type T, B, de haut grade, bas grade ou encore de grade intermédiaire. La nature ou le processus physiopathologique peuvent considérablement varier en fonction du sous-type de l'affection, et il est alors nécessaire de déterminer celui-ci pour adapter le traitement. Par exemple, les marqueurs cellulaires de surface utilisés en immunomarquage peuvent

être utilisés comme biomarqueurs diagnostiques dans le but de distinguer un lymphome de type T ou B pour lesquels les traitements sont différents.

b. Les biomarqueurs de suivi

Un biomarqueur de suivi est un biomarqueur mesuré périodiquement dans le but d'évaluer l'état de santé ou l'état d'une maladie, ou pour mettre en évidence l'exposition (ou son effet) à un traitement médical ou un agent environnemental.

Ainsi, les biomarqueurs de suivi sont principalement utilisés en pratique pour objectiver l'évolution d'une maladie au cours du temps, particulièrement lors d'atteinte chronique. Les traitements instaurés peuvent donc être modifiés en fonction de ces mesures. Cela évite une médicalisation trop intense et des risques d'obtention d'effets secondaires trop importants en regard du statut de l'affection, ou cela permet au contraire d'instaurer une thérapie plus agressive lorsque les valeurs des biomarqueurs mesurées semblent indiquer que le contrôle de l'affection n'est pas suffisant. De plus, la répétition des mesures permet de porter une attention particulière au changement positif ou négatif de la valeur du biomarqueur, reflet de l'effet bénéfique ou délétère d'une exposition, dont les interventions thérapeutiques. L'amplitude de la variation des biomarqueurs est également un paramètre qui peut être évalué et interprété cliniquement comme une réponse plus ou moins importante de l'objet étudié à l'exposition rencontrée.

Par exemple, la créatinine est un des biomarqueur de choix à mesurer pour contrôler l'évolution sur le long terme d'une maladie rénale chronique chez le chat, ayant une relation linéaire avec le débit de filtration glomérulaire (Sparkes *et al.*, 2016).

c. Les biomarqueurs pronostiques

Les biomarqueurs pronostiques sont des biomarqueurs utilisés pour identifier la probabilité d'un événement clinique, d'une récurrence ou d'une progression d'une maladie ou d'une affection chez les patients atteints.

Ainsi, les biomarqueurs pronostiques sont ceux qui indiquent une probabilité plus ou moins importante de l'apparition d'une manifestation clinique dans le futur. La plupart sont utilisés dans un contexte d'individus diagnostiqués comme atteints d'une affection, dans le but d'évaluer la probabilité de toutes les évolutions possibles de l'affection en question. Les manifestations cliniques dont les biomarqueurs pronostiques évaluent la probabilité d'apparition sont le décès, la résolution, la progression, la récurrence d'une affection, ou encore le développement d'une autre affection. Les durées de survie globale, les durées de survie sans récurrence ou encore les durées de survie sans progression sont également étudiées par les biomarqueurs pronostiques. Si un résultat positif d'un test se basant sur un biomarqueur particulier est significativement associé à une durée de survie moins importante des patients, alors ce biomarqueur peut être considéré comme pronostique pour les patients souffrant de l'affection étudiée. Ils représentent donc un outil essentiel dans l'établissement d'un pronostic chez un patient.

Par exemple, la concentration sérique en cortisol dans les 24 premières heures d'hospitalisation chez le chien est un biomarqueur pronostique, pouvant donner une information sur le risque de la survenue du décès. En effet, l'étude de Yuki *et al.* (2019) a montré que la concentration sérique de cortisol était significativement plus élevée chez les chiens ayant présenté un décès que chez les chiens ayant survécu après 30 jours suivant le début d'hospitalisation.

En oncologie, les biomarqueurs tels que la taille de la tumeur, le nombre de nœuds lymphatiques atteints par les cellules tumorales, la présence de métastases ou encore certains paramètres histologiques sont habituellement utilisés comme biomarqueurs pronostiques. Toutefois, de plus en plus de biomarqueurs moléculaires sont mesurés et utilisés à la place ou en plus de ces derniers indicateurs, dont nous étudierons une partie plus loin dans cette étude bibliographique.

d. Les biomarqueurs prédictifs

Les biomarqueurs prédictifs sont des biomarqueurs utilisés pour identifier les individus qui sont plus susceptibles de montrer une réponse favorable ou défavorable à une exposition, un produit médical ou un agent environnemental, que des individus comparables ne présentant pas le biomarqueur.

Ainsi, les biomarqueurs prédictifs sont principalement utilisés en pratique pour déterminer si un patient est susceptible de répondre ou non à un traitement, en regard de la présence, l'absence, ou la valeur mesurée du biomarqueur. Il est donc particulièrement intéressant d'utiliser, lorsque cela est possible, un biomarqueur prédictif pour éviter de pratiquer des thérapies peu susceptibles d'avoir un effet positif sur une affection donnée.

Par exemple, concernant le cancer rectal localement avancé chez l'Homme, il semblerait que la présence d'une forte expression de miARN-31 au sein de la tumeur soit un biomarqueur prédictif de la réponse à la chimioradiothérapie pré-chirurgicale (Caramés *et al.*, 2016). En effet, cette étude a montré que, de façon significative, une forte expression de miARN-31 mesurée sur une biopsie de la tumeur était corrélée à une faible réponse à la chimioradiothérapie, contrairement à une faible expression de miARN-31 corrélée à une bonne réponse au traitement. Ainsi, les patients atteints de cancer rectal localement avancé chez l'Homme présentant une forte expression de miARN-31 ne devraient pas présenter de réponse favorable au traitement actuel de chimioradiothérapie. Ce biomarqueur prédictif permettrait donc de ne pas faire subir, ou d'adapter ce traitement aux patients dans ce dernier cas.

e. Les biomarqueurs pharmacodynamiques ou de réponse

Les biomarqueurs pharmacodynamiques ou de réponse sont des biomarqueurs utilisés pour mettre en évidence qu'une réponse biologique a été observée chez un individu qui a été exposé à un produit médical ou à un agent environnemental.

Ainsi, ce sont principalement en pratique des biomarqueurs dont la variation de la mesure est étudiée en réponse à l'administration d'un produit pharmaceutique. La variation observée sera

alors considérée comme indicatrice d'une bonne ou mauvaise réponse au traitement, et permettra ainsi de prendre la décision de le poursuivre ou non. La répétition fréquente des dosages de ces biomarqueurs dans le temps au cours d'un traitement les fait souvent appartenir également à la catégorie des biomarqueurs de suivi.

Par exemple, la cytokératine 18 (CK18) est une phosphoglycoprotéine exprimée spécifiquement par les cellules épithéliales simple, glandulaire et en transition. Lors de l'apoptose de ces cellules, la CK18 est clivée par des caspases, et ces fragments sont mesurables dans le sang périphérique (Caulin *et al.*, 1997, Yang *et al.*, 2014). Une étude a pu montrer l'intérêt du dosage de ce biomarqueur sanguin comme indicateur précoce d'une réponse au traitement de chimiothérapie contenant de l'anthracycline chez les sujets atteints de tumeur mammaire (Demiray *et al.*, 2006 ; Olofsson *et al.*, 2007). En effet, cette étude a pu mettre en évidence une association significative entre une élévation marquée du taux plasmatique de CK18 clivée post traitement, et une bonne réponse à cette chimiothérapie chez les individus présentant une tumeur mammaire. Ainsi, la CK18 clivée peut être considérée comme un biomarqueur pharmacodynamique pour un traitement de chimiothérapie à base d'anthracycline chez les sujets atteints de cancer du sein ; une augmentation significative de son taux plasmatique après le traitement indique une bonne réponse à celui-ci.

f. Les biomarqueurs d'innocuité

Un biomarqueur d'innocuité est un biomarqueur mesuré avant ou après une exposition à un produit médicamenteux ou un agent environnemental pour indiquer la probabilité, la présence ou l'étendue de la toxicité comme effet indésirable. Ces biomarqueurs sont principalement utilisés en pratique pour évaluer les potentiels effets toxiques des médicaments en essai clinique, ainsi que pour surveiller les effets toxiques potentiels chez les sujets sous traitement.

Par exemple, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) présentent un effet délétère sur le débit de filtration glomérulaire par inhibition de la synthèse de prostaglandines. Ainsi, la créatinine sérique, marqueur de la fonction rénale, est utilisée comme biomarqueur d'innocuité des AINS sur la fonction rénale dans le suivi des chiens sous traitement (Lomas et Grauer, 2015).

g. Les biomarqueurs de susceptibilité ou de risque

Un biomarqueur de susceptibilité ou de risque est un biomarqueur qui indique le potentiel d'un individu ne présentant pas de signe clinique apparent d'une maladie ou d'une affection à développer cette maladie ou affection. Ainsi, ces biomarqueurs sont principalement utilisés en pratique pour identifier si une personne saine au moment de la mesure présente un risque plus important que la normale de développer une affection particulière. Il est important de faire la distinction avec un biomarqueur pronostique qui évalue la probabilité d'apparition d'un événement spécifique chez un individu déjà diagnostiqué comme atteint d'une affection médicale.

L'intérêt majeur de ces biomarqueurs est de guider les stratégies de prévention de maladies lorsque cela est possible chez les individus identifiés comme étant à risque de développer une affection. Ils peuvent donc déterminer si des moyens de préventions doivent être mis en place, tels que des adaptations nutritionnelles, changements dans le mode de vie, ou interventions particulières. Ils peuvent également justifier une surveillance plus rapprochée chez ces individus, comme par des examens sanguins ou d'imagerie plus fréquents ou plus précoces, chez les sujets à risque.

Par exemple, chez la femme comme chez la chienne, les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2, ont été identifiées comme associées à l'apparition de tumeur mammaire (Struewing *et al.*, 1997 ; Rivera *et al.*, 2009). Ainsi, chez les individus atteints de ces mutations, des examens tels que palpation mammaire ou mammographie devraient être réalisés de manière plus rapprochée.

B. Les caractéristiques des biomarqueurs

Il existe deux sortes de tests : les tests quantitatifs et les tests qualitatifs. Les tests qualitatifs apportent des résultats binaires, comme positif ou négatif, ou encore présent ou absent. Par exemple, lors d'un test à la fluorescéine dans un cas de suspicion d'ulcère cornéen, si la fluorescéine adhère sur une zone de l'œil, le résultat est dit positif et signe un ulcère de la cornée, tandis que si la fluorescéine n'adhère aucunement à la surface de l'œil, alors le test est dit négatif et la cornée ne présente pas d'ulcère. C'est un test qualitatif.

Les tests quantitatifs apportent un résultat chiffré. C'est le cas de la majorité des tests utilisés en clinique, permettant notamment de doser ou mesurer des éléments biologiques. Par exemple, le test permettant de mesurer la concentration sérique de créatinine s'exprime par une valeur en mg/L ou en $\mu\text{mol/L}$. C'est un test quantitatif. Lorsqu'un test quantitatif est utilisé à visée diagnostique, une valeur seuil est attribuée lors des études cliniques, définissant un résultat positif, soit la présence de la maladie lorsque la valeur obtenue est au-dessus ou en deçà de cette valeur.

a. Caractéristiques intrinsèques d'un biomarqueur

Tout test utilisé à visée diagnostique dans le domaine médical fournit un résultat positif ou négatif, chez des individus malades ou sains. En règle générale, un résultat positif tend à indiquer la présence de l'affection d'intérêt, tandis qu'un résultat négatif à indiquer l'absence de la maladie. Lorsqu'un résultat positif est obtenu chez un individu malade il s'agit d'un vrai positif (VP), s'il est obtenu chez un individu sain alors il s'agit d'un faux positif (FP). Dans le même sens, un résultat négatif obtenu chez un individu sain est appelé un vrai négatif (VN), s'il est obtenu chez un individu malade il s'agit d'un faux négatif (FN).

Ces données peuvent être synthétisées à l'aide d'un tableau :

		<i>Maladie</i>	
		Oui	Non
<i>Résultat du</i>	Positif	a = nombre de VP	b = nombre de FP
<i>test</i>	Négatif	c = nombre de FN	d = nombre de VN

Chaque biomarqueur est alors pourvu de caractéristiques intrinsèques qui ont pour but d'évaluer la fiabilité des résultats du test effectué par rapport au statut de l'individu.

- La sensibilité :

La sensibilité (Se) est la probabilité d'obtenir un résultat positif (T+) chez un individu atteint de l'affection d'intérêt (M+). C'est donc la proportion de VP chez les malades.

$$Se = P(T+/M+) = \frac{a}{a+c} = \frac{VP}{VP+FN} = \alpha$$

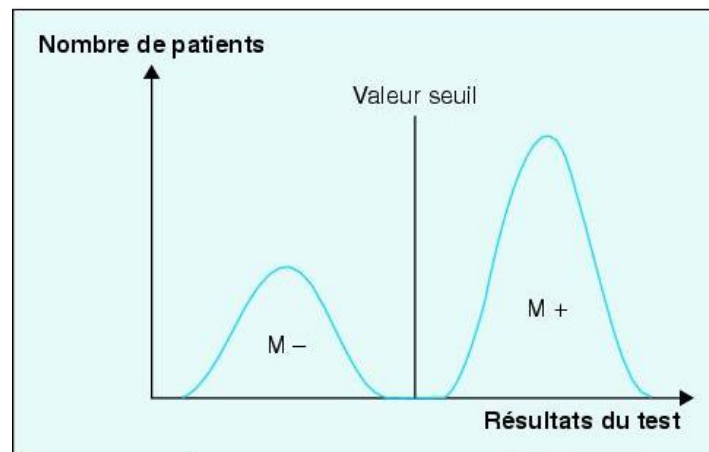
- La spécificité :

La spécificité (Sp) est la probabilité d'obtenir un résultat négatif (T-) chez un individu sain (M-). C'est donc la proportion de VN chez les individus sains.

$$Sp = P(T-/M-) = \frac{d}{b+d} = \frac{VN}{VN+FP} = \beta$$

Ces caractéristiques sont établies en fonction d'une méthode de référence reconnue comme fiable. Elles sont fixes pour un test qualitatif dont la réponse est binaire. Comme vu précédemment, pour un test quantitatif, la réponse positive ou négative est évaluée par rapport à une valeur seuil définie. Les sensibilité et spécificité du test varient alors en fonction de la valeur seuil choisie. En effet la distribution des valeurs prises par le test diffère entre les individus atteints et les individus non atteints :

Figure 1 : Distribution des valeurs prises par le test chez les individus sains et malades (Delacour *et al.*, 2005)



La figure 1 illustre le cas d'un test parfait où les valeurs prises par le test diffèrent totalement entre les individus sains et malades, la valeur seuil est alors fixée entre les deux distributions distinctes. Toutefois, dans la plupart des cas, la distribution de ces valeurs se chevauche entre les individus sains et malades, et ainsi des mêmes valeurs peuvent être obtenues chez un individu malade comme chez un individu sain, comme le montre la figure 2.

La sensibilité et la spécificité d'un test présentant une distribution telle que montrée sur la figure 2 vont alors dépendre de la valeur seuil choisie.

Figure 2 : Distribution des résultats dans le cas d'un test chez des individus sains et malades, présentant un chevauchement (Riedinger *et al.*, 2005)

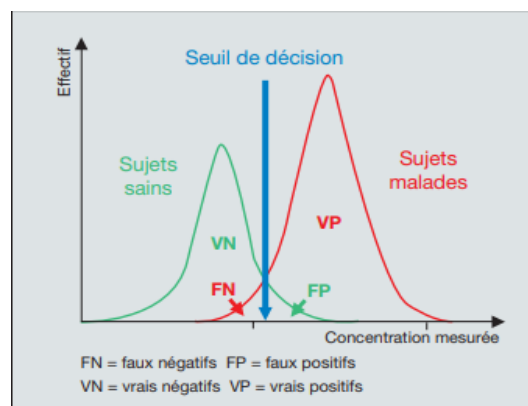


Figure 3 : Déplacement de la valeur seuil vers les hautes valeurs (Riedinger et al., 2005)

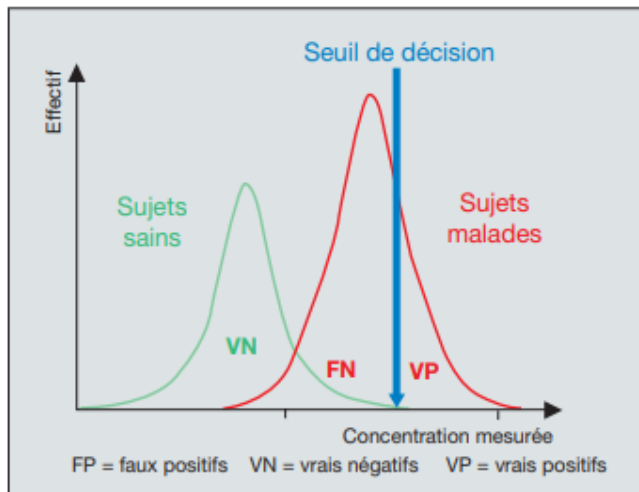
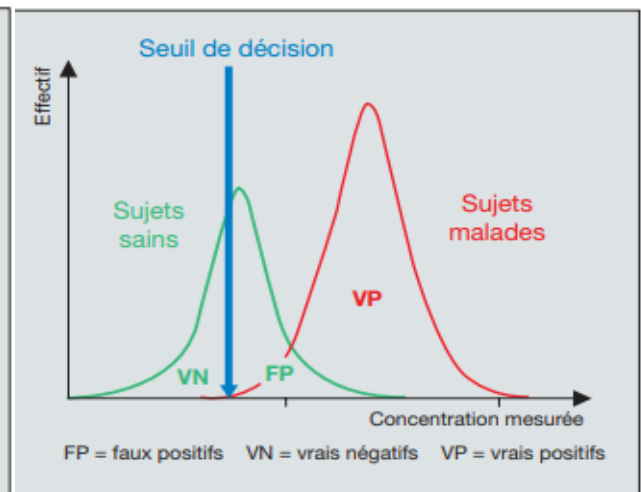


Figure 4 : Déplacement de la valeur seuil vers les basses valeurs (Riedinger et al., 2005)



En effet, on peut comprendre que si la valeur seuil est décalée vers la droite comme montré sur la figure 3, alors les résultats positifs concerneront moins d'individus sains, on aura donc une meilleure spécificité avec une diminution du nombre de faux positifs, toutefois on peut voir que la sensibilité en sera altérée avec une augmentation du taux de faux négatifs. Avec le même principe, si l'on décale la valeur seuil vers la gauche (figure 4), alors on diminuera le nombre de faux négatifs en augmentant donc la sensibilité du test, mais le nombre de faux positif augmentera faisant diminuer la spécificité du test.

Ainsi, la spécificité et la sensibilité d'un test quantitatif sont variables en fonction de la valeur seuil choisie. Favoriser la sensibilité ou la spécificité du test influera négativement sur l'autre.

b. Autres caractéristiques du test

- *Les valeurs prédictives*

La probabilité que le sujet soit réellement malade sachant que son test est positif s'appelle la valeur prédictive positive (VPP). De la même façon, la probabilité que le sujet soit réellement indemne sachant que son test est négatif s'appelle la valeur prédictive négative (VPN).

Si l'on considère un test avec une sensibilité Se , une spécificité Sp , réalisé dans une population de N individus, ayant pour but de diagnostiquer une maladie de prévalence Pr au sein de cette population, alors la répartition des résultats sera celle exposée dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Distribution des résultats au sein d'une population de N individus, d'un test de sensibilité Se , de spécificité Sp , et dont la prévalence de la maladie recherchée est Pr au sein de cette population.

	Malade	Sain
Résultat positif	$SeNPr$	$(1-Sp)N(1-Pr)$
Résultat négatif	$(1-Se)NPr$	$SpN(1-Pr)$
Total	NPr	$N(1-Pr)$

$$VPP = \frac{VP}{VP+FP} = \frac{SeP}{SePr+(1-Sp)(1-Pr)}$$

$$VPN = \frac{VN}{VN+FN} = \frac{Sp(1-Pr)}{Sp(1-Pr)+(1-Se)Pr}$$

Ces deux valeurs s'obtiennent en fonction de la prévalence de la maladie, et varient donc en fonction des populations étudiées si les prévalences des affections étudiées sont différentes.

Ainsi, on peut comprendre d'après ces formules que plus la prévalence de la maladie est importante, plus grande sera la valeur prédictive positive. Le même raisonnement s'applique pour la valeur prédictive négative dont la valeur est plus élevée lorsque la prévalence de la maladie dans la population est faible.

Par exemple, pour un test de dépistage de sensibilité égale à 99% et de spécificité égale à 98%, les variations de la VPP et de la VPN sont exposées dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Exemples de valeurs de prédiction positive et négative pour un test diagnostique ayant une sensibilité égale à 99% et une spécificité égale à 98%

Prévalence	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
0,1%	<5%	99,99%
1%	33%	99,98%
5%	72%	99,95%
10%	84%	99,89%
30%	95%	99,56%

Ainsi, on peut constater que la prévalence de la maladie au sein de la population étudiée influe fortement sur les valeurs prédictives du test. Ainsi, pour un même test diagnostique ayant une très bonne sensibilité de 99% et une spécificité de 98%, si la prévalence de la maladie dans la population est de 1 pour 1000, alors la valeur prédictive positive est inférieure à 5%, donc la probabilité qu'un individu ayant obtenu un résultat positif soit réellement malade est très faible.

Il est donc important dans la pratique clinique de tenir compte de la prévalence de la maladie au sein de la population, ou des valeurs prédictives lorsqu'elles sont fournies, dans l'élaboration de l'interprétation d'un résultat.

- *Le rapport de vraisemblance*

Le rapport de vraisemblance est uniquement dépendant de la sensibilité et spécificité du test, et donc indépendant de la prévalence de la maladie dans la population cible. Le rapport de vraisemblance positif (RV+) est le rapport entre la fréquence du résultat positif du test chez les malades (soit Se) et la fréquence de ce même résultat chez les non malades (soit $1 - Sp$). Le rapport de vraisemblance négatif (RV-) est le rapport entre la fréquence du résultat négatif du test chez les malades (soit $1 - Se$) et la fréquence de ce même résultat chez les non malades (soit Sp).

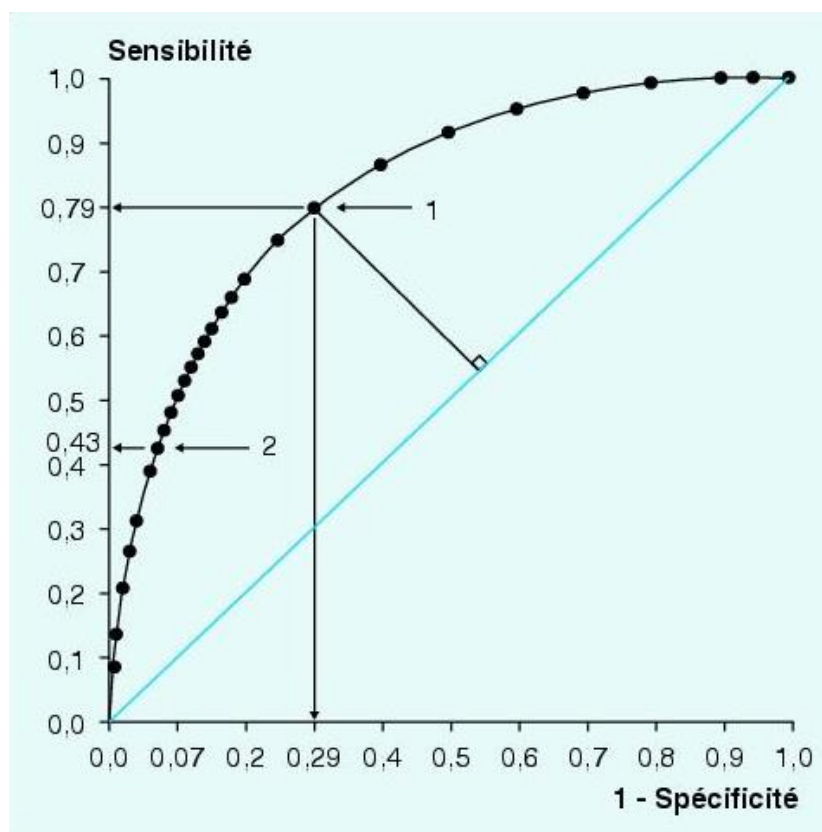
$$RV + = \frac{Se}{1-Sp} \qquad RV - = \frac{1-Se}{Sp}$$

Par exemple, pour un test ayant une sensibilité égale à 80% et une spécificité égale à 90%, alors $RV+ = 8$ et $RV- = 0,22$. On peut alors dire qu'un résultat positif a 8 fois plus de chance d'être obtenu par un individu atteint de la maladie que sain, et un résultat négatif a environ 5 fois moins de chance d'être obtenu chez un individu malade que sain.

c. Courbe ROC, outil d'analyse des performances du test

Pour déterminer la valeur seuil idéale, on détermine une courbe Receiver Operating Characteristic (ROC). C'est la courbe obtenue en rapportant la sensibilité et le complément de la spécificité obtenue pour toutes les valeurs seuils possibles d'un test quantitatif.

Figure 3 : Exemple d'une courbe ROC (Delacour *et al.*, 2005)



Une courbe ROC a plusieurs utilités :

- Déterminer une valeur seuil.

Par exemple, le point le plus proche du coin supérieur gauche représentant une sensibilité et une spécificité de 100%, est le point correspondant à la valeur seuil ayant le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité.

Toutefois, ce n'est pas toujours le point choisi. En effet, de nombreux critères sont à prendre en compte dans la décision de la valeur seuil. Si la maladie est très grave par exemple, alors une meilleure sensibilité est demandée car ne pas identifier un malade à cause d'un faux négatif serait très impactant pour l'individu atteint non traité. Il en va de même pour le coût du traitement par exemple, s'il est trop élevé alors que la maladie est peu impactante, alors on préférera éliminer les faux positifs, et donc une bonne spécificité, pour ne pas mettre en place de traitement coûteux à tort.

- Estimer la performance du test.

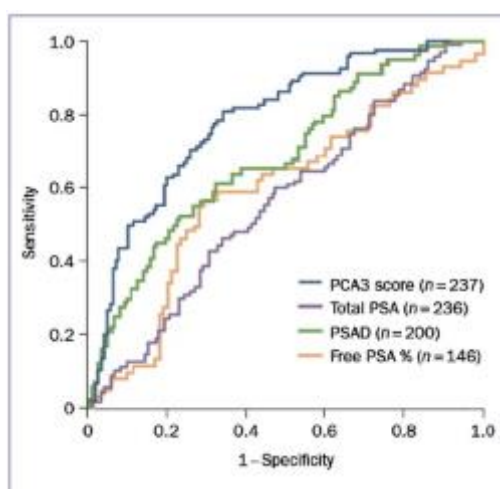
Une mesure importante à observer à l'aide d'une courbe ROC est l'aire sous la courbe (ASC). Si l'ASC est statistiquement différente de 0,5 (soit un test non informatif comme c'est le cas pour un lancer de pièce), alors ce test a un pouvoir informatif. Plus la courbe est proche du coin supérieur gauche, plus les spécificité et sensibilité du test s'approchent de 100%. Aussi, l'ASC tendra vers la valeur de 1.

- Sélectionner des groupes

Selon les cas, on peut se servir de ces courbes pour identifier un groupe à haut risque, notamment dans le cadre d'un nouveau traitement par exemple. Dans ce cas, on privilégie une zone de haute spécificité, soit en partie gauche de la courbe. Ainsi, les résultats faussement positifs pour la valeur seuil choisie seront rares, plaçant les individus ayant un résultat positif comme hautement à risque d'être atteints de la maladie.

- Comparer plusieurs tests entre eux

Figure 5 : Comparaison des courbes ROC de plusieurs biomarqueurs du cancer de la prostate chez l'homme (De La Taille *et al.*, 2009).



Comme exposé dans la figure 5 ci-dessus, il est possible de comparer l'informativité de plusieurs tests entre eux en comparant les aires sous la courbe ROC de chaque test et en déterminant si la différence est significative ou non. Si la différence est significative entre deux tests, alors celui dont la valeur de l'ASC est la plus élevée, est le plus informatif. Toutefois, il est possible d'avoir recours à la comparaison d'aires sous la courbe partielle pour comparer deux tests sur des ensembles particuliers de valeurs de spécificité ou sensibilité (McClish, 1989). Il est notamment nécessaire d'y avoir recours lorsque deux courbes ont une ASC semblable mais une allure différente, soit deux courbes d'ASC semblables mais présentant un ou des croisements. Aussi, selon la forme de la courbe, la comparaison de l'ASC partielle peut être plus concluante que la comparaison de l'ASC totale (Ma *et al.*, 2015). Ainsi, dans certains cas, pour deux tests dont les

ASC totales ne sont pas significativement différentes, le recours aux ASC partielles peut mettre en évidence une performance significativement plus élevée de l'un par rapport à l'autre sur un intervalle de haute spécificité par exemple.

2. Les biomarqueurs sanguins en oncologie humaine et vétérinaire

Idéalement, un biomarqueur tumoral serait pourvu d'une sensibilité et spécificité parfaites, dans le but de différencier parfaitement les individus atteints d'un processus néoplasique des individus sains, et de les identifier dans les stades les plus précoces possibles. Il devrait également être capable d'identifier un sujet atteint de n'importe quel processus tumoral, et permettre un suivi de l'évolution du cancer dans le temps et prévoir les éventuelles rechutes ou récidives. Malheureusement, un tel biomarqueur n'a pas été mis en évidence à l'heure actuelle. Ainsi, une grande partie des biomarqueurs tumoraux sanguins utilisés actuellement en médecine humaine sont spécifiques d'un type tumoral.

Le compartiment vasculaire est facilement accessible, ainsi le sang est un prélèvement de choix, dont le geste de prélèvement est peu invasif et dont la mesure des composants est souvent rapide. En opposition, les biopsies sont des prélèvements à caractère plus invasif et dont la lecture et l'interprétation sont souvent plus longues. De plus, les biopsies nécessitent régulièrement en médecine vétérinaire une sédation voire une anesthésie générale, exposant donc à l'animal un risque de décès supplémentaire lié à cet acte, pouvant être important suivant l'état physiologique de l'animal.

De plus, contrairement à la majorité des prélèvements par biopsie, les prélèvements sanguins peuvent être répétés de manière rapprochée. Ce qui permet d'établir un suivi des paramètres mesurés dans le temps et donc d'évaluer de potentielles modifications de comportement du cancer, avec ou sans traitement.

Toutefois, aucun biomarqueur sanguin n'est utilisé couramment à visée diagnostique en médecine vétérinaire. Nous essaierons donc dans cette partie d'effectuer un état des lieux des avancées scientifiques concernant les paramètres sanguins ayant montré un potentiel intérêt en tant que biomarqueurs tumoraux en médecine vétérinaire, en comparant aux données actuelles fournies en médecine humaine.

De très nombreux biomarqueurs sanguins sont étudiés en oncologie humaine, de telle sorte qu'une étude exhaustive développant tous ces marqueurs est peu réalisable. Nous nous concentrerons donc dans cette première partie sur ceux ayant été également étudiés chez l'animal, et plus particulièrement les biomarqueurs ayant montré des valeurs intéressantes en termes de spécificité vis à vis des atteintes tumorales.

A. Les biomarqueurs ioniques

a. L'ion Cu^{2+}

Le cuivre est un micronutriment essentiel, impliqué dans de nombreux processus physiologiques fondamentaux comme par exemple l'élimination des radicaux libres par les superoxydes dismutases, l'érythropoïèse, le métabolisme du fer, la formation de pigments, ou encore les réactions immunitaires. Il a également été mis en évidence chez l'Homme que le cuivre tient un rôle dans la tumorigénèse par son effet sur l'activation des voies de signalisation NF κ B ou BRAF (Brady *et al.*, 2014). Son rôle a également été montré dans les processus d'angiogénèse, de migration tumorale et de développement de métastases (Pan *et al.*, 2002 ; MacDonald *et al.*, 2014 ; Karginova *et al.*, 2019). Ainsi, de nombreuses études en recherche humaine ont mis en évidence une association entre la concentration sérique de cuivre et la présence de différentes tumeurs.

Peu d'études sont actuellement disponibles chez l'animal sur ce sujet, néanmoins, une a pu mettre en évidence une élévation de la concentration du cuivre chez des chiennes atteintes de tumeurs mammaires (Tünay *et al.*, 2009). Cette étude a été menée sur 15 chiennes atteintes de tumeurs mammaires malignes en comparaison à un groupe de 15 chiennes saines. Les concentrations sériques en ion cuivre étaient respectivement égales à 203.4±53.8 ppm et 100.3±31.1 ppm. Cette différence étant statistiquement significative ($p < 0,01$). Toutefois, le faible effectif de cette étude, ainsi que l'absence de comparaison des apports nutritifs notamment, ne permettent pas d'établir le dosage du cuivre sérique comme biomarqueur diagnostique des tumeurs mammaires chez la chienne.

Cependant, de nombreuses études en médecine humaines ont pu mettre en évidence une hausse significative de la concentration sérique en cuivre lors de différents processus tumoraux, notamment le cancer du sein chez la femme (Yücel *et al.*, 1994), les cancers buccaux (Baharvand *et al.*, 2014 ; Tiwari *et al.*, 2016 ; Chen *et al.*, 2019), les cancers des voies aérodigestives hautes (Ressnerova *et al.*, 2016), les cancers du col de l'utérus (Cunzhi *et al.*, 2003), de la vessie (Mao et Huang, 2013), des cancers hépatiques (Balter *et al.*, 2015 ; Fang *et al.*, 2019), pancréatiques (Lener *et al.*, 2016) ou encore les cancers colorectaux (Ribeiro *et al.*, 2016). Ainsi, le nombre important d'études mettant en évidence une augmentation significative des taux sériques de cuivre permettent aux auteurs de suggérer l'utilisation de ce marqueur comme outil d'aide au diagnostic de ces différentes atteintes tumorales.

Les travaux de Stepien *et al.* (2017) chez l'Homme ont de plus permis de mettre en évidence que la concentration de cuivre sérique pouvait être utilisée comme biomarqueur de risque d'apparition de cancers colorectaux. En effet, ce travail prospectif réalisé sur 10 ans a pu étudier 966 cas de cancers colorectaux en Europe. Ils ont alors pu mettre en évidence une association statistiquement significative ($p = 0,003$) entre une augmentation de la concentration sérique en cuivre et l'émission d'un diagnostic de cancer colorectal dans les deux ans suivant cette observation. Ainsi, le dosage sérique du cuivre pourrait être utile en tant que biomarqueur de risque des cancers colorectaux en Europe.

L'étude de Fang *et al.* (2019) a, quant à elle, porté sur la concentration sérique de cuivre comme biomarqueur pronostique des carcinomes hépatiques chez l'Homme. La durée de survie

spécifiquement liée au cancer et la durée de survie globale ont été étudiées en fonction du taux sérique de cuivre. Il est apparu qu'un taux élevé de cuivre sérique était significativement associé à une diminution de la durée de survie spécifiquement liée au cancer hépatique ($p < 0,01$) et de la durée de survie globale ($p < 0,01$). Cette étude a également mis en évidence une corrélation entre la concentration sérique en cuivre et le stade du cancer : les patients atteints présentant les stades les plus avancés du cancer présentaient des concentrations en cuivre sérique plus importantes. Ainsi, les auteurs de cette étude suggèrent l'utilisation du dosage sérique de cuivre comme biomarqueur pronostique dans les atteintes tumorales hépatiques.

Toutefois, il est à noter que le taux de cuivre sérique peut se retrouver significativement élevé dans certaines affections non cancéreuses, tel que le montre l'étude menée par Tiwari *et al.* (2016) mettant en évidence que les individus atteints d'affections buccales non cancéreuses ont un taux de cuivre significativement différent de celui des patients sains ($p < 0,01$), mais non significativement différent des patients atteints de cancer dans cette région. De plus, certains processus tumoraux semblent ne pas montrer d'augmentation significative de la concentration sérique en cuivre, tel que le montre l'étude de Jaafari-Ashkavandi *et al.* (2019) dans les cas de cancers des glandes salivaires.

Ainsi, plusieurs études montrent de manière significative une augmentation de la concentration sérique de cuivre dans les cas d'atteintes tumorales et pourrait se révéler être une aide au diagnostic de ces atteintes. Ce marqueur semble également pouvoir être utilisé, suivant le type de processus tumoral, comme biomarqueur pronostique ou de diagnostic précoce. Toutefois, son utilisation reste limitée en raison du fait que d'autres affections peuvent être responsables de variations de ces valeurs, que tous les processus tumoraux ne semblent pas montrer ces mêmes variations, que le rôle de l'apport nutritionnel en cuivre est peu étudié, et que les études précédemment citées n'étudient pas la différence de performance entre ce biomarqueur et ceux utilisés en routine pour les affections tumorales étudiées.

b. Les isotopes du cuivre ^{65}Cu et ^{63}Cu

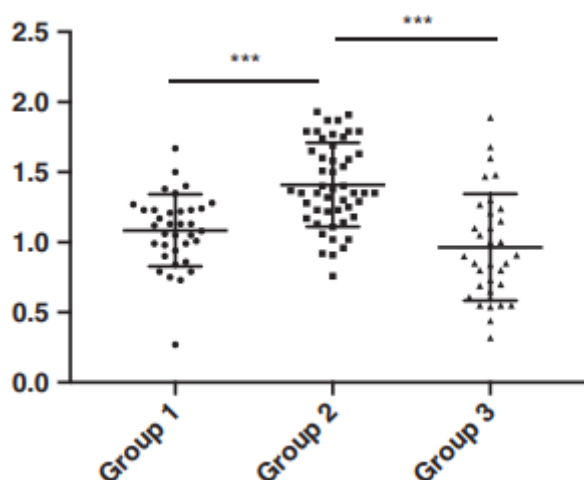
Les nouvelles méthodes de mesures par spectrométrie de masse d'abord développées dans le domaine de la géologie, ont pu être largement utilisées dans le domaine de la science biologique. Les variations des distributions des différents isotopes d'un même élément sont donc aujourd'hui mesurables, permettant de mettre en évidence une différence allant jusqu'à 0,05% entre les deux isotopes stables du cuivre : ^{65}Cu et ^{63}Cu au sein d'un compartiment biologique.

Ainsi, plusieurs études ont été menées dans le but de mettre en évidence une différence entre les ratios des deux isotopes stables du cuivre dans le sérum et dans les tissus des patients atteints de cancers par rapport aux patients sains.

Chez le chien, l'étude de Chamel *et al.* (2017) a étudié le ratio $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ (δCu) dans le sang de 35 chiens atteints de tumeurs, 33 chiens atteints de maladie non néoplasiques, et 49 chiens sains. Le groupe composé des chiens atteints de cancer ainsi que celui composé des chiens atteints de maladies non cancéreuses ont montré une valeur de δCu significativement différente par rapport

aux chiens sains ($p < 0,0001$, figure 6). Le δCu observé était significativement plus faible chez les chiens présentant une atteinte néoplasique ou non néoplasique que chez les chiens sains. Toutefois, la différence observée entre les chiens atteints d'une tumeur et ceux atteints d'une affection non tumorale n'était pas significativement différente ($p = 0,1$). Ceci impose qu'une diminution du δCu n'est pas spécifique d'une atteinte néoplasique, et l'interprétation d'un tel résultat doit se faire en tenant compte du contexte clinique. Les auteurs suggèrent de focaliser de futures études sur certaines affections néoplasiques particulières pour identifier celles qui pourraient présenter une variation isotopique significative par rapport à d'autres affections non néoplasiques.

Figure 6 : Distribution des δCu chez les chiens diagnostiqués avec cancer (groupe 1, n = 35), chez les chiens sains (groupe 2, n = 49), et chez les chiens atteints de maladies non tumorales (groupe 3, n = 33). (Chamel *et al.*, 2017)



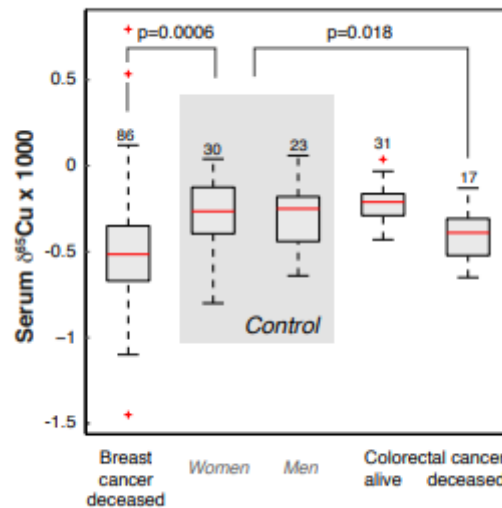
De plus, cette étude a pu évaluer le δCu chez 6 chiens atteints de lymphomes lors de la phase clinique de la maladie, puis après rémission suivant le protocole de chimiothérapie instauré. La différence observée avant et après le traitement n'a pas été significative ($p = 0,09$), ce qui peut être dû à l'effectif réduit observé. Toutefois, 5 des 6 chiens observés ont présenté une hausse notable du δCu après rémission clinique. Les auteurs suggèrent alors d'effectuer une recherche sur un nombre plus important d'individus pour montrer un éventuel intérêt du δCu dans le suivi de la réponse au traitement de chimiothérapie.

En sciences médicales humaines, deux études principales étudient la variation isotopique du cuivre dans le sérum de patients atteints de processus néoplasiques (Télouk *et al.*, 2015 ; Balter *et al.*, 2015).

L'étude de Télouk *et al.* (2015) est une étude longitudinale (entre 1997 et 2013) visant à évaluer le δCu sérique sur 20 cas de cancers mammaires (90 prélèvements) et huit cancers colorectaux (49 prélèvements) en comparaison à un groupe témoin composé de 28 femmes et 22 hommes sains. Elle met en évidence une diminution significative de δCu chez les patientes atteintes

du cancer du sein par rapport aux patientes saines ($p = 0,004$). Une même diminution significative a été rapportée pour les cancers colorectaux montrant un décès durant la période d'observation par rapport aux patients sains ($p = 0,018$, figure 7).

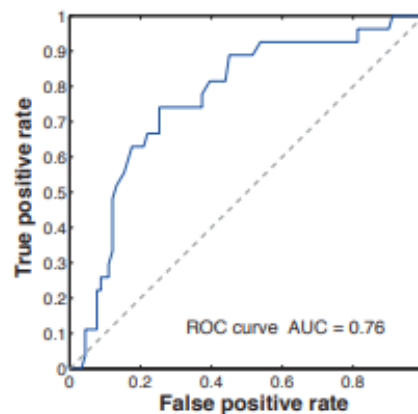
Figure 7 : Diagramme en boîte représentant la distribution des valeurs de δCu chez les individus atteints de cancer du sein, les hommes et les femmes sains, ainsi que les cancers colorectaux ayant montré et n'ayant pas montré de décès au cours de l'étude. (Télouk *et al.*, 2015)



Les lignes rouges indiquent la médiane, les croix rouges indiquent les valeurs aberrantes.

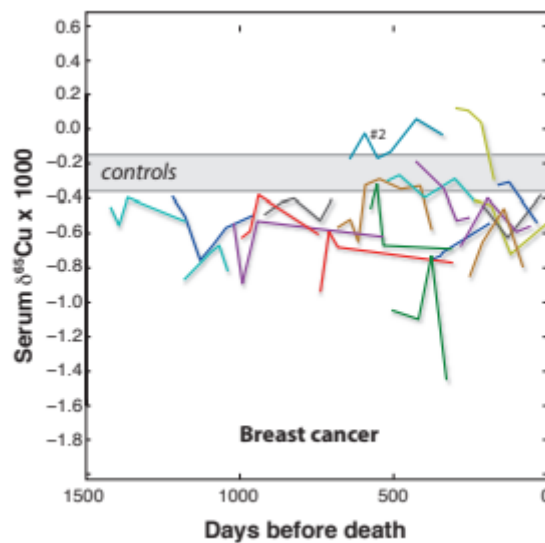
De plus, cette étude a publié une courbe ROC (figure 8) du dosage de δCu sérique chez les patientes atteintes de tumeur mammaire, montrant une ASC = 0,76 avec une valeur seuil optimale de $-0,037\%$. Les auteurs suggèrent que cette valeur d'ASC obtenue soutient le potentiel du δCu comme outil diagnostique.

Figure 8 : Courbe ROC associée au dosage de δCu dans le diagnostic de cancer du sein chez la femme d'après les résultats de l'étude de Télouk *et al.* (2015).



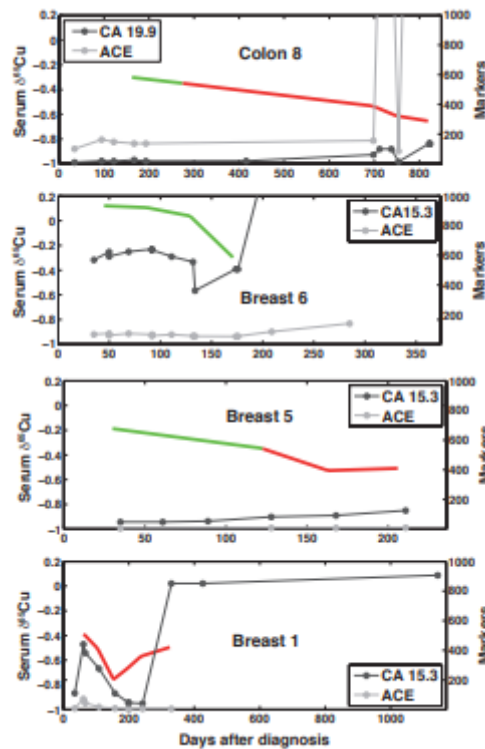
Bien que le nombre de cancers colorectaux dans cette étude ne permettent pas de garantir un test significatif, l'ASC estimée par la courbe ROC concernant le diagnostic de cancer colorectal par le dosage du δCu a été évaluée à 0,85 avec une valeur seuil optimale égale à $-0,30\text{‰}$. En considérant comme valeur critique $\delta\text{Cu} = -0,35\text{‰}$, les auteurs rapportent que toutes les femmes atteintes de cancer du sein sauf une, ainsi que les quatre individus atteints de cancer colorectal n'ayant pas survécu avant la fin de l'étude, ont montré dès le début ou au cours de leur suivi des valeurs faibles de δCu ($< -0,035\text{‰}$) (figure 9).

Figure 9 : Evolution de δCu sérique chez les 20 femmes atteintes de cancer du sein. Chaque ligne de couleur différente représente une patiente différente. (Télouk *et al.*, 2015)



Enfin, cette étude a comparé les évolutions dans le temps des δCu chez les patients atteints de cancer par rapports aux biomarqueurs recommandés pour le diagnostic des cancers du sein : l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) et l'antigène carbohydrate 19.9 (CA19.9), ainsi que pour le diagnostic du cancer colorectal : l'antigène carbohydrate 15.3 (CA15.3). Télouk *et al.* ont observé d'une part qu'il était fréquent que des patients présentant des taux considérés normaux de biomarqueurs recommandés montraient pourtant un $\delta\text{Cu} < -0,035\text{‰}$ (un cancer colorectal et 10 cancers du sein). De plus, ils ont montré que la diminution de la valeur de δCu précède généralement l'augmentation des biomarqueurs conventionnels de trois à six mois (figure 10).

Figure 10 : Evolution des biomarqueurs ACE, CA19.9, CA15.3 et du δCu chez quatre patients atteints de cancer colorectal ou du sein.

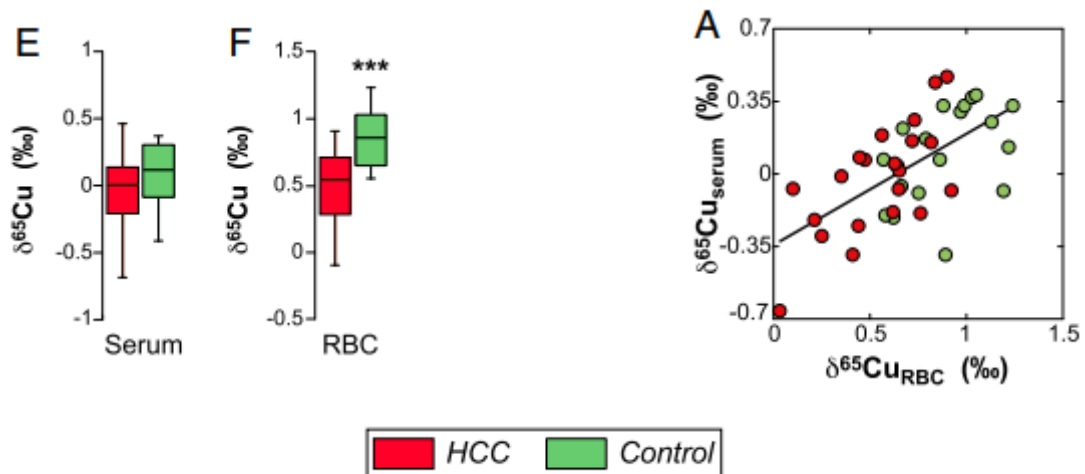


Les couleurs rouges et vertes de la ligne montrant l'évolution de la valeur δCu sérique indiquent qu'elle se situe respectivement au-dessus et au-dessous de la valeur critique de $-0,035\text{‰}$. Ces quatre patients montrent que la chute du δCu sérique peut se révéler plus précoce que l'augmentation des biomarqueurs utilisés de plusieurs mois.

Les auteurs de cette étude proposent que la différence de proportion d'isotopes ^{65}Cu et ^{63}Cu s'explique par la chélation préférentielle des isotopes lourds par les lactates, produits en grande quantité par le tissu tumoral qui favorise la glycolyse par rapport aux tissus sains.

Balter et al. (2015) ont étudié les variations d'isotopes du cuivre δCu dans le sang de 23 patients atteints de carcinomes hépatocellulaires avec celles de 20 hommes sains. Ils ont pu observer une diminution de δCu parmi les hommes atteints de cancer (figure 11), mais cette association n'était pas statistiquement significative ($p = 0,134$). Toutefois ils ont montré une association significative ($p < 0,0001$) entre la diminution du rapport δCu dans les érythrocytes et la présence d'un cancer hépatocellulaire (figure 11). Ils montrent par ailleurs une association significative entre les valeurs de δCu dans les érythrocytes et dans le sérum des patients atteints de cancer ($p < 0,0001$), suggérant que le δCu sanguin est reflété dans les deux compartiments (figure 12). Ils émettent l'hypothèse que le manque de significativité de la diminution du rapport δCu dans le sérum des patients cancéreux est dû au faible temps de demi-vie du cuivre dans le sérum $t_{1/2} = 5$ jours par rapport à celui du cuivre dans les érythrocytes $t_{1/2} = 60$ jours.

Figure 11 : Diagramme en boîte représentant la distribution des valeurs de δCu dans le sérum (E) et les érythrocytes (F) chez les individus atteints de carcinome hépatocellulaire (HCC) et les individus sains (Control). Composition isotopique du cuivre dans le sérum des patients en fonction de celle dans les érythrocytes (A). (Balter *et al.*, 2015)



De plus, cette étude a réalisé une série de biopsies hépatiques en zones saines et tumorales chez sept patients. La composition en isotope ^{65}Cu s'est révélée systématiquement plus élevée au sein des tissus néoplasiques par rapport aux tissus hépatiques sains. Les auteurs proposent comme hypothèse que l'accumulation de ^{65}Cu au sein de la tumeur serait une des origines de la diminution observée du rapport $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ dans le sang des patients atteints de cancer, et que cela implique que la valeur du δCu diminuerait en fonction de la sévérité de l'atteinte tumorale. Ceci serait une observation d'intérêt pour l'estimation de la charge tumorale des patients.

En conclusion, le rapport des isotopes du cuivre $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ sérique semble être un candidat possible à une utilisation en tant que biomarqueur chez l'Homme et le chien. Toutefois, le nombre limité d'études, de sujets et de types de tumeurs étudiés, ne permet pas encore à l'heure actuelle de considérer ce biomarqueur en utilisation pratique.

c. L'ion Zn^{2+}

De nombreuses études ont également évalué la différence de concentration du zinc (Zn) sérique entre les sujets atteints de cancer et les sujets sains chez l'Homme. Seules deux études concernant le chien ont été trouvées sur la base de données de PubMed. Il semble qu'il y ait plus d'hétérogénéité dans les variations de zinc observées entre les sujets atteints et les sujets sains.

Chez le chien, l'étude de Tünay *et al.* (2009) a montré une diminution significative ($p < 0,05$) de la concentration en Zn sérique chez les chiennes atteintes de tumeurs mammaires ($131,7 \pm 23,2$ ppm) que chez les chiennes saines ($230 \pm 41,7$ ppm).

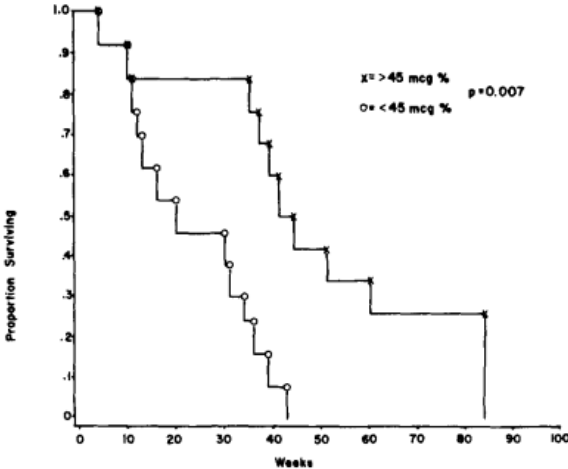
L'étude de Kazmierski *et al.* (2001) a étudié 50 chiens atteints de lymphomes, 52 chiens atteints d'ostéosarcomes et 50 chiens sains. Ils ont également montré une diminution significative de la concentration de Zn sérique chez les chiens atteints de lymphome ($1,05 \pm 0,26$ mg/L) par rapport aux chiens sains ($1,22 \pm 0,36$ mg/L). Une diminution moyenne a également été notée chez les chiens atteints d'ostéosarcomes ($1,12 \pm 0,36$ mg/L), toutefois cette différence n'était pas significative.

Ainsi, l'utilisation de la concentration de zinc sérique chez le chien en tant que biomarqueur diagnostique d'atteinte tumorale nécessite à l'heure actuelle des études supplémentaires incluant plus de sujets et de types tumoraux étudiés, ainsi qu'une comparaison avec des atteintes non tumorales.

Chez l'Homme, les différences observées sont variables suivant les études. L'étude de Zowczak *et al.* (2001) ayant étudié plusieurs atteintes tumorales différentes n'a montré une diminution significative de la concentration en zinc sérique que chez les patients atteints de tumeurs de l'appareil génital et les cancers métastasés. À l'inverse, une diminution significative de la concentration sérique en zinc a par exemple été observée dans les cancers des glandes salivaires (Jaafari- Ashkavandi *et al.*, 2019), de l'utérus et du col de l'utérus (Cunzhi *et al.*, 2003 ; Xie *et al.*, 2018), des poumons (Ying Wang *et al.*, 2019) ou de la vessie (Mao et Huang, 2013). Concernant les patients atteints de tumeurs mammaires, l'étude de Kumar *et al.* (2017) montre une diminution significative du Zn sérique, tandis que la méta-analyse effectuée par X. Wu *et al.* (2015) ne montre pas de différence avec la concentration sérique en Zn des patientes saines. À l'inverse, les patients atteints de cancers buccaux semblent présenter une augmentation significative de la concentration sérique en Zn par rapport aux patients sains (Baharvand *et al.*, 2014 ; Chen *et al.*, 2019).

Ainsi, la concentration sérique en zinc présente de larges variations suivant les types tumoraux. Son utilisation en tant que biomarqueur diagnostique semble donc limitée. Toutefois, l'étude de Issell *et al.* (1981) propose l'utilisation de ce paramètre comme biomarqueur pronostique (figure 12). En effet, comme le montre la figure 12, les auteurs mettent en évidence que la médiane de survie des personnes atteintes de cancer des poumons est significativement plus importante chez les individus pour lesquels la concentration sérique en Zn est supérieure à $45 \mu\text{g/dL}$ (>40 semaines, $p < 0,007$) que chez les individus pour lesquels cette concentration est inférieure (20 semaines).

Figure 12 : Analyse de survie chez les patients atteints de cancer pulmonaire pré-traitement, dont la concentration sérique est supérieure à 45µg/dL et inférieure à 45µg/dL. (Issel *et al.*, 1981)



B. Les biomarqueurs protéiques

a. L'Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE)

L'ACE est une protéine de la famille des immunoglobulines. C'est une glycoprotéine membranaire de haut poids moléculaire (180 à 200kDa), synthétisée principalement dans certaines portions du tube digestif. On la retrouve à la surface apicale des cellules de l'épithélium de la langue, de la portion distale de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle, du côlon et du rectum (Nap *et al.*, 1988). L'ACE joue un rôle dans l'adhésion cellulaire (Benchimol *et al.*, 1989) et fut identifiée en 1965 dans des échantillons tissulaires de tumeur de colon humain (Gold et Freedman, 1965). Très largement étudiée depuis, il a été montré que la synthèse de cette protéine est peu intense dans les conditions physiologiques, et ne s'exprime qu'au pôle apical des cellules de l'épithélium digestif. On en retrouve donc très peu dans le sang en condition physiologique. Toutefois, les cellules tumorales de certains processus néoplasiques produisent cette protéine en forte quantité, et l'expriment sur toute la surface membranaire en perdant leur polarité. Ces cellules ne reposant plus sur une lame basale, c'est ce qui permet de retrouver l'ACE en forte concentration dans le sang des patients atteints de certaines tumeurs. Ainsi, l'ACE est aujourd'hui le marqueur tumoral utilisé de la manière la plus extensive en oncologie humaine.

- *L'ACE chez l'Homme*

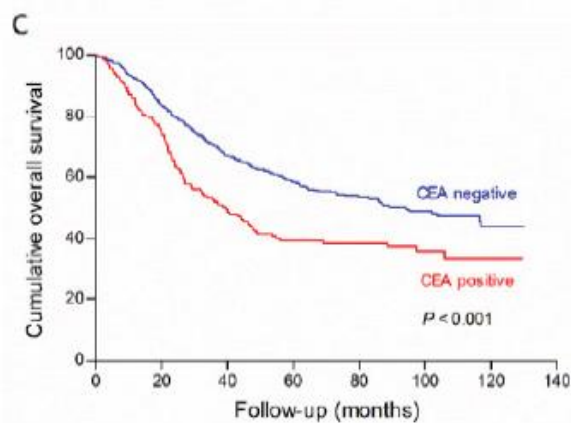
Une très grande quantité d'études sur l'ACE et son utilisation en oncologie ont été menées chez l'homme depuis plus de quarante ans. Ainsi, les principales possibilités d'utilisation de ce biomarqueur en oncologie humaine seront étayées ci-après à l'aide d'exemples d'études effectuées, qui ne représentent en aucun cas l'exhaustivité des résultats fournis jusqu'à présent.

La présence d'une concentration sanguine importante d'ACE est significativement associée à de nombreux types de processus néoplasiques : les cancers pulmonaires (Grunnet et Sorensen, 2012), hépatiques (Ramage *et al.*, 1995), mammaires (Wang *et al.*, 2017), gastriques (Wang *et al.*, 2016) et colorectaux (Das *et al.*, 2017) principalement, mais de plusieurs autres également (Hao *et al.*, 2019). Toutefois, l'augmentation sérique de l'ACE n'est pas spécifique d'une atteinte tumorale, tel que le montre l'étude de Hao *et al.* (2019), montrant une forte et significative augmentation lors d'hépatite, cirrhose, fibrose pulmonaire, de diabète de type 2, ou encore chez les personnes âgées de plus de 65 ans en bonne santé. De plus, les sensibilités rapportées de ce marqueur sont faibles, et leurs valeurs sont en moyenne de 50%. Par exemple, les sensibilités rapportées de l'ACE sérique pour la détection de cholangiocarcinome, de cancer des poumons, ou de cancer du sein ont été respectivement de 53,3% (Ramage *et al.*, 1995), 69% (Okamura *et al.*, 2013) et 22% (Lumachi *et al.*, 1999). Ainsi, en raison des faibles sensibilité et spécificité de ce biomarqueur, son utilisation à visée diagnostique en oncologie humaine est impossible.

L'utilisation possible de l'ACE en tant que biomarqueur pronostique, a été proposée dans de

nombreuses études. Par exemple, une concentration sérique élevée concernant les tumeurs mammaires non métastasées a été démontrée comme significativement ($p < 0,0001$) associée à un moins bon taux de survie sans récurrence (Imamura *et al.*, 2018). De nombreuses études traitant du cancer du poumon s'accordent à dire que le dosage de l'ACE est un marqueur pronostique utile concernant l'évaluation de la survie globale des patients, le risque de récurrence, et/ou la durée de survie sans progression du cancer (Grunnet et Sorensen, 2012). Il en va de même pour les cancers colorectaux pour lesquels une forte concentration sérique a été décrite comme facteur pronostique indépendant, et significativement associée à un moins bon taux de survie globale des patients (Thirunavukarasu *et al.*, 2011). L'étude de Wang *et al.* (2016) concernant les carcinomes gastriques a également montré qu'une augmentation de l'ACE sérique était significativement associée à une diminution de la survie globale (figure 13).

Figure 13 : Analyse de survie des patients atteints de carcinome gastrique en fonction de la valeur de l'ACE sérique (CEA en anglais). (Wang *et al.*, 2016)



L'utilisation de l'ACE en tant que biomarqueur de suivi a aussi été largement étudiée. Il est notamment très utilisé en tant que tel pour les patients atteints d'un cancer colorectal. En effet, une surveillance régulière du taux sérique d'ACE chez ces patients a eu, parmi plusieurs paramètres de suivi, l'impact bénéfique le plus significatif sur la mortalité globale ($p = 0,03$), la détection de récurrence tumorale asymptomatique ($p = 0,007$) et le risque de résection curative ($p = 0,0006$) d'après la méta-analyse menée par Tjandra et Chan (2007). De plus, il apparaît que le dosage de l'ACE chez les patients atteints de carcinome colorectal soit la méthode la plus sensible pour détecter une récurrence ou la présence de métastases hépatiques par rapport aux autres moyens de suivis mis en œuvre, notamment les marqueurs sériques tumoraux, les examens d'imagerie (scanner, radiographie et endoscopie) et les marqueurs sériques de la fonction hépatique (Sugarbaker *et al.*, 1987 ; Rocklin *et al.*, 1991 ; Tsikitis *et al.*, 2009 ; Nicolini *et al.*, 2010). Ainsi, le dosage de l'ACE sérique fait partie des recommandations dans l'élaboration du suivi des patients atteints de cancer colorectal d'après l'*American Society for Clinical Oncology* (Meyerhardt *et al.*, 2013) ainsi que l'*European Society for Medical Oncology* (Van Cutsem *et al.*, 2014).

De plus, il a été démontré que la concentration en ACE sérique pouvait être utilisée comme biomarqueur pharmacologique pour évaluer la réponse aux traitements de chimiothérapie. Par exemple, l'étude de He *et al.* (2015) concernant les patients atteints d'adénocarcinomes gastriques avancés, a mis en évidence que la diminution de la concentration sérique en ACE montrait une réponse positive à la chimiothérapie avec une ASC égale à 0,828, et que l'augmentation de cette

concentration montrait une progression du cancer avec une ASC égale à 0,923. De même, la diminution de la concentration en ACE sérique a été mise en évidence comme significativement associée à une réponse complète au traitement de chimiothérapie chez les patients atteints de cancer rectal (Hu *et al.*, 2018). Enfin, Arrieta *et al.* (2013) ont montré que chez les patients atteints de cancers du poumon non-à-petites cellules, une réduction de la concentration en ACE sérique était associée à une réponse positive au traitement (ASC=0,945) après deux cycles de chimiothérapie, tandis qu'une augmentation du taux d'ACE était associée à une progression de la maladie (ASC = 0,911). Pour une diminution d'au moins 14% de la concentration initiale, la sensibilité et la spécificité à montrer une réponse positive au traitement étaient respectivement de 90,2% et 89,9%, tandis que pour une augmentation d'au moins 18%, la sensibilité et la spécificité à montrer une progression du cancer malgré deux cycles de chimiothérapie étaient respectivement de 85% et 15%. Ainsi, l'ACE montre de bonnes performances en tant que biomarqueur de réponse aux traitements des processus tumoraux étudiés.

En conclusion, l'ACE en oncologie humaine est un biomarqueur pouvant être très informatif dans le pronostic, le suivi ou l'évaluation de la réponse aux traitements. Toutefois, son manque de spécificité en tant que marqueur tumoral, et les faibles valeurs de sensibilités associées en tant que biomarqueur diagnostique rendent son utilisation difficile, et son utilité clinique est toujours sujette à débat pour différents types tumoraux. Ainsi, bien que l'*American Society for Clinical Oncology* et l'*European Society for Medical Oncology* recommandent son utilisation dans le suivi des patients atteints de cancer colorectal, ils ne le recommandent pas concernant le suivi des cancers du poumon non-à-petites cellules ni le cancer du sein.

- *L'ACE chez le chien*

Contrairement au très grand nombre d'études s'intéressant à l'ACE en tant que biomarqueur tumoral sérique chez l'homme, seulement six études ont pu être trouvées concernant le chien.

Cinq sur les six études ont montré que l'ACE est dosable chez le chien à l'aide des kits pour le dosage de l'ACE chez l'Homme. Une seule étude a montré que l'ACE n'était pas mesurable par méthode de chimiluminescence (Marchesi *et al.*, 2007).

Quatre études ont évalué la différence d'expression d'ACE entre des chiens présentant une affection néoplasique et des chiens sains. Les quatre ont étudié les tumeurs mammaires sur des chiennes. Trois des quatre études ont pu mettre en évidence une augmentation significative de la concentration sérique en ACE chez les chiennes atteintes de tumeurs mammaires par rapport aux chiennes saines (Valencakova-Agyagosova *et al.*, 2014 ; Alizadeh et Azimzadeh, 2018 ; Senhorello *et al.*, 2019), tandis que l'étude de Campos *et al.* (2012) n'a pas montré de différence significative. Toutefois on peut observer que les quatre études n'ont pas utilisé la même méthode de dosage de l'ACE. En effet, Campos *et al.* (2012), Senhorello *et al.* (2019) et Alizadeh et Azimzadeh (2018) ont

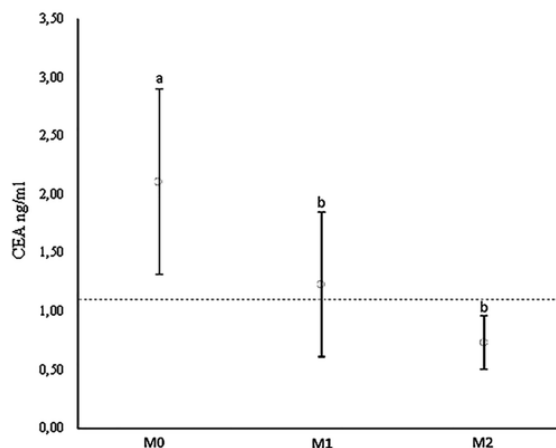
utilisé une méthode de dosage ELISA, tandis que Valencakova-Agyagosova *et al.* (2014) ont utilisé une technique de dosage par radioimmunologie.

L'équipe de Ledecy *et al.* (2013) a dosé l'ACE sérique par méthode radio-immunologique sur 32 chiens sains afin d'estimer les valeurs usuelles chez les chiens sains. Les auteurs proposent l'intervalle [0-0,23] ng/mL comme valeurs usuelles de concentration sérique d'ACE, basé sur le 95^e percentile mesuré dans cette population saine. Ces résultats sont confirmés, par la même méthode de dosage, par l'étude de Valencakova-Agyagosova *et al.* (2014), qui met en évidence une augmentation significative entre la concentration sérique d'ACE chez les chiennes atteintes de tumeurs mammaires et les chiennes saines ($p=0,0001$), avec des valeurs moyennes respectivement égales à $0,25\pm 0,06$ ng/mL et $0,20\pm 0,03$ ng/mL. Etablissant statistiquement la valeur seuil du test à 0,23ng/mL, cette étude a montré que la sensibilité et la spécificité de ce biomarqueur était de 60% et 95% respectivement pour déterminer l'atteinte tumorale des chiennes.

L'étude de Alizadeh et Azimzadeh (2018) a montré par méthode de dosage ELISA, la plus couramment utilisée à l'heure actuelle, une augmentation significative ($p<0,001$) de l'ACE sérique chez 12 Berger Allemand femelles présentant une masse mammaire par rapport à 12 Berger Allemand femelles saines. Toutefois, trois des 12 masses mammaires étant des abcès, il est difficile de conclure quant aux performances du dosage de l'ACE pour la détection de processus néoplasique mammaire.

Avec la même technique de dosage, Senhorello *et al.* (2019) ont étudié la concentration sérique d'ACE par méthode ELISA chez 56 chiennes atteintes de tumeurs mammaires et 21 chiennes saines. Une augmentation significative de cette concentration est montrée chez les chiennes atteintes de tumeurs mammaires. Aussi, une augmentation significative de l'ACE est montrée chez les chiennes ayant une tumeur de taille supérieure à 3cm par rapport aux tumeurs inférieures à 3cm, et une augmentation significative de l'ACE a été notée pour les tumeurs de grade III par rapport aux tumeurs de grade I et II. Une corrélation positive a été observée entre la concentration sérique en ACE et les variables clinico-pathologiques. D'après la courbe ROC réalisée, en déterminant 1,08ng/mL comme valeur seuil, cette étude a établi la sensibilité et la spécificité de l'ACE à détecter la présence de tumeur mammaire à 82,14% et 95,24%. La sensibilité pour cette valeur seuil a été évaluée à 100%, pour les tumeurs de taille supérieure à trois centimètres et les tumeurs métastasées, et à 70% pour les tumeurs de taille inférieure à trois centimètres. Enfin, cette étude a réalisé un travail prospectif en dosant l'ACE sérique avant exérèse chirurgicale (M0), et 15 jours (M1) après chez les 56 chiennes atteintes, puis 45 jours après exérèse (M2) chez 12 de ces chiennes. Il a alors été montré une diminution significative de la concentration sérique en ACE entre M0 et M1 ($p=0,0004$), et entre M0 et M2 ($p<0,0001$), ainsi qu'une diminution, bien que non significative, entre M1 et M2 ($p=0,05$) (figure 14). Ceci montre la dynamique de la concentration sérique d'ACE après intervention chirurgicale.

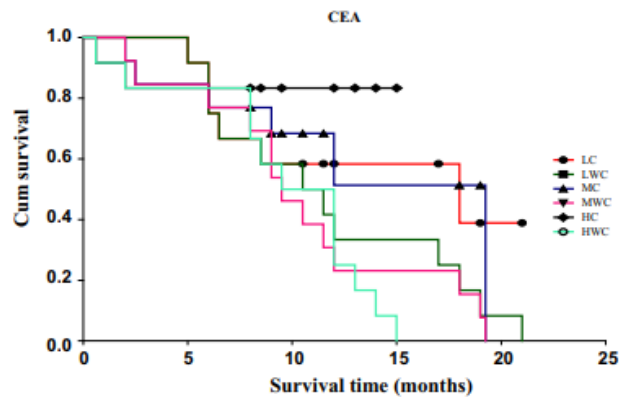
Figure 14 : Évolution des valeurs sériques de CEA avant (M0), 15 jours après (M1) et 45 jours après (M2) exérèse intervention chirurgicale. (Senhorello *et al.*, 2019)



Les lettres différentes indiquent une différence significative ($p < 0,05$), les mêmes lettres indiquent une différence non significative ($p \geq 0,05$).

Ainsi, il apparaît d'après ces études réalisées chez le chien, que les méthodes de dosage de l'ACE empruntées à l'Homme, influent grandement sur les valeurs obtenues. Il est donc important de prendre en compte la méthode de dosage pour interpréter les résultats, et de ne pas varier la technique utilisée au cours du suivi d'un animal. De plus, il semble que l'ACE soit un biomarqueur diagnostique des tumeurs mammaires relativement sensible et spécifique, particulièrement pour les stades les plus avancés. Toutefois, la sensibilité semble diminuer pour les stades les plus précoces (tumeurs de petite taille sans métastase) (Senhorello *et al.*, 2019), ce qui pourrait ne pas permettre à l'ACE d'être un biomarqueur diagnostique précoce de tumeur mammaire. Toujours d'après Senhorello *et al.* (2019), les fortes concentrations d'ACE sont associées aux tumeurs de plus haut grade, de taille plus importante et à la présence de métastases. Ces éléments étant connus pour être de moins bon pronostic, le dosage de l'ACE pourrait donc être utilisé en tant que biomarqueur diagnostique des tumeurs mammaires. L'étude de Baba *et al.* (2019) montre que plus les chiennes présentent des concentrations initiales d'ACE sériques élevées, plus la durée de survie diminue (figure 15). Toutefois des études à plus long terme incluant un nombre plus important de chiennes sont nécessaires pour l'affirmer et montrer son indépendance en termes de marqueur pronostique par rapport à ceux utilisés en routine.

Figure 15 : Analyse de survie des chiennes atteinte de tumeurs mammaires suivant les différentes concentrations sériques d'ACE avant intervention. Baba *et al.* (2019)



LC : faible concentration incluant les chiennes censurées LWC : faible concentration n'incluant pas les chiennes censurées. MC : concentration moyenne incluant les chiennes censurées MWC : concentration moyenne n'incluant pas les chiennes censurées. HC : forte concentration incluant les chiennes censurées. HWC : forte concentration n'incluant pas les chiennes censurées.

Enfin, la diminution significative de la concentration en ACE sérique après exérèse chirurgicale des tumeurs mammaires (Senhorello *et al.*, 2019) peut laisser supposer un intérêt de ce marqueur en tant que biomarqueur de suivi. Des études supplémentaires sont également nécessaires pour démontrer les performances de l'ACE sérique dans la détection précoce de récurrence ou métastase.

Ainsi, chez l'Homme, l'utilité de l'ACE a été montrée pour plusieurs types tumoraux en tant que biomarqueur pronostique, de suivi et de réponse notamment. Ce biomarqueur a montré un potentiel prometteur chez le chien concernant les tumeurs mammaires. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour évaluer son utilité pour d'autres types tumoraux que mammaires chez le chien, notamment les tumeurs du système digestif qui montrent chez l'Homme les plus fortes concentrations sériques.

b. L'Antigène Carbohydate 15-3 (Carbohydrate Antigen 15-3, CA15-3)

Le CA15-3 est une glycoprotéine transmembranaire de haut poids moléculaire (300 à 400 kDa) qui appartient à la famille des mucines. Plus précisément, le CA15-3 est l'un des épitopes du produit d'expression du gène MUC-1, codant la glycoprotéine PEM (*Polymorphic Epithelia Mucin*), dont il existe plusieurs variants. Les produits du gène MUC-1 sont impliqués dans la cancérogenèse notamment des tumeurs épithéliales à plusieurs niveaux. Ils peuvent notamment activer l'oncogène Ras et ainsi favoriser la prolifération et la survie des cellules tumorales (Baruch *et al.*, 1997), participer à leur dissémination par interaction avec l'ICAM1 (*InterCellular Molecul 1*) facilitant

l'attachement des cellules à l'endothélium (Regimbald *et al.*, 1996), et semblent jouer un rôle immunosuppresseur (Tinder *et al.*, 2008).

Le CA15-3 est retrouvé en quantité augmentée dans le sang en cas d'atteinte des tissus dans l'organisme. Toutefois, une augmentation de la concentration sérique n'est pas spécifique d'une atteinte néoplasique particulière, et peut être retrouvée dans les cancers du sein (Fu et Li, 2016), du poumon (Ghosh *et al.*, 2013), de l'appareil génital (Yedema *et al.*, 1988 ; Li *et al.*, 2016) ou gastrointestinaux (Dolscheid-Pommerich *et al.*, 2017) tout comme en cas d'hépatite (Yeganeh-Amirkande *et al.*, 2015), arthrite (Szekanecz *et al.*, 2007) et de nombreuses autres affections non néoplasiques notamment inflammatoires.

- *Le CA15-3 chez l'Homme*

Les concentrations sériques de CA15-3 les plus importantes concernent le cancer du sein chez la femme. Ainsi, en oncologie humaine, le CA15-3 est principalement considéré comme biomarqueur de ce type tumoral. Nous nous concentrerons donc sur l'étude de ce marqueur chez les patientes atteintes de cancer du sein.

- Le CA15-3 en tant que biomarqueur diagnostique :

Comme précédemment énoncé, le CA15-3 n'est pas spécifique des tumeurs mammaires chez la femme. De plus, l'augmentation sérique de ce marqueur démontre de faibles valeurs de sensibilité pour les stades les plus précoces de la maladie : 33% d'après Guadagni *et al.* (2001), 29% d'après Lumachi *et al.* (2004) ou encore 58% d'après Zuo *et al.* (2016), bien qu'elles soient supérieures à celles de l'ACE. Pour ces raisons le CA15-3 n'est pas recommandé en tant qu'outil diagnostique du cancer du sein.

- Le CA15-3 en tant que biomarqueur pronostique :

De nombreuses études s'accordent sur le fait que la concentration sérique en CA15-3 est un biomarqueur sanguin à visée pronostique intéressant. Les méta-analyses de Fu et Li (2016) et de Li *et al.* (2018) ont montré qu'une augmentation de la concentration sérique en CA15-3 était significativement associée à une diminution de la durée de survie sans récurrence, de la durée de survie globale, ainsi qu'aux différentes variables clinico-pathologiques tel que le stade de la maladie et le grade histologique. De plus, plusieurs études montrent l'indépendance de sa valeur pronostique par rapport aux autres paramètres usuellement pris en compte pour établir un pronostic tel que la taille de la tumeur, le statut des nœuds lymphatiques loco-régionaux ou encore l'âge (Duffy *et al.*, 2004 ; Imamura *et al.*, 2018), les auteurs suggèrent donc une réelle utilité à ajouter ce marqueur parmi les tests à effectuer pour affiner le pronostic et/ou la prise en charge thérapeutique.

□ Le CA15-3 en tant que biomarqueur de suivi et de réponse au traitement :

Plusieurs études montrent l'intérêt du dosage de CA15-3 sérique dans le suivi des patientes atteintes de cancer du sein. En effet, selon certaines études, chez les patientes présentant initialement une forte concentration sérique de CA15-3, la diminution de ce marqueur au cours de la thérapie est significativement associée à une stabilisation, une régression voire une rémission de la maladie, tandis qu'une augmentation ou une absence de diminution significative est corrélée avec une progression de celle-ci (Kurebayashi *et al.*, 2004 ; Al-azawi *et al.*, 2006 ; Y. Yang *et al.*, 2017 ; Perrier *et al.*, 2020). Al-azawi *et al.* (2006) montrent par ailleurs que l'élévation de la concentration en CA15-3 en fin de chimiothérapie est significativement associée à une plus courte période sans récurrence ou développement de métastases, indépendamment de l'envahissement lympho-vasculaire ou de l'expression du marqueur Récepteur 2 du facteur de croissance Epidermique Humain (HER2) au sein de la tumeur. Il est important de noter toutefois la possibilité d'observer une augmentation trompeuse du marqueur dans les premières semaines malgré une régression de la maladie (Robertson *et al.*, 1999).

De plus, l'étude de Lonneux (2000), utilisant la tomographie par émission de positrons (TEP), a pu détecter des récurrences chez 31 patientes sur 33 qui présentaient une valeur augmentée du CA15-3 dans le cadre du suivi, là où l'imagerie conventionnelle n'en détectait que 6. De la même manière, Pecking *et al.* (2001) montrent que la TEP identifie une métastase occulte avec une sensibilité de 94 % et une valeur prédictive positive de 96 % en cas d'élévation isolée du CA15-3, sans autre signe évident de métastase. Ainsi, une élévation isolée du CA15-3 dans le suivi des patientes peut-être un signe d'appel précoce de dissémination métastatique non visible par les moyens habituels. Cela encourage son utilisation dans le suivi des patients en apportant un outil utile pour le choix des patients nécessitant des examens de contrôle plus poussés. Dans le même sens, Kokko *et al.* (2002) montrent que la détection de métastases, à la suite d'un traitement chirurgical de cancer du sein localisé, par une élévation du CA15-3 pouvait précéder de plusieurs mois leur détection par les moyens standards mis en place. Ce qui pourrait en faire un marqueur précoce de détection de métastases. Toutefois, la sensibilité évaluée fut faible (36%), avec malgré tout une forte spécificité, permettant aux auteurs de proposer son utilisation dans le but de confirmer la présence de métastases.

□ Le CA15-3 en tant que biomarqueur prédictif de la réponse au traitement.

Il est actuellement reconnu qu'une forte augmentation de la concentration de CA15-3 sérique chez les patientes atteintes de cancer du sein est un marqueur indépendant significativement prédictif d'une mauvaise réponse aux traitements de chimiothérapie, incitant la mise en place de protocoles plus intenses chez ces individus (Al-azawi *et al.*, 2006).

En conclusion, chez la femme, le marqueur CA15-3 est le marqueur sanguin le plus largement utilisé dans le suivi des cancers du sein. Toutefois, ses faibles valeurs de sensibilité notamment pour les stades précoces, et l'absence de spécificité globale de ce marqueur ne permettent pas son utilisation à des fins diagnostiques. Aussi, en l'absence de preuve d'une augmentation de

la durée de survie chez les patientes pour lesquelles le CA15-3 fait partie des mesures de suivi pour détecter l'apparition de récurrence ou de métastases, l'*American Society for Clinical Oncology* (ASCO) ne recommande pas son utilisation à ces fins (Harris *et al.*, 2007). Toutefois, en raison des preuves établies montrant que le CA15-3 est un marqueur indépendant de la réponse au traitement, l'ASCO recommande son utilisation en association avec les autres moyens de suivis pour l'élaboration des décisions thérapeutiques dans la prise en charge des cancers du sein métastasés (Harris *et al.*, 2007).

- *Le CA15-3 chez le chien*

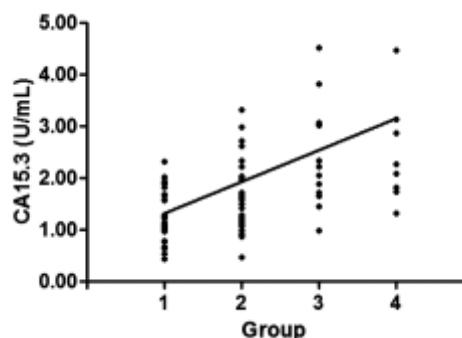
Du fait de leur faible nombre, les études effectuées chez le chien ne permettent pas d'avancer de telles utilités de la concentration sérique de CA15-3 en oncologie vétérinaire.

Sept études ont été publiées entre 2007 et 2019 étudiant la concentration sérique de CA15-3 chez les chiens atteints de processus néoplasiques, dont six s'intéressent aux tumeurs mammaires. L'étude de Marchesi *et al.* (2007) étudie le CA15-3 chez des chiens atteints de différents types de processus néoplasiques et ne met pas en évidence de différence significative entre les concentrations sériques en CA15-3 chez les chiens atteints de tumeurs et celles des chiens sains. Toutefois, il est possible, en comparaison avec les études chez l'Homme, que tous les types tumoraux ne soient pas associés à une production de CA15-3, ne permettant ainsi pas d'obtenir de différence significative.

À l'inverse, toutes les études s'intéressant aux tumeurs mammaires chez la chienne montrent une augmentation significative de la concentration sérique en CA15-3 chez les chiennes atteintes par rapport aux chiennes saines (Marchesi *et al.*, 2010 ; Campos *et al.*, 2012 ; Manuali *et al.*, 2012 ; Valencakova-Agyagosova *et al.*, 2014 ; Alizadeh et Azimzadeh, 2018 ; Baba *et al.*, 2019). L'étude de Valencakova-Agyagosova *et al.* (2014) établit que pour une valeur seuil égale à 7 UI/mL, valeur limite supérieure chez les chiens sains d'après Ledecy *et al.* (2013), la sensibilité et la spécificité du CA15-3 à détecter une atteinte néoplasique mammaire était respectivement de 100% et 95% dans leur étude.

De plus, l'étude de Campos *et al.* (2012) établit une corrélation positive significative entre les concentrations sériques de CA15-3 et les différents stades d'atteinte tumorale (figure 16), avec une augmentation significative chez les individus atteints de tumeurs non métastasées, les tumeurs présentant une atteinte des nœuds lymphatiques régionaux, et les tumeurs présentant des métastases à distance par rapport aux chiens sains.

Figure 16 : Corrélation positive ($r = 0,535$, $p < 0,01$) entre la concentration sérique de CA15-3 et les stades d'atteinte tumorale chez les chiennes présentant une tumeur mammaire. (Campos *et al.*, 2012)

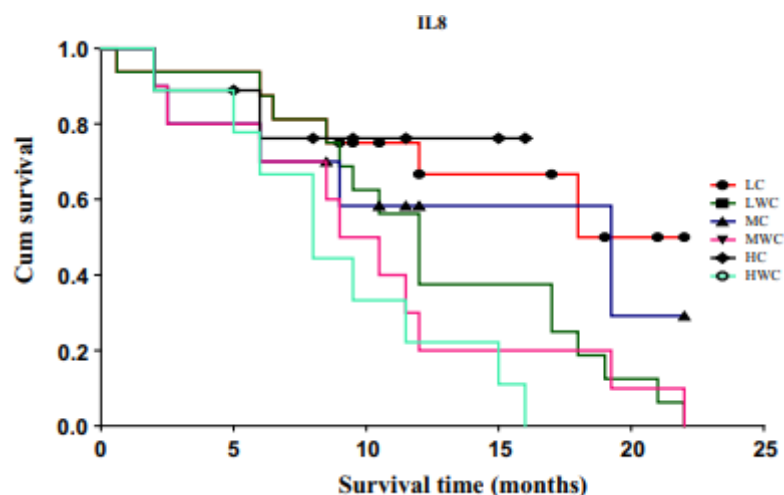


Groupe 1 : chiens sains (n=30). Groupe 2 : Chiens ne présentant pas de métastase (n=40). Groupe 3 : Chiens présentant une atteinte des nœuds lymphatiques régionaux (n=12). Groupe 4 : Chiens présentant des métastases à distance (n=8).

Toutefois, on peut observer sur ce graphique que les ensembles de valeurs de concentrations obtenues entre les chiens sains et ceux présentant une tumeur non métastasée se recouvrent largement. Ainsi, il est peu probable dans cette étude, qu'une valeur seuil montre une sensibilité et une spécificité aussi importantes que celles exposées dans l'étude de Valencakova-Agygsova *et al.* (2014) pour détecter une tumeur mammaire dans les stades précoces.

Enfin, l'étude de Baba *et al.* (2019) montre que les faibles concentrations sériques de CA15-3 avant intervention chirurgicale sont associées à de plus grandes durées de survies, tandis que les plus fortes concentrations sont associées à de moins importantes durées de survie (figure 17). Ainsi, la valeur du CA15-3 pourrait porter une information pronostique chez les chiennes atteintes de tumeurs mammaires. Toutefois, des études montrant l'indépendance de ce paramètre par rapport à ceux utilisés en pratique pour l'établissement d'un pronostic sont nécessaires pour recommander le dosage du CA15-3 sérique dans les procédures d'établissement d'un pronostic.

Figure 17 : Analyse de survie des chiennes atteintes de tumeurs mammaires suivant les différentes concentrations sériques de CA15-3 avant intervention. (Baba *et al.*, 2019)



LC : faible concentration incluant les chiennes censurées LWC : faible concentration n'incluant pas les chiennes censurées. MC : concentration moyenne incluant les chiennes censurées MWC : concentration moyenne n'incluant pas les chiennes censurées. HC : forte concentration incluant les chiennes censurées. HWC : forte concentration n'incluant pas les chiennes censurées.

Aucune étude n'a à ce jour été effectuée pour évaluer le dosage sérique de CA15-3 dans le cadre du suivi des chiennes atteintes de tumeurs mammaires, ne permettant pas d'évaluer sa performance à détecter de manière précoce l'apparition de récurrence ou de métastases.

En conclusion, le CA15-3 est un biomarqueur sanguin dont l'efficacité à détecter une tumeur mammaire de manière précoce n'a pas été démontrée à ce jour chez le chien. Des études supplémentaires incluant un nombre plus important de chiennes sont nécessaires. Toutefois, il pourrait présenter un intérêt pronostique, ayant montré une corrélation positive avec le stade de la maladie, et révélant une diminution de la durée de survie chez les individus présentant une plus forte concentration sérique. Des études évaluant la variation de sa concentration au cours du suivi des animaux seraient également intéressantes pour établir son intérêt en tant que biomarqueur de suivi.

c. L'Alpha-Foetoprotéine (AFP)

L'Alpha-Foetoprotéine est une α 1-globuline fœtale synthétisée essentiellement par le foie, d'environ 66kDa. Durant le développement embryonnaire, l'AFP est synthétisée en grande quantité notamment par le foie : elle constitue une des protéines majeures de la circulation fœtale. Son expression est toutefois réprimée transcriptionnellement à la naissance. L'AFP a été découverte en 1963 par Abelev *et al.* (1963) chez la souris. La localisation de son expression dans les tissus du

sac vitellin, hépatiques et intestinaux, ainsi que sa participation dans leur développement ont été mis en évidence par Krumlauf *et al.* (1985).

Concernant les rôles biologiques de cette protéine, l'AFP sérique est connue pour se lier et transporter une multitude de ligands tels que la bilirubine, les acides gras, les rétinoïdes, les stéroïdes, les métaux lourds, les colorants, les flavonoïdes, les phytoestrogènes, la dioxine, le L-tryptophane, la warfarine, le phénylbutazone, la streptomycine, la phénytoïne, les alcools à faible teneur en carbones et les acides gras polyinsaturés (Hirano *et al.*, 1985 ; Deutsch, 1991). Aussi, l'AFP a montré un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire innée et adaptative. En effet, au cours des dernières décennies, il a été démontré que l'AFP a un rôle immunosuppresseur sur les monocytes (Lu *et al.*, 1984 ; Laan-Pütsep *et al.*, 1991), les lymphocytes B (Murgita et Tomasi, 1975 ; Semeniuk *et al.*, 1995) et T (Murgita *et al.*, 1977 ; Murgita *et al.*, 1978 ; Peck *et al.*, 1982). Plus récemment, les études montrent que l'AFP altère fonctionnellement les cellules dendritiques, provoquant un dysfonctionnement immunitaire et l'apoptose de ces cellules présentatrices d'antigène (CPA) (Um *et al.*, 2004). Elle possède également des propriétés pro-angiogéniques qui favorisent la néovascularisation dans les tissus foetaux et tumoraux (Takahashi *et al.*, 2004 ; Liang *et al.*, 2004). Enfin, une multitude d'études ont depuis établi l'AFP comme régulateur de la croissance normale et néoplasique des tissus (Dudich *et al.*, 1998 ; Mizejewski et MacColl, 2003).

- *L'AFP chez l'Homme :*

- L'AFP en tant que biomarqueur diagnostique

Chez l'Homme, l'AFP est le marqueur approuvé et le plus largement utilisé en cas de carcinome hépatocellulaire (CHC). On retrouve néanmoins une augmentation de sa concentration sérique dans d'autres pathologies néoplasiques comme non néoplasiques, et particulièrement lors d'atteintes hépatiques puisque le foie est l'organe principal de synthèse de cette protéine (tableau 3) (Wong *et al.*, 2015). Ainsi, une augmentation de la concentration sérique d'AFP n'est pas spécifique d'un carcinome hépatocellulaire.

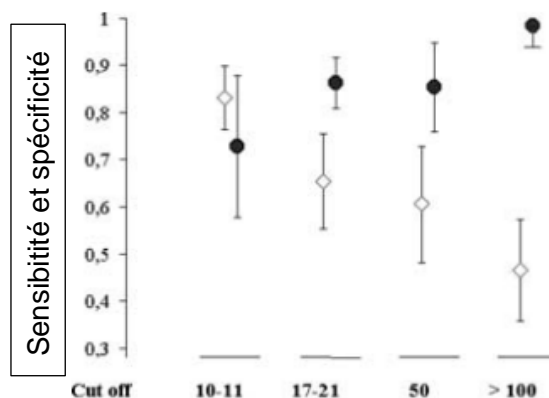
Tableau 3 : Causes d'une élévation de la concentration sérique d'AFP (Adapté de Wong et al., 2015)

Causes d'une élévation de la concentration sérique d'AFP
Carcinome hépatocellulaire
Hépatite aigüe
Hépatopathies chroniques
Cirrhose
Cholangiocarcinome intrahépatique
Colite
Ataxie télangiectasie
Tumeur gastrique
Tumeur des cellules germinales
Troubles fœtaux
Gestation

Les hépatopathies chroniques, et notamment les cirrhoses, les hépatites virales, et les stéatohépatites non alcooliques sont les facteurs prédisposant majeurs de développement d'un carcinome hépatocellulaire (Forner *et al.*, 2012). Ainsi, les études se concentrent sur les populations atteintes de ces pathologies pour établir les performances de l'AFP en tant que biomarqueur sérique pour la détection de CHC.

La valeur diagnostique de l'AFP sérique est sujette à controverse en raison des valeurs peu élevées de sensibilité et de spécificité. La plupart des études considèrent comme valeur seuil 20 ng/mL, au-delà de laquelle le test est considéré comme positif, indiquant la présence d'un carcinome hépatocellulaire. Une méta-analyse sur la performance de l'AFP dans le diagnostic du CHC incluant sept études a révélé une sensibilité de 66% avec une spécificité de 86%, AUC = 0,87 (Wan *et al.*, 2014). Dans une autre méta-analyse comprenant dix études, la sensibilité combinée de l'AFP pour le diagnostic de CHC était de 51,9%, avec une spécificité de 94%, AUC = 0,81 (Xu *et al.*, 2013). Les performances de l'AFP dans le diagnostic du CHC montrent de grandes variations suivant les études. Les divergences observées sont probablement liées à une variété de facteurs, comme des étiologies différentes (hépatite virale, cirrhose, etc...), des critères d'inclusion et des seuils de positivité variables. En outre, la spécificité de l'AFP sérique peut atteindre 100% pour des concentrations supérieures à 200 ng/mL et ainsi montrer une parfaite valeur prédictive positive, mais la sensibilité est alors réduite à 20% (figure 18) (Colli *et al.*, 2006).

Figure 18 : Estimations des sensibilités et spécificités pour différentes valeurs seuils (en ng/mL) de la concentration sérique d'AFP dans la détection de CHC selon la revue de Colli *et al.* (2006). Les cercles noirs indiquent la spécificité et les losanges la sensibilité.



Une sensibilité équivalente a été montrée pour les stades les plus précoces de la maladie, égale à 53% pour une valeur seuil de 20 ng/mL, et égale à 66% pour une valeur seuil plus faible de 10,9 ng/mL. Toutefois, les augmentations modérées de la concentration d'AFP sérique dues aux atteintes hépatiques non néoplasiques provoquent de nombreux faux positifs pour des valeurs seuils basses (Marrero *et al.*, 2009).

L'utilité de l'ajout du dosage d'AFP sérique à l'utilisation de l'échographie a été montrée pour détecter les CHC en stade précoce, permettant d'augmenter la sensibilité de 32% à 63,4% ($p < 0,01$) (Singal *et al.*, 2012). L'étude de Mehta et Singal (2015) montre également une augmentation significative ($p < 0,001$) de la sensibilité de détection de carcinome hépatocellulaire chez des patients atteints d'une hépatite virale ou d'une cirrhose, entre l'examen échographique seul (92%) et l'examen échographique couplé à un dosage sérique d'AFP (99,2%), en imposant une diminution de la spécificité de 74,2% à 68,3%. Cette dernière étude souligne que 8% des patients atteints de carcinome hépatocellulaire ont été diagnostiqués grâce à une élévation de la concentration sérique d'AFP, sans visualisation de nodule à l'échographie, et ainsi l'AFP sérique pourrait donc constituer un marqueur plus précoce que l'échographie chez certains patients. Une étude randomisée et contrôlée menée dans une population à haut risque en Chine, a montré que le dépistage par mesure de l'AFP a conduit à un diagnostic plus précoce de CHC, mais n'avait aucun impact sur la mortalité (Chen *et al.*, 2003). Les auteurs de cette étude font remarquer toutefois que la thérapie utilisée chez les patients diagnostiqués atteints de la maladie, semblait ne pas être efficace. A l'inverse, le dépistage semestriel du CHC par la mesure de l'AFP dans une étude basée sur une population en Alaska a été efficace pour détecter le CHC à un stade précoce et augmenter significativement les taux de survie (McMahon *et al.*, 2000). Par ailleurs, deux études menées à Shanghaï, incluant un très grand nombre d'individus atteints de pathologies hépatiques chroniques (17 820 et 18 816 personnes), ont montré qu'une surveillance pratiquée tous les trois à six mois par un examen échographique associée à un dosage de la concentration sérique d'AFP permettait d'augmenter significativement la détection de carcinome hépatocellulaire, et particulièrement en stade précoce,

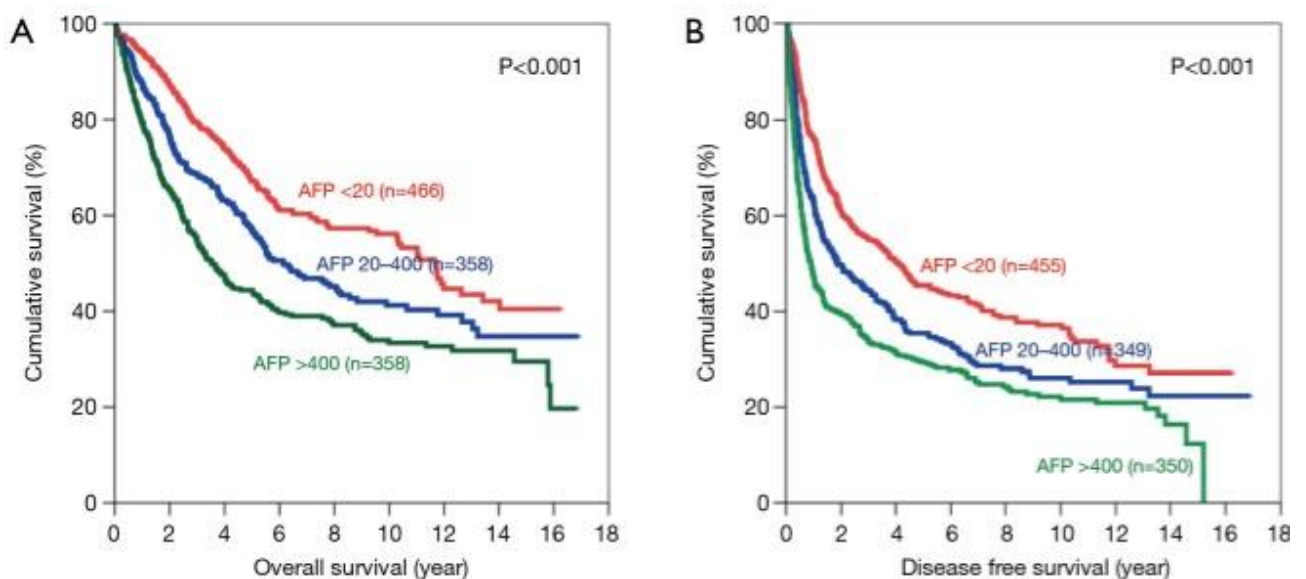
en augmentant nettement les taux de survie à 1, 3 et 5 ans, et réduisant ainsi le taux de mortalité liée à la maladie de 37% ($p < 0,01$) (Yang *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 2004).

Ainsi, la Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) ainsi que la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) aux Etats-Unis recommandent l'utilisation de l'AFP sérique associée à un examen échographique chez les patients atteints de pathologie hépatique chronique tous les 3 à 6 mois (Benson *et al.*, 2009 ; Omata *et al.*, 2010). A l'inverse, l'European Association for the Study of the Liver (EASL) et l'European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) ne recommandent pas l'utilisation de l'AFP dans la surveillance de développement d'un carcinome hépatocellulaire parmi la population à risque. En effet, ces dernières associations considèrent que les valeurs de sensibilité et de spécificité de l'AFP sérique sont insuffisantes, et que le gain de 6 à 8% du taux de détection par rapport à l'utilisation de l'examen échographique seul ne contrebalance pas l'augmentation des résultats faussement positifs, conduisant finalement à une augmentation d'environ 80% du coût de chaque CHC de faible taille diagnostiqué (European Association For The Study Of The Liver et European Organisation For Research And Treatment Of Cancer, 2012).

□ L'AFP en tant que biomarqueur pronostique

Concernant la valeur pronostique de l'AFP sérique chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire, il a été montré que le taux d'AFP est associé au grade de la tumeur, au stade TNM, à la taille de la tumeur, ainsi qu'à la durée de survie des patients (Bai *et al.*, 2017 ; Chan *et al.*, 2019). Un taux élevé d'AFP au moment du diagnostic est associé à une plus faible durée de survie, et à des caractéristiques d'agressivité de la tumeur plus importantes (figure 19).

Figure 19 : Courbes de Kaplan-Meier montrant les taux de survie globale et les temps de survie sans récurrence chez des individus atteints de carcinome hépatocellulaires en fonction des valeurs de concentration sérique d'AFP avant traitement (Chan *et al.*, 2019).



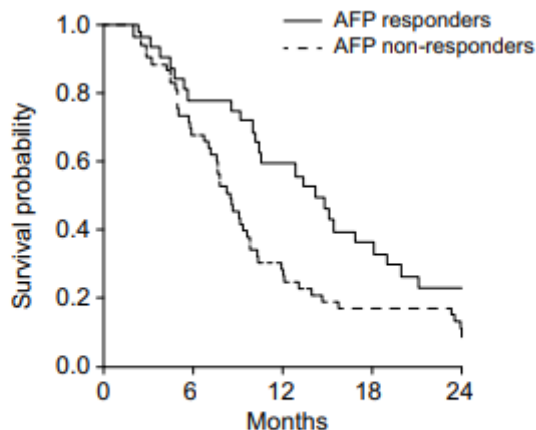
Aussi, plusieurs études montrent que la variation de la concentration sérique d'AFP après la résection de la tumeur est un facteur pronostique significatif et indépendant du nombre de masses tumorales et de l'invasion vasculaire pour la durée de survie globale, la durée de survie sans récurrence, la durée de survie sans progression de la maladie, et le taux de survie à 5 ans des patients atteints de carcinome hépatocellulaire (Liu *et al.*, 2015 ; Rungsakulkij *et al.*, 2018 ; He *et al.*, 2019). Par exemple, l'étude de Liu *et al.* (2015) a montré chez les patients atteints de CHC que la variation de la concentration d'AFP sérique avant et après hépatectomie était significativement corrélée au taux de survie à 5 ans et à la durée de survie entre la survenue d'une récurrence et le décès ($p < 0,001\%$). Un taux initialement élevé d'AFP et présentant une stabilisation ou une élévation après hépatectomie montrait les taux de survie à 5 ans les plus faibles (respectivement 10,8% ou 18,8%), tandis que les taux initialement faibles et présentant une stabilisation ou une diminution après hépatectomie avaient les taux de survie à 5 ans les plus élevés (respectivement 56.3% ou 55.0%).

□ L'AFP en tant que biomarqueur de suivi

L'AFP a peu été étudiée dans le suivi des individus atteints de carcinome hépatocellulaire pour la détection précoce de rechute du cancer. Yamashiki *et al.* (2010) ont proposé de mesurer la concentration sérique d'AFP mensuellement pendant les deux premières années après une transplantation hépatique afin de détecter toute récurrence de CHC. Lorsqu'un seuil de 20 ng/mL était utilisé, la sensibilité et la spécificité de l'AFP pour détecter la récurrence du CHC après transplantation hépatique étaient respectivement de 67% et 100%. Une valeur seuil de 5,45 ng/mL a montré une sensibilité de 84,4% et une spécificité de 77,1% pour la détection d'une récurrence de CHC après hépatectomie ou transplantation hépatique. Clavien *et al.* (2012) établissent dans un consensus international, qu'un dosage tous les 6 à 12 mois de l'AFP sérique, associé à des techniques d'imagerie, est recommandé dans le suivi des individus ayant subi une transplantation hépatique à la suite d'un diagnostic de carcinome hépatocellulaire.

Le Sorafenib est l'agent de chimiothérapie le plus couramment utilisé dans le traitement des CHC en stade avancé. Personeni *et al.* (2012) montrent qu'une diminution d'au moins 20% de la concentration sérique d'AFP au cours des 8 premières semaines de traitement était significativement associée à une meilleure réponse au traitement ($p=0,009$), notamment par une plus longue période de survie globale (figure 20), tandis qu'une amélioration des signes radiographiques n'était pas prédictive d'une durée de survie plus importante. Les études de Chan *et al.* (2009) et de Shao *et al.* (2010) évoquent les mêmes résultats pour une diminution supérieure à 20% de la concentration sérique d'AFP après deux à quatre semaines de traitement ou au moins deux cycles de chimiothérapie. Il a également été montré qu'une diminution de la concentration d'AFP sérique au cours des premières semaines de traitement de chimiothérapie à base de thalidomide ou d'oxaliplatine était significativement associée à une meilleure réponse au traitement et des durées de survie sans progression de la maladie ou de survie globale plus importantes (Chen *et al.*, 2005 ; Chou *et al.*, 2018).

Figure 20 : Courbe de Kaplan-Meier évaluant la survie globale des individus recevant un traitement à base de Sorafenib en fonction de l'évolution de la concentration d'AFP sérique au cours des premières semaines de traitement. (Personeni *et al.*, 2012)



Number of patients					
AFP responders	32	25	18	11	7
AFP non-responders	53	36	14	9	4

AFP responders : diminution >20% de la concentration sérique d'AFP

AFP non-responders : absence de diminution ou diminution <20% de la concentration sérique d'AFP

Les associations européenne et américaine (EASL et NCCN) n'ont cependant pas instauré le dosage de l'AFP dans les recommandations de suivi des patients atteints de carcinome hépatique, après résection de la tumeur ou sous traitement de chimiothérapie, eu égard aux faibles valeurs de sensibilité et spécificité montrées jusqu'à présent.

En conclusion, les performances de l'AFP sérique ont été montrées dans de très nombreuses études chez l'homme en tant que biomarqueur diagnostique de carcinome hépatocellulaire, particulièrement chez les individus atteints d'hépatopathie chronique, en tant que biomarqueur pronostique, de suivi, et de réponse pharmacodynamique. Toutefois, les faibles valeurs de sensibilité et spécificité mises en évidence jusqu'à présent entraînent de nombreux débats quant à son utilisation au sein des différentes associations internationales établissant les recommandations de prise en charge de ce type de cancer.

- *L'AFP chez le chien :*

- L'AFP en tant que biomarqueur diagnostique

L'Alpha-Foetoprotéine n'a pas été autant étudiée chez le chien en tant que biomarqueur sérique tumoral. Une dizaine d'études ont été publiées concernant des chiens sains, atteints de processus néoplasiques ou de pathologies non néoplasiques.

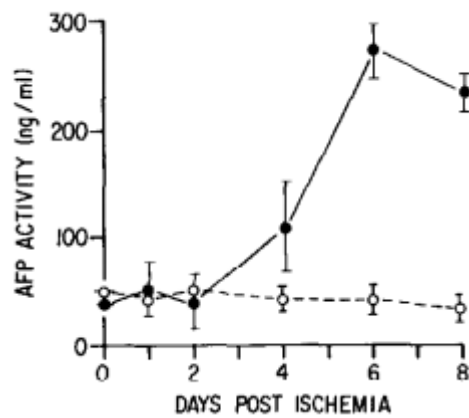
L'étude de Yamada *et al.* (1995) a montré une forte concentration sérique d'AFP à la naissance chez le chien, égale à $14\,080 \pm 5\,944$ µg/mL, puis une forte décroissance au cours de la croissance, évaluée à 766 ± 758 µg/mL à une semaine d'âge, puis $70,2 \pm 52,92$ µg/mL à deux semaines d'âge, et enfin $0,067 \pm 0,050$ µg/mL à 24 semaines d'âge. Chez les chiens adultes de cette étude, les valeurs obtenues étaient comprises entre 14 et 67 ng/mL.

Ces valeurs ont été obtenues en utilisant des anticorps anti-AFP canins. Toutefois il est important de souligner ici encore que les valeurs de concentration sérique en AFP diffèrent de manière notable suivant la technique de dosage utilisée. Lowseth *et al.* (1991) ont évalué la concentration sérique du chien nouveau-né égale à 220 ng/mL à l'aide d'anticorps anti-AFP humains. Considérant la valeur largement supérieure obtenue chez le nouveau-né par Yamada *et al.* (1995) utilisant des anticorps anti-AFP canins, ils émettent l'hypothèse d'un manque de sensibilité de la technique utilisant des anticorps humains. Toutefois, l'étude de Lowseth *et al.* (1991) propose un intervalle de valeurs chez le chien adulte sain compris entre 30 et 60 ng/mL, proche de celui proposé par Yamada *et al.* (1995). Enfin, l'étude de Lowseth *et al.* (1991) montre une différence significative entre les valeurs obtenues par radio-immunodosage et par dosage immuno-enzymatique (ELISA). Ainsi, il est important lors de l'interprétation d'une valeur de concentration d'AFP sérique de prendre en compte le type d'anticorps utilisés ainsi que la méthode de dosage.

Concernant les chiens atteints de carcinome hépatocellulaire, des marquages histologiques ont permis de montrer que ce sont les cellules hépatiques tumorales qui produisent l'AFP tandis que le tissu hépatique sain environnant n'en produit pas (Kang *et al.*, 2019). Kawarai *et al.* (2006) montrent également que les cellules de carcinome hépatocellulaire mises en culture produisent de l'AFP dans leur milieu de culture. Ainsi, lors de carcinome hépatocellulaire, l'AFP dosée dans le sérum des patients atteint est directement corrélée au processus néoplasique.

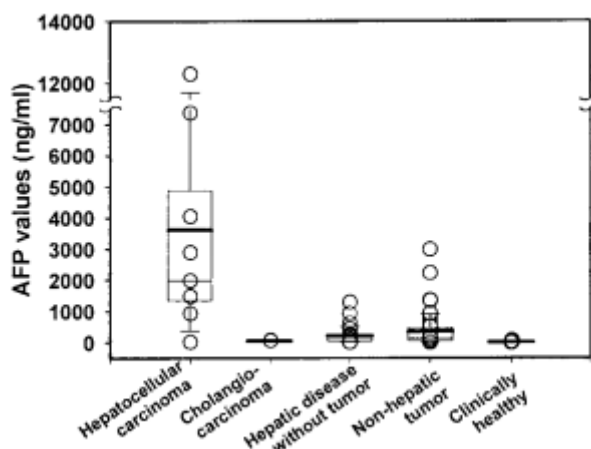
Comme chez l'Homme, une élévation de la concentration d'AFP sérique chez le chien a été principalement observée lors de carcinome hépatocellulaire, mais aussi lors de lymphome, de maladies hépatiques non néoplasiques, ou encore d'atteinte néoplasique non hépatique. En effet, les études de Madsen *et al.* (1980) ainsi que de Madsen et Rikkens (1984) montrent que la concentration sérique d'AFP chez le chien augmente de manière significative lors de régénération hépatique, suite à une hépatectomie ou une ischémie de 70% de la masse hépatique (figure 21).

Figure 21 : Variation de la concentration sérique d'AFP au cours d'une période de 8 jours chez 19 chiens ayant subi une ischémie hépatique sélective (ligne pleine) et un groupe de 7 chiens contrôle (ligne en pointillés). (Madsen et Rikkers, 1984)



L'étude de Marchesi *et al.* (2007) a étudié 30 chiens sains, 31 chiens atteints de maladies non néoplasiques, et 44 chiens atteints de processus tumoraux divers (lymphomes, mastocytomes, sarcomes, carcinomes, et tumeurs des cellules de la granulosa). Ils ont pu montrer que les groupes de chiens sains et ceux atteints de pathologies non néoplasiques ne présentaient pas de concentration sérique d'AFP significativement différente. Les auteurs remarquent toutefois qu'un chien atteint d'hépatite chronique active présentait une forte concentration sérique d'AFP. Les sujets atteints de sarcomes et carcinomes ne présentaient pas non plus de différence significative par rapport aux chiens sains, toutefois la nature exacte de ces tumeurs ne fut pas précisée. À l'inverse, les sujets atteints de lymphomes et mastocytomes ont montré une augmentation significative de la concentration d'AFP sérique, mais le stade de ces affections n'était pas précisé, notamment par rapport à une éventuelle infiltration hépatique tumorale. De la même manière, l'étude de Hahn et Richardson (1995) a étudié 16 chiens sains, 18 chiens atteints de carcinomes (carcinomes transitionnels, adénocarcinome des glandes anales, carcinomes épidermoïdes, et carcinomes thyroïdiens), 13 chiens atteints de sarcomes et autres processus néoplasiques (hémangiosarcome, mélanomes, ostéosarcomes, fibrosarcomes, mastocytomes, liposarcome et tumeur des cellules de la granulosa) et enfin 17 chiens atteints de lymphomes. Aucune différence significative n'a été observée entre ces différents groupes. Ils remarquent toutefois qu'un chien atteint de lymphome a montré une augmentation sérique d'AFP supérieure à 225 ng/mL, chez qui une infiltration hépatique a été mise en évidence par la suite. L'étude de Yamada *et al.* (1999) montre qu'une augmentation de la concentration sérique d'AFP par rapport aux chiens sains est observée de manière plus importante en cas de carcinome hépatocellulaire, mais également en cas de maladies hépatiques non néoplasiques (hépatites, cholangites) et de processus néoplasiques non hépatiques (lymphosarcome, tumeur mammaire, mélanome, carcinome épidermoïde, mastocytome, cancer gastrique) (figure 22). Toutefois cette étude ne précise pas non plus l'état d'infiltration tumorale hépatique lors de processus néoplasique non hépatique.

Figure 22 : Diagramme en boîte représentant la distribution des valeurs de concentration d'AFP sérique chez des chiens atteints de carcinome hépatocellulaire (n=9), de cholangiocarcinome (n=2), de maladie hépatique non tumorale (n=21), de tumeurs non hépatiques (n=54), et chez des chiens sains (n=20). (Yamada *et al.*, 1999)



Ainsi, à travers ces études, il est possible de considérer que l'augmentation sérique d'AFP chez le chien n'est pas spécifique de carcinome hépatocellulaire.

Pourtant, Yamada *et al.* (1999) suggèrent que l'AFP peut être un biomarqueur spécifique de carcinome hépatocellulaire chez le chien pour une valeur seuil élevée de concentration sérique. Ils montrent en effet que 7 chiens sur 9 atteints de carcinome hépatocellulaire présentaient des concentrations sériques supérieures à 1400 ng/mL, tandis que 92% des tumeurs non hépatiques présentaient une concentration inférieure à 1000 mg/mL, 90% des atteintes hépatiques non néoplasiques montraient des concentrations inférieures à 500ng/mL, et aucun des deux cholangiocarcinomes de cette étude n'a montré d'augmentation de la concentration sérique d'AFP (figure 19). L'étude de Kitao *et al.* (2006) a montré par la même méthode de dosage, que trois chiens sur quatre atteints de carcinome hépatocellulaire présentaient des concentrations supérieures ou égales à 932 ng/mL. Ainsi, l'AFP pourrait être un biomarqueur diagnostique sérique des carcinomes hépatocellulaires pour une valeur seuil élevée ; une forte concentration dans le sérum indiquerait une forte probabilité d'atteinte de l'individu par ce processus néoplasique. Néanmoins, les carcinomes hépatocellulaires étudiés dans les différents articles précédemment cités furent de taille importante, soit tardivement diagnostiqués, ne permettant pas d'évaluer une éventuelle augmentation de la concentration sérique d'AFP dès les stades précoces du développement tumoral. Aussi, la performance de ce marqueur concernant la détection de cette atteinte tumorale n'a pas été étudiée par rapport aux techniques d'imageries et aux autres marqueurs de cytolyse hépatique ou de cholestase telles que l'alanine aminotransférase (ALAT), l'aspartate aminotransférase (ASAT) ou la phosphatase alcaline (PAL), et aucune étude n'a à ce jour proposé de valeur seuil chez le chien définissant une valeur de sensibilité et de spécificité de ce test.

Toutefois, la sensibilité de ce test pour détecter un carcinome hépatocellulaire chez le chien semble négativement impactée par le fait qu'ils n'entraînent pas tous une hausse de la concentration sérique d'AFP. Kitao *et al.* (2006) et Yamada *et al.* (1999) soulignent chacun le cas d'un chien dans

leurs études présentant un carcinome hépatocellulaire, mais une concentration sérique d'AFP comprise dans les valeurs usuelles des chiens sains. Les deux carcinomes hépatocellulaires se sont avérés à l'analyse histologique être peu différenciés, contrairement aux autres carcinomes hépatocellulaires ayant provoqué une élévation marquée d'AFP. De plus, l'étude de Kang *et al.* (2019) montre que chez le chien, les carcinomes hépatocellulaires développés dans un contexte de maladie de surcharge glycogénique hépatique présentent une faible expression d'AFP. Ainsi, certains carcinomes hépatocellulaires, suivant leur étiologie ou leur degré de différenciation, pourraient entraîner un résultat faussement négatif lors du dosage de l'AFP sérique.

□ L'AFP en tant que biomarqueur pronostique

A ce jour, aucune étude n'a été menée concernant les carcinomes hépatocellulaires chez le chien afin d'établir une corrélation entre la concentration sérique d'AFP et les caractéristiques histologiques, la taille de la tumeur, ou encore le stade d'extension tumoral. De plus, aucune étude n'évalue le taux de survie sans récurrence ou le taux de survie globale chez les chiens atteints de carcinome hépatocellulaire en fonction des concentrations sériques d'AFP. Ainsi, l'AFP ne peut pas être à l'heure actuelle utilisée en tant que biomarqueur pronostique chez le chien atteint de carcinome hépatocellulaire.

□ L'AFP en tant que biomarqueur de suivi

Deux études chez le chien ont traité du potentiel de l'AFP dans le suivi des cas de carcinome hépatocellulaire après exérèse chirurgicale des lobes hépatiques atteints. Yamada *et al.* (1999) ont dosé mensuellement l'AFP sérique chez 5 chiens entre une semaine à 8 mois. Tous les chiens ont présenté une diminution importante de la concentration sérique d'AFP suite à l'exérèse. Les chiens ayant maintenu une faible concentration n'ont pas présenté de récurrence tumorale, tandis qu'un chien ayant présenté une augmentation progressive de la concentration a déclaré une récurrence de carcinome hépatocellulaire (figure 24). De la même manière, l'étude de Kitao *et al.* (2006) a évalué la variation de concentration sérique d'AFP chez quatre chiens suite à l'exérèse chirurgicale d'un carcinome hépatocellulaire. Les trois chiens ayant une concentration initialement élevée ont montré une diminution importante de cette concentration suite à l'exérèse (figure 23). Deux chiens ont présenté une élévation importante de la concentration sérique d'AFP un an après la chirurgie, toutefois les autopsies n'ont pas pu être réalisées et les possibles récurrences n'ont pas pu être mises en évidence.

Figure 24 : Variations de la concentration sérique d'AFP suite à l'exérèse de carcinome hépatocellulaire chez cinq chiens. (Yamada et al., 1999)

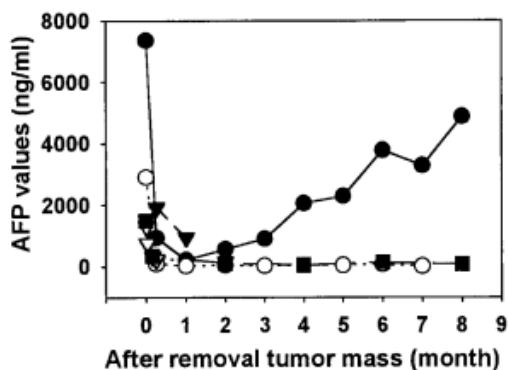
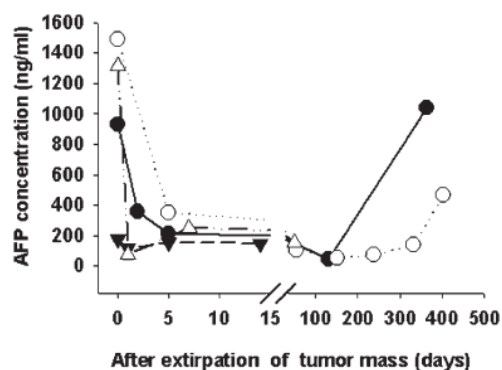


Figure 23 : Variations de la concentration sérique d'AFP suite à l'exérèse de carcinome hépatocellulaire chez quatre chiens. (Kitao et al., 2006)



Ainsi, l'AFP sérique pourrait avoir un rôle dans le suivi des individus atteints de carcinomes hépatocellulaire suite à une procédure d'exérèse chirurgicale dans le but de détecter la survenue de récurrence, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour le montrer. Toutefois, les sensibilité et spécificité de ce marqueur concernant la détection de récurrence tumorale n'ont pas été étudiées par rapport aux techniques d'imagerie et aux autres marqueurs de cytolysse hépatique ou de cholestase tels que l'alanine aminotransférase (ALAT), l'aspartate aminotransférase (ASAT) ou la phosphatase alcaline (PAL).

d. L'Antigène Spécifique de la Prostate (PSA) et l'Estérase Prostatique Spécifique Canine (CPSE)

L'un des biomarqueurs sanguins de cancer les plus connus chez l'Homme est l'antigène spécifique de la prostate (PSA). Il s'agit d'une protéine de la famille des protéases, produite par la prostate, qui intervient dans la liquéfaction du liquide séminale par hydrolyse de la séminogeline ainsi que de la fibronectine. La concentration sanguine considérée comme physiologique chez l'Homme est estimée à moins de 4 ng/mL. Une augmentation de cette concentration peut témoigner d'une pathologie bénigne telle qu'une hyperplasie bénigne de la prostate, d'un phénomène infectieux atteignant la prostate, ainsi que d'une atteinte néoplasique (Barry et Simmons, 2017). Cette multiplicité de causes d'augmentation de la concentration sanguine de la PSA impacte donc la spécificité de ce test à détecter une atteinte tumorale de la prostate. De plus, bien que ce marqueur fût approuvé par la FDA en 1986, sa large utilisation par la suite a permis d'étudier les performances diagnostiques de ce test de manière plus précise. Il a en effet été montré que les valeurs de sensibilité de ce test à détecter un cancer de la prostate sont comprises entre 20% et 40%, et la spécificité comprise entre 90% et 94% suivant le grade de cancer considéré (Barry et Simmons,

2017). Eu égard à la prévalence de la maladie chez l'homme, allant jusqu'à plus de 111,6 cas pour 100 000 individus en Australie/ Nouvelle-Zélande (Taitt, 2018), il est compréhensible que la faible sensibilité associée à une spécificité de 90%, entraîne un nombre conséquent de faux positifs par rapport aux vrais positifs, soit une valeur prédictive positive faible. Un résultat positif entraînant une biopsie de la prostate, acte invasif qui provoque une diminution de la qualité de vie des sujets, ainsi qu'un nombre important de diagnostic par excès de cancer de la prostate, ce test est aujourd'hui largement remis en cause par les comités d'experts (Barry et Simmons, 2017).

Chez le chien, la PSA n'est pas détectable dans le sang, que ce soit en condition physiologique ou pathologique incluant les prostatites, hyperplasies bénignes de la prostate et carcinomes prostatiques (Bell *et al.*, 1995). Cette enzyme ne peut donc pas être considérée comme potentiel marqueur oncologique en médecine vétérinaire. Toutefois, une autre enzyme prostatique se retrouve en concentration élevée dans le sang de chien présentant une atteinte de la prostate : l'estérase prostatique spécifique canine (CPSE), protéase synthétisée par les cellules de l'épithélium sécrétant de la prostate. Il a toutefois été montré que les affections néoplasiques de la prostate chez le chien n'entraînent pas d'augmentation de sa concentration sanguine, et à ce jour, seule l'hyperplasie bénigne de la prostate semble provoquer une augmentation de la concentration sérique de cette enzyme (Bell *et al.*, 1995 ; Pinheiro *et al.*, 2017). Ainsi, la CPSE ne peut pas être utilisée comme biomarqueur diagnostique d'une affection néoplasique de la prostate chez le chien.

e. L'hormone Anti-Mullerienne

L'Hormone antimüllérienne (AMH) est une glycoprotéine dimérique, membre de la superfamille des facteurs de croissance transformants β . Elle est sécrétée par les cellules de Sertoli chez les mâles et par les cellules de la granulosa de petits follicules en croissance chez les femelles (Walter *et al.*, 2019). La principale fonction de l'AMH est l'inhibition développement des canaux de Müller (précurseur des trompes utérines) lors de l'embryogenèse chez l'homme. Une diminution de la sécrétion d'AMH après la puberté est décrite chez l'homme, le taureau et l'étalon. Chez la femme, l'AMH est produite par les cellules de la granulosa après la puberté, elle empêche le recrutement de follicules primordiaux dans le pool de follicules en croissance et diminue la réactivité des follicules en croissance à l'hormone folliculo-stimulante (Walter *et al.*, 2019). Ainsi, cette hormone est étudiée et utilisée concernant ses rôles de biomarqueur lors de tumeurs des cellules de la granulosa (TCG) et des tumeurs des cellules de Sertoli (TCS).

- *Les rôles biomarqueur de l'AMH chez l'Homme*

Chez la femme, il a été montré que l'AMH est un biomarqueur diagnostique des TCG présentant de très bons indices de performances. Il a été montré par plusieurs études que la concentration sanguine en AMH est corrélée à la taille de la tumeur (Victoria *et al.*, 2019). Concernant la détection de tumeurs primaires, la sensibilité est comprise entre 76% et 91% d'après la méta-analyse effectuée par Geerts *et al.* (2009). L'étude menée par Färkkilä *et al.* (2015) montre quant à elle une sensibilité égale à 92% pour la détection de TCG. La spécificité de ce test est

estimée entre 91 et 100% suivant les études (Victoria *et al.*, 2019). Il apparaît ainsi que l'AMH est un biomarqueur précis pour le diagnostic de TCG chez la femme, plus sensible que la concentration sérique en inhibine, et plus spécifique que la concentration sérique en œstradiol, deux autres hormones synthétisées par les cellules de la granulosa (Victoria *et al.*, 2019).

De manière intéressante, le potentiel de l'AMH en tant que biomarqueur de suivi lors de TCG, a été investigué par différentes études. Plusieurs études ont montré que la concentration sérique d'AMH à la suite d'une exérèse chirurgicale complète, diminuait en quelques jours jusqu'à des concentrations indétectables (Färkkilä *et al.*, 2015). Les auteurs suggèrent ainsi l'utilisation de l'AMH en tant que biomarqueur de suivi témoignant du caractère complet de l'exérèse chirurgicale lorsque sa concentration diminue jusqu'à des valeurs indétectables.

L'étude menée par Lane *et al.* (1999) montre quant à elle, que parmi 56 femmes ayant subi une exérèse de TCG, 10 ont présenté des concentrations sanguines élevées persistantes d'AMH ou une élévation de celle-ci et ce, après une certaine période pendant laquelle cette concentration fut comprise dans les valeurs usuelles, sans signes cliniques liés à l'atteinte tumorale. Des examens d'imagerie (scanner ou IRM) ont pu montrer que six d'entre elles présentaient une exérèse tumorale incomplète ou une récurrence. Les quatre autres individus ont montré une élévation significative et continue d'AMH sans visualisation de processus tumoral aux examens d'imagerie, laissant supposer d'après les auteurs, une croissance lente et indétectable de la tumeur.

L'étude de Rey *et al.* (1996) montre des résultats similaires ; une élévation précoce de la concentration d'AMH fut notée chez les patientes ayant présentée une récurrence tumorale après ovariectomie, précédant la détection de ces récurrences de 11 mois à 2 ans. Une patiente présentant une résistance au protocole de chimiothérapie a montré une concentration d'AMH élevée de manière persistante.

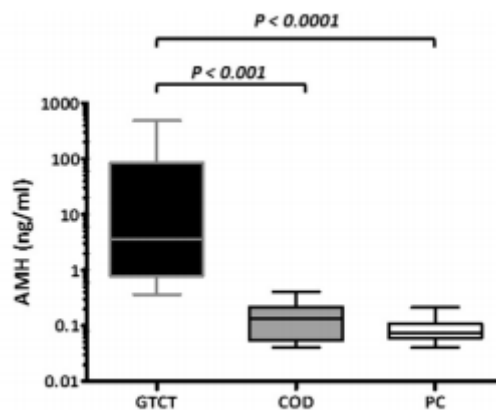
Enfin, l'étude menée par Färkkilä *et al.* (2015) montre qu'une élévation de la concentration sanguine d'AMH a été notée chez 16 patientes parmi 123 atteintes de TCG ayant subi un traitement chirurgical et/ou de chimiothérapie, sans mise en évidence macroscopique de récurrence. Cette augmentation de concentration sanguine d'AMH a précédé la détection de récurrence macroscopiquement visible chez 11 d'entre elles (69%), en moyenne de 3,4 ans (0,7 – 8,2 ans). Les cinq autres patientes présentant une augmentation de concentration sanguine d'AMH n'ont pas développé de récurrence détectable durant la période d'observation. Il est toutefois à noter que la période de suivi de ces cinq femmes fut significativement plus courte (en moyenne 2 ans) par rapport à celle des 11 femmes ayant déclaré une récurrence détectable (en moyenne 7,8 ans).

Ainsi, l'AMH semble être un biomarqueur sanguin présentant de très bonnes valeurs en termes de performance diagnostique chez les femmes présentant une TCG. Cette hormone semble par ailleurs présenter un réel intérêt en termes de suivi. En effet les concentrations obtenues chez les individus en rémission complète sont indétectables ou comprises dans les valeurs usuelles, celles obtenues chez les individus dont le traitement chirurgical fut incomplet montrent une élévation persistante après chirurgie, et les individus présentant une récurrence tumorale montrent une augmentation de cette concentration pouvant précéder la détection clinique de la tumeur de plusieurs années. Toutefois, l'impact de la surveillance des récurrences par ce biomarqueur sur la survie des individus atteints reste à démontrer.

- *Les rôles biomarqueur de l'AMH en médecine vétérinaire*

En médecine vétérinaire, compte tenu des enjeux importants de la reproduction dans ces filières, les concentrations sanguines d'AMH en cas de pathologies de l'ovaire ont d'abord été investiguées chez la vache et la jument. Il a été montré qu'une augmentation de la concentration sérique d'AMH au-delà du seuil limite fixé à 4 ng/mL est diagnostique de la présence de TCG, avec une sensibilité évaluée à 98% par l'étude de Ball *et al.* (2013) menée sur 44 juments, pour lesquelles cette tumeur fut confirmée par un examen histopathologique. De la même manière, l'étude menée par El-Sheikh Ali *et al.* (2013) a montré une augmentation significative de la concentration d'AMH chez les vaches atteintes de TCG par rapport aux vaches cyclées sans pathologie ovarienne et aux vaches présentant une maladie kystique des ovaires (figure 25).

Figure 25 : Diagramme en boîte montrant les concentrations sériques d'AMH chez les vaches atteintes de TCG (GTCT, n = 9), les vaches présentant une maladie kystique des ovaires (COD, n = 8), et des vaches saines cyclées (PC, n = 25). (El-Sheikh Ali *et al.*, 2013)

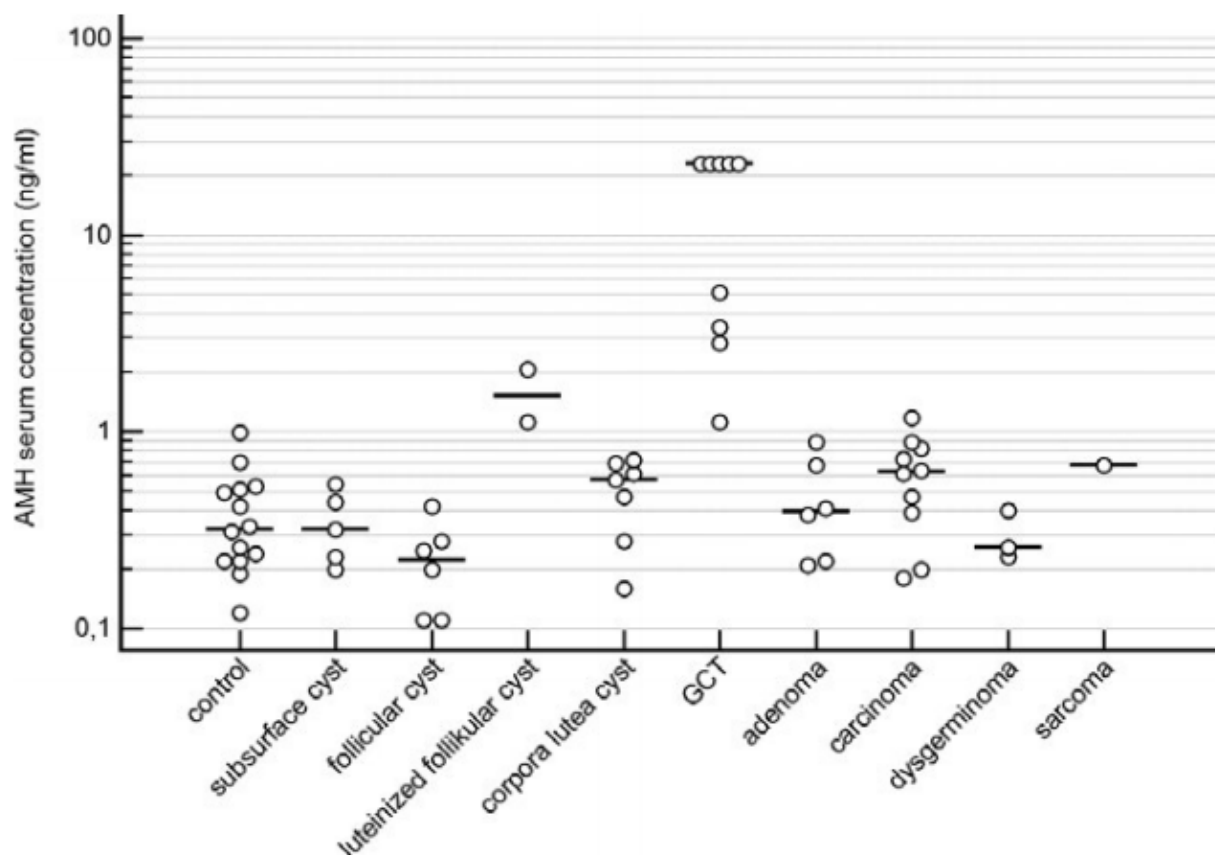


GTCT : Tumeur des cellules de la granulosa. COD : maladie kystique de l'ovaire. PC : groupe contrôle.

Les auteurs de cette dernière étude avancent une valeur d'ASC égale à 99,2%, ainsi qu'une sensibilité égale à 100% et une spécificité égale à 99,1% pour une valeur seuil fixée à 0,36 ng/mL.

Chez la chienne, l'étude de Walter *et al.* (2018) a montré une augmentation significative d'AMH dans le sang chez les chiennes atteintes de TCG par rapport aux chiennes saines comme aux chiennes présentant une autre pathologie ovarienne néoplasique ou une pathologie ovarienne non néoplasique, notamment les kystes folliculaires ou lutéaux (figure 26)

Figure 26 : Diagramme présentant les différentes concentrations sériques en AMH chez des chiennes saines, atteintes de pathologies néoplasiques et non néoplasiques différentes. (Walter et al., 2018)

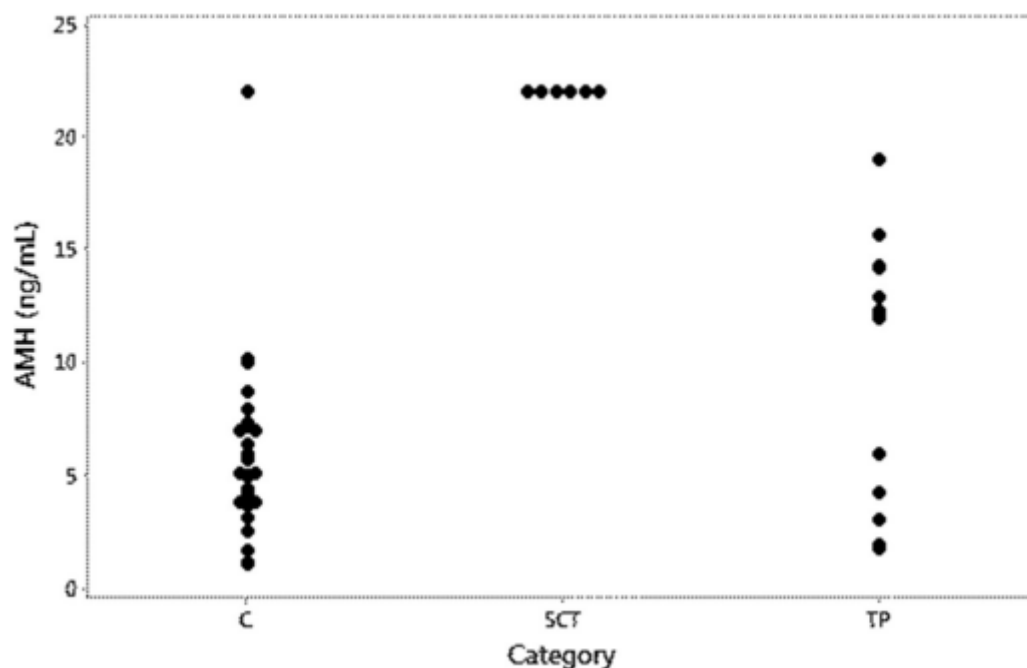


Control : groupe contrôle. Subsurface cyst : Kyste sous-capsulaire. Follicular cyst : kyste folliculaire. Luteinized follicular cyst : kyste folliculaire lutéinisé. Corpora lutea cyst : Kyste lutéal. GCT : tumeur des cellules à granulosa. Adenoma : Adénome. Carcinoma : carcinome. Dysgerminoma : dysgerminome. Sarcoma : sarcome.

Sur neuf chiennes présentant une TCG, cinq ont montré une concentration sérique d'AMH supérieure au seuil maximal de dosage du test. Toutefois, deux autres ont montré des taux compris dans les valeurs prises par des chiennes présentant des kystes folliculaires lutéinisés, tel que présenté sur la figure 26. Les auteurs de cette étude montrent que ce test permet d'obtenir une aire sous la courbe ROC égale à 0,995, soit une très bonne valeur en termes de performance diagnostique. Pour une valeur seuil établie à 0,99 ng/mL, la sensibilité est évaluée à 100%, et la spécificité à 94,44%. Pour obtenir une spécificité égale à 100%, la valeur seuil dans cette étude doit être fixée à 2,09 ng/mL, correspondant à une sensibilité égale à 88,89%. Ces valeurs montrent de bonnes performances diagnostiques, bien que des chiennes présentant une TCG peuvent montrer des valeurs de concentration sérique en AMH égales à celles de chiennes présentant certains types de kystes ovariens. D'autres études seraient nécessaires chez la chienne, incluant un nombre plus important d'animaux, pour confirmer ces résultats.

Chez les chiens mâles, plusieurs articles scientifiques ont montré une augmentation de la concentration sérique en AMH lors de TCS. L'étude menée par Holst et Dreimanis (2015) montre une augmentation significative de la concentration sérique d'AMH chez les chiens présentant une TCS (n = 6), par rapport aux chiens sains non castrés (n = 27) ainsi que par rapport à des chiens présentant une autre pathologie testiculaire néoplasique ou une pathologie non néoplasique (n = 14). Tous les chiens présentant une TCS ont montré une concentration sérique d'AMH supérieure à 22 ng/mL, tandis qu'aucun des chiens présentant une autre pathologie testiculaire n'excédait cette concentration (figure 27). Toutefois, un des chiens non castrés sains, a montré une concentration sérique d'AMH égale à 47 ng/mL. Ce dernier fut perdu de vue et aucun examen complémentaire n'a pu être effectué dans le but d'investiguer une potentielle pathologie testiculaire non révélée par la palpation.

Figure 27 : Diagramme montrant les concentration sériques en AMH chez des chiens sains non castrés (C), des chiens présentant une tumeur des cellules de Sertoli (SCT), et des chiens présentant d'autres pathologies testiculaires (TP). (Holst et Dreimanis, 2015)



Dans le même sens, Ano *et al.* (2014) ont également montré une augmentation de la concentration sérique d'AMH chez un chien atteint de TCS (79,968 pmol/L) par rapport à deux chiens sains non castré (25,91 pmol/L et 48,26 pmol/L) ainsi que deux chiens sains castrés (< 0,71 pmol/L). De plus, cet article décrit une diminution rapide de cette concentration, inférieure à 0,71 pmol/L trois et quatre mois après castration, soit des valeurs correspondant à celles des chiens sains castrés.

Chez le chat, un cas a été rapporté montrant une concentration sérique d'AMH élevée chez une chatte ayant présenté une TCG (5,7 ng/mL). Cette concentration était significativement plus

élevée que celle de 8 femelles stérilisées et significativement plus élevée que celle de 4 femelles entières, dont la plus haute concentration sérique enregistrée était de 1,7 ng/mL. Deux mois après une procédure d'ovariohystérectomie, la concentration sérique d'AMH était inférieure au seuil minimal de détection du test, soit inférieure à 0,04 ng/mL (Heaps *et al.*, 2017).

Toutefois, le potentiel de l'AMH en tant que biomarqueur pronostique ou de suivi n'a pas encore été évalué en médecine vétérinaire. Des études supplémentaires sont donc nécessaires dans ce domaine. Il est également à noter que l'intérêt diagnostique de ce marqueur est limité par le fait que toute pathologie concernant les ovaires ou les testicules est majoritairement traitée par exérèse chirurgicale en médecine vétérinaire. Ainsi, un test diagnostique précis permettant de mettre en évidence une TCG ou une TCS avant exérèse chirurgicale est rarement nécessaire. Ainsi, des études supplémentaires sont nécessaires pour établir la potentielle utilité clinique de ce marqueur dans le suivi des animaux ayant présenté une TCG ou une TCS, et évaluer notamment sa capacité à détecter des processus métastatiques après exérèse chirurgicale.

f. La Thymidine Kinase 1

- *Définition*

La Thymidine Kinase est une enzyme de type phosphotransférase catalysant la réaction suivante :



Cette enzyme a donc pour rôle de phosphoryler la thymidine, qui une fois sous forme triphosphate (TMP) entre dans la composition de l'ADN en tant que nucléotide. Il existe deux formes de cette enzyme ; la Thymidine Kinase 1 (TK1) et la Thymidine Kinase 2 (TK2). La TK1 est située dans le cytosol, tandis que la TK2 est située dans la mitochondrie. Ainsi, lorsque la cellule est quiescente (phase G0), la quantité et l'activité de cette enzyme sont faibles, tandis que lors de la phase de division cellulaire (phase S), la quantité et l'activité de cette enzyme sont élevée. On peut donc aisément comprendre que lors de processus néoplasique impliquant une multiplication cellulaire importante, cette enzyme puisse de par son augmentation d'activité montrer un intérêt en tant que biomarqueur.

- *La Thymidine Kinase en tant que biomarqueur en oncologie chez l'Homme*

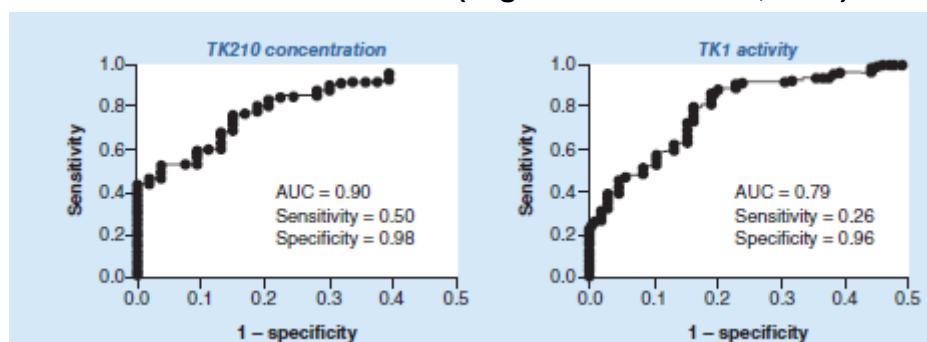
Chez l'Homme, il a été montré que plusieurs conditions pathologiques peuvent entraîner une augmentation de TK1 sérique, telles que les infections, les processus inflammatoires et les néoplasies (Jagarlamudi et Shaw, 2018).

Une augmentation sérique de la concentration de TK1 peut donc résulter de nombreux processus pathologiques : les proliférations tissulaires (prostate, tissu mammaire), certaines infections (hépatites virales notamment), les inflammations, ainsi que les processus néoplasiques (Jagarlamudi et Shaw, 2018). Ceci implique une diminution de la spécificité de ce test vis à vis des néoplasies. En termes de surveillance, l'étude de Chen *et al.* (2008) montre que sur une large population testée (plus de 11 000 individus), une élévation de la concentration de TK1 sérique correspondait dans 83% des cas à une activité de prolifération tissulaire, pouvant être maligne, pré-cancéreuse, ou bénigne. Les auteurs de cette dernière étude suggèrent donc l'utilisation de ce marqueur dans la surveillance d'apparition des processus néoplasiques dans la population.

L'enzyme TK1 étant retrouvée dans le sang principalement sous forme active lors de processus néoplasiques hématologiques, la mesure de son niveau d'activité dans un prélèvement sanguin est considérée comme un outil fiable dans la gestion de ces types tumoraux. Il a été montré que l'activité de TK1 est corrélée avec le stade clinique de la maladie, et les individus atteints à un stade précoce mais présentant une activité élevée de TK1 sont plus souvent sujets à une forme progressive de la maladie. De plus, l'activité de TK1 est corrélée au marqueur Ki-67, ainsi qu'à la masse totale de cellules en division. Ainsi, elle peut refléter le caractère progressif de la maladie, et est associée au pronostic des patients atteints (Jagarlamudi et Shaw, 2018). Les études montrent que le dosage par immunomarquage (c'est-à-dire lors de l'appréciation de la concentration de TK1 par technique ELISA, sans prendre en compte son niveau d'activité) est significativement corrélé avec le dosage de l'activité de TK1 ; des courbes ROC similaires sont obtenues pour le diagnostic des processus néoplasiques hématologiques (aire sous la courbe ROC égale à 0,84 pour le dosage de TK1 par méthode ELISA, et 0,79 pour le dosage de l'activité de TK1) (Jagarlamudi et Shaw, 2018).

Concernant les tumeurs solides, le niveau d'activité de TK1 dans le sang des patients atteints est moindre que lors de néoplasies hématologiques. Ceci pouvant être expliqué par le fait que l'enzyme TK1 est libérée sous forme majoritairement inactive par les cellules tumorales de tumeur solide contrairement aux tumeurs hématologiques qui libèrent principalement cette enzyme sous forme active. Ainsi, la majorité des études montrent que la concentration totale de TK1 dans le sang est plus indiquée pour le diagnostic des tumeurs solides (figure 28, Jagarlamudi et Shaw, 2018).

Figure 28 : Courbes ROC étudiant les capacités de la concentration (à gauche) et de l'activité (à droite) de la thymidine kinase pour diagnostiquer les patientes atteintes de cancer du sein de stade II (Jagarlamudi et Shaw, 2018).



Une élévation significative de la concentration sérique de TK1 a été reportée pour de nombreux types de cancers, incluant les tumeurs gastriques, ovariennes, de la prostate, du poumon, de l'œsophage ou mammaires (Jagarlamudi et Shaw, 2018).

Il a également été montré que la concentration sérique de TK1 lors de tumeur solide est associée au stade clinique. Aussi, une concentration sérique de TK1 élevée après une chirurgie de résection ou une chimiothérapie est associée de manière significative à une diminution de la survie, ce qui permet d'attester du caractère pronostique de la concentration en TK1 sérique, et pourrait être marqueur d'une progression de la maladie (Jagarlamudi et Shaw, 2018).

- *La Thymidine Kinase 1 en tant que biomarqueur en oncologie chez le chien*
 - La Thymidine Kinase 1 en tant que biomarqueur diagnostique

Chez le chien, quatorze articles scientifiques sont parus depuis 1997 concernant l'intérêt de la Thymidine Kinase 1 en tant que biomarqueur en oncologie.

En utilisant un substrat de cette enzyme marqué par un isotope radioactif (iode ou hydrogène) ou un élément chimioluminescent, il a été montré que l'activité de la TK1 se retrouve augmentée particulièrement dans le sang des chiens atteints de lymphomes et de leucémies myéloïdes par rapport aux chiens sains (Nakamura *et al.*, 1997 ; Euler *et al.*, 2004 ; von Euler *et al.*, 2006 ; Von Euler *et al.*, 2009 ; Thamm *et al.*, 2012 ; Sharif *et al.*, 2012 ; Kiran Kumar *et al.*, 2013 ; Kiran Kumar *et al.*, 2015 ; Selting *et al.*, 2016 ; Boyé *et al.*, 2019). Les performances diagnostiques exposées par certains de ces auteurs (ASC, sensibilité et/ou spécificité) de l'activité de TK1 pour différencier les chiens atteints de processus néoplasiques hématopoïétiques des chiens sains sont exposés dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Performances diagnostiques de TK1 pour identifier les chiens atteints de tumeurs hématopoïétiques (lymphomes et leucémies).

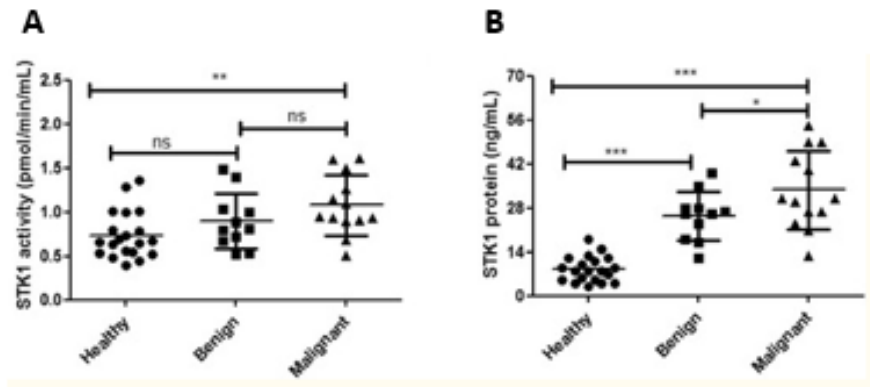
Etude	Nombre de chiens atteints	Nombre de chiens sains	ASC ROC	Sensibilité	Spécificité
Nakamura <i>et al.</i> , 1997	20	13		100%	100%
Euler <i>et al.</i> , 2004	52	21	0,975	92%	98,1%
Thamm <i>et al.</i> , 2012	14	24	0,92	80%	
Sharif <i>et al.</i> , 2012	34	35	0,88	94%	68%
Kiran Kumar <i>et al.</i> , 2015	43	42	0,84	79%	97%
Selting <i>et al.</i> , 2016	83	156	0,95		

Ainsi, l'activité de la TK1, significativement augmentée lors de tumeurs hématopoïétiques, semble présenter de bonnes valeurs en termes de performances diagnostiques. La plupart des études s'accordent sur le fait que les tumeurs solides n'entraînent pas d'augmentation significative de l'activité de TK1 dans le sang (Nakamura *et al.*, 1997 ; Euler *et al.*, 2004 ; Sharif *et al.*, 2012 ; Kiran Kumar *et al.*, 2013 ; Kiran Kumar *et al.*, 2015). Cependant, Kiran Kumar *et al.* (2014) montrent que chez 27 chiennes atteintes de tumeurs mammaires, l'activité de TK1 est significativement augmentée par rapport à celle de 20 chiennes saines. De même, l'étude effectuée par l'équipe de Thamm *et al.* (2012) montre qu'une augmentation significative de l'activité de TK1 est notée chez les chiens atteints d'hémangiosarcome par rapport aux chiens sains, bien que ce ne fût pas vérifié pour les chiens atteints de carcinome urothélial ni chez les chiens atteints d'ostéosarcome. Enfin, une étude récente menée par Selting *et al.* (2016) montre une augmentation significative mais peu importante de l'activité de TK1 chez les chiens atteints de mastocytomes, hémangiosarcomes, carcinomes, sarcomes, mélanomes, sarcomes histiocytaires et ostéosarcomes.

En 2013, l'équipe de Kiran Kumar *et al.* a montré que les chiens atteints de tumeurs solides ne révélaient pas d'augmentation significative de l'activité de TK1 par rapport aux chiens sains. Toutefois, par technique de western blot, ils mettent en évidence chez les chiens atteints de tumeurs solides une augmentation importante de la concentration sanguine de cette enzyme, ce qui permet d'affirmer la présence d'une fraction importante d'enzyme TK1 inactive dans le sang. Ainsi, en se basant sur la concentration sanguine totale de TK1, les chiens atteints de tumeurs hématopoïétiques, mais également les chiens atteints de tumeurs solides présentent une augmentation significative par rapport aux chiens sains (tumeurs hématopoïétiques : ASC = 0,94, sensibilité = 75%, spécificité = 94% ; tumeurs solides : ASC = 0,97, sensibilité = 71%, spécificité = 94%). Cette observation est confirmée par Kiran Kumar *et al.* (2014) qui montrent que la

concentration sérique de TK1 permet de distinguer les individus atteints de tumeurs mammaires, même de stade peu avancé, et ce plus précisément que l'activité de cette enzyme (figure 29).

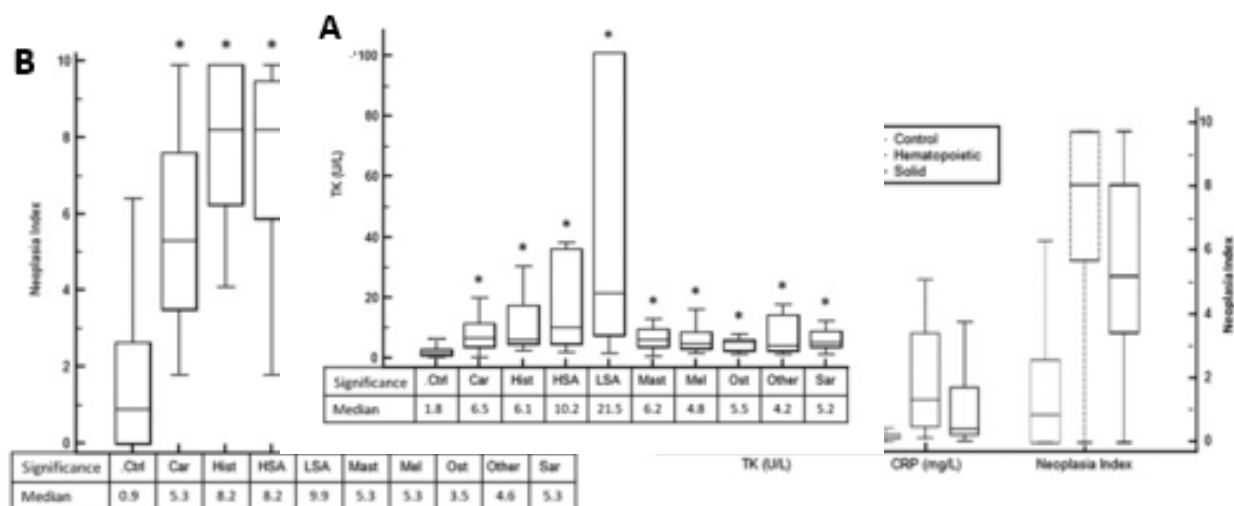
Figure 29 : Activité (A) et concentration (B) sérique de TK1 dans le sang de chiens sains, atteints de tumeurs mammaires bénignes et malignes (Kiran Kumar *et al.*, 2014)



Kiran Kumar *et al.* (2015) ont élaboré un test ELISA permettant de mesurer la concentration sanguine de TK1 chez 43 chiens atteints de tumeurs hématopoïétiques et 55 chiens atteints de tumeurs solides (tumeurs mammaires, mastocytomes, mélanomes et autres), qui permet de montrer une augmentation significative de cette concentration chez ces deux groupes par rapport à 42 chiens sains. En déterminant comme valeur limite supérieure chez les chiens sains 0,47 ng/mL, les ASC ROC, sensibilité et spécificité de ce test pour distinguer les chiens atteints de tumeurs hématopoïétiques des chiens sains étaient respectivement de 0,96 , 78% et 98%. En conservant la même valeur seuil, les ASC ROC, sensibilité et spécificité de ce test pour distinguer les chiens atteints de tumeurs solides des chiens sains étaient respectivement égales à 0,88 , 60% et 97%. Ces valeurs étaient nettement supérieures aux valeurs obtenues en utilisant le dosage de l'activité de TK1 dans le sang (ASC ROC, sensibilité et spécificité tumeurs hématopoïétiques : 0,84 , 70%, 97% ; tumeurs solides : 0,59 , 20%, 97%).

Deux études se sont intéressées à un index néoplasique intégrant les valeurs d'activité de TK1 sérique ainsi que la concentration sérique de protéine C réactive (CRP) chez les chiens atteints de différents types de cancers (Selting *et al.*, 2015 ; Selting *et al.*, 2016). L'étude menée par Selting *et al.* (2016) a montré une augmentation significative de l'activité de TK1 ainsi que de l'index néoplasique chez les chiens atteints de différents types néoplasiques hématopoïétiques et non hématopoïétiques (figure 30).

Figure 30 : Distributions des valeurs d'activité de TK1 (A) et de l'index néoplasique (B) illustrées par diagrammes en boîte chez des chiens sains et atteints de différents types tumoraux. Distributions des valeurs d'activité de TK1, de la CRP et de l'index néoplasique chez les chiens sains, atteints de tumeurs solides et hématopoïétiques (C). (Selting *et al.*, 2016)



Ctrl : groupe contrôle, *Car* : Carcinomes, *Hist* : carcinome histiocytaire, *HSA* : Hémangiosarcomes, *LSA* : Lymphomes, *Mast* : Mastocytomes, *Mel* : Mélanomes, *Ost* : Ostéosarcomes, *Sar* : Sarcomes, *Other* : Autres. Les médianes des différents groupes sont indiquées dans les tableaux situés sous les diagrammes en boîte. * indique $p < 0,05$.

Dans tous les cas, sauf pour les mastocytomes, l'ASC ROC était plus élevée en utilisant l'indice de néoplasie que l'activité de TK1 seule. La différence entre les deux ASC ROC pour chaque type tumoral n'était cependant pas significative, sauf pour le sarcome histiocytaire dont l'indice néoplasique montrait une performance diagnostique significativement supérieure ($p = 0,004$).

L'étude menée par Selting *et al.* (2015) avait sélectionné 360 chiens apparemment sains et les a suivis durant 6 mois dans le but d'évaluer l'intérêt de l'index néoplasique dans la surveillance d'apparition d'un processus tumoral. 11 chiens ont déclaré un cancer (3 hématopoïétiques et 8 non hématopoïétiques) durant la période de surveillance. Les valeurs initiales de l'index néoplasique ont permis de prédire l'apparition d'un cancer dans les quatre mois avec une sensibilité et une spécificité respectivement égales à 100% et 91%, et dans les six mois avec une sensibilité et une spécificité respectivement égales à 82% et 91% (ASC = 0,93). Ces valeurs furent significativement supérieures à celles obtenues lors de l'évaluation de l'activité de TK1 seule (sensibilité et spécificité à 4 mois : 89% et 84% ; ASC, sensibilité et spécificité à 6 mois : 0,84, 73%, 84%). Cette étude montre donc que l'index néoplasique peut se révéler très intéressant dans le diagnostic de processus néoplasiques occultes.

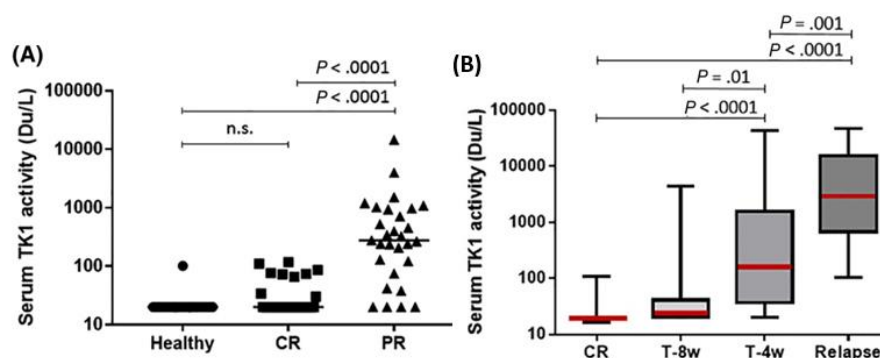
□ La Thymidine Kinase 1 en tant que biomarqueur pronostique

En terme d'intérêt pronostique, il a été montré que l'activité de TK1 augmentait avec le stade d'avancement du cancer (Euler *et al.*, 2004 ; Selting *et al.*, 2016). De plus, une augmentation de l'activité de TK1 supérieure à 30 U/L est significativement associée à une diminution du temps de survie global chez les chiens atteints de lymphomes par rapport à une activité inférieure à 30 U/L (médianes de survie respectivement égales à 1 mois et 9 mois) (Euler *et al.*, 2004).

□ La Thymidine Kinase 1 en tant que biomarqueur de suivi

Enfin, plusieurs études se sont intéressées à l'intérêt de TK1 en tant que biomarqueur pharmacodynamique chez les chiens atteints tumeurs hématopoïétiques (lymphomes et leucémies) en cours de traitement. L'ensemble de ces études s'accordent sur le fait que les chiens placés sous chimiothérapie et montrant une réponse à cette dernière présentent une diminution significative de l'activité de TK1, dont les valeurs rejoignent les valeurs usuelles en cas de réponse complète (Euler *et al.*, 2004 ; Von Euler *et al.*, 2009 ; Sharif *et al.*, 2012 ; Elliott *et al.*, 2013 ; Boyé *et al.*, 2019). Ces résultats sont également observés dans l'étude de Kiran Kumar *et al.* (2015) portant sur la concentration sérique de TK1. D'après ces mêmes études, ces valeurs restent significativement élevées en cas de non-rémission, ou augmentent au cours du traitement en cas de rechute. Boyé *et al.*, (2019) montrent chez 93 chiens atteints de lymphomes que l'activité de TK1 est significativement moins élevée en cas de réponse complète par rapport à une rémission seulement partielle (ASC = 0,90, sensibilité = 76%, spécificité = 100%, figure 31.A).

Figure 31 : Distribution des valeurs d'activité de TK1 chez des chiens sains et chez des chiens atteints de lymphomes en fonction de leur réponse au traitement (A), et évolution au cours de traitement chez les individus ayant présenté une rechute (B). (Boyé *et al.*, 2019)



De plus, cette étude montre qu'une augmentation de l'activité de TK1 peut prédire une rechute quatre semaines avant une mise en évidence clinique (figure 31.B).

Ainsi, autant chez l'Homme que chez l'animal, la TK1 montre de bonnes valeurs en termes de performances diagnostiques, pronostiques, et de suivi en oncologie, et semble donc être un bon candidat en tant que biomarqueur dans ce domaine, malgré un certain manque de spécificité de cette enzyme pour les pathologies néoplasiques.

C. Les biomarqueurs nucléiques

a. Les Acides Désoxyribonucléiques Circulants (ADN)

- *Caractéristiques et rôles biomarqueurs de l'ADN circulant chez l'Homme*

L'ADN libre circulant (*cell-free ADN*, ADNcf) dans la circulation humaine a été signalé pour la première fois en 1948 (Mandel et Metais, 1948). Il a été supposé que l'ADN circulant tumoral (ADNct) était un composant de l'ADNcf car une élévation des concentrations d'ADNcf a été observée chez les patients atteints de cancer (Leon *et al.*, 1977). C'est plusieurs années plus tard qu'il a été rapporté qu'une fraction de l'ADNcf présent dans le plasma des patients cancéreux provenait de cellules cancéreuses (Stroun *et al.*, 1989), suivie peu de temps après de la première détection de mutation dans les fluides corporels : la détection du gène TP53 (dont le produit, la protéine p53, est un facteur de transcription régulant de multiples fonctions cellulaires importantes comme la régulation du cycle cellulaire, l'autophagie ou l'apoptose) muté dans l'urine de patients atteints de cancer de la vessie (Sidransky *et al.*, 1991). Les progrès technologiques ont par la suite contribué à l'essor de l'utilisation de l'analyse génomique dans les applications de biopsie liquide.

En situation physiologique, la majorité de l'ADNcf est libéré par les cellules hématopoïétiques (Sun *et al.*, 2015). La présence d'ADNcf a été observée dans des conditions physiologiques comme pathologiques, incluant notamment l'exercice, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les infarctus du myocarde, le sepsis, le diabète, le lupus (Antonatos *et al.*, 2006 ; Campello Yurgel *et al.*, 2007 ; Breitbart *et al.*, 2012 ; Dwivedi *et al.*, 2012).

L'ADNct est libéré par les cellules tumorales circulantes (CTCs) et des cellules tumorales présentes au sein de la tumeur. Plusieurs études suggèrent que les cellules au sein de la tumeur constituent la principale source d'ADNct par rapport aux CTCs. En effet, de l'ADNct est détecté même en l'absence de CTCs dans le sang. Aussi, lorsque des CTCs sont présentes, la quantité d'ADNct détectée est beaucoup plus importante qu'il ne serait attendu si elle était principalement délivrée par les CTCs (Crowley *et al.*, 2013 ; Bettgowda *et al.*, 2014 ; Thierry *et al.*, 2016). Les processus d'apoptose et de nécrose ont été proposés comme les principaux mécanismes produisant de l'ADNct à partir des cellules tumorales. En effet, la présence de nucléosomes (ADN formé autour d'un cœur d'histones) évoque une origine de l'ADNct par apoptose, la présence d'ADNct de petite taille évoque la possibilité que l'ADN soit dégradé par des nucléases et soit donc un produit de phagocytose par les macrophages des cellules tumorales nécrotiques, tandis que la présence de fragments d'ADNct plus longs pourrait provenir directement de la nécrose cellulaire (Diehl *et al.*, 2005 ; Jiang et Lo, 2016 ; Thierry *et al.*, 2016).

L'ADNct forme une partie très réduite de l'ADN total circulant, il est donc particulièrement complexe de le détecter spécifiquement. Les mutations somatiques (mutations ponctuelles, insertions, réarrangements), la variabilité du nombre de copies d'un gène, l'aneuploïdie et le degré de méthylation sont utilisés pour identifier l'ADNct parmi l'ADNcf, à l'aide de nombreuses méthodes différentes (Leary *et al.*, 2010 ; Leary *et al.*, 2012 ; Chan *et al.*, 2013 ; Murtaza *et al.*, 2013 ; Douville

et al., 2018). La taille des fragments d'ADNcf et d'ADNct a également été proposée comme moyen de différenciation. En effet, des études ont montré qu'une fraction de l'ADNct est composée de fragments en moyenne plus courts que ceux d'ADNcf. Ainsi, évaluer la présence de mutations parmi cette fraction enrichie d'ADN circulant de petite taille pourrait augmenter la sensibilité de détection en améliorant le ratio ADNct/ADNcf (Mouliere *et al.*, 2011 ; Thierry *et al.*, 2016). La sensibilité et la spécificité de chacun de ces moyens d'identification sont variables, et directement dépendantes de la méthode employée.

De nombreuses techniques permettent de détecter de l'ADN circulant dans le sang. Tout d'abord, nombre d'entre elles se basent sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Toutefois, les technologies les plus récentes se basent sur les méthodes de séquençages de nouvelle génération (next-generation sequencing-based methods, NGS), ou méthodes de séquençage à haut débit. Ce sont des méthodes très sensibles, permettant d'identifier et d'amplifier plusieurs milliards de séquences en même temps, analysées par informatique. Il est ainsi possible d'obtenir en quelques jours l'identification complète d'un génome, d'identifier et de quantifier toute mutation présente, et plus seulement les mutations connues et ciblées spécifiquement (Gilson, 2020). Bien que ces technologies soient plus performantes que celles basées sur la PCR, leur coût et leur apparition récente les rendent peu accessibles même dans le domaine de la recherche. Elles devraient toutefois être de plus en plus utilisées à l'avenir, offrant de nombreuses perspectives.

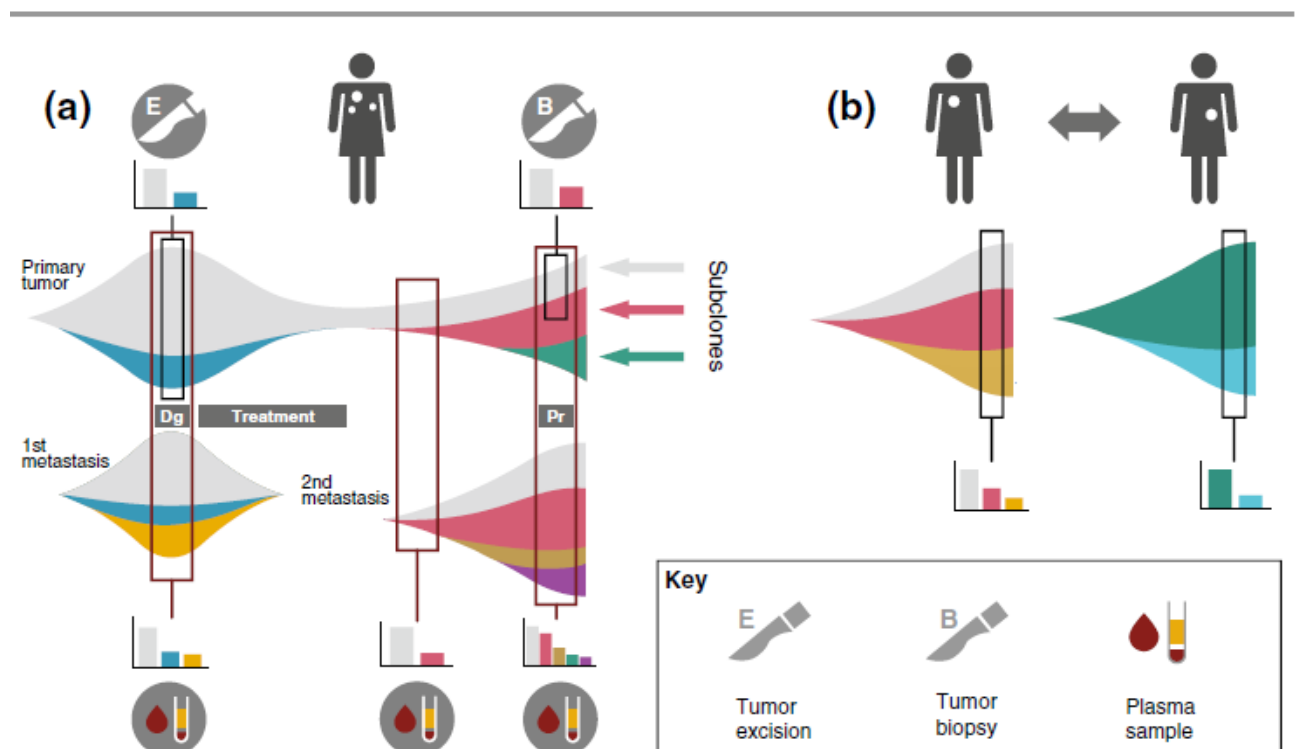
Une caractéristique importante de l'ADN circulant est qu'il possède une demi-vie particulièrement courte. Des études chez la femme enceinte ont montré que le temps moyen de réduction par deux de l'ADN fœtal circulant était de 16,3 minutes (de 4 à 30 minutes au total). Une étude chez un patient atteint de cancer colorectal pour lequel le plasma fut régulièrement prélevé juste après résection de la tumeur a montré une demi vie de l'ADNct de 114 minutes (Diehl *et al.*, 2008). Ainsi, par cette demi-vie particulièrement courte, les quantités d'ADNct mesurées pourraient refléter l'état de la tumeur au moment du prélèvement, ce qui aurait toute son importance lors du suivi des patients.

De plus, il a été montré grâce à différentes propriétés de l'ADNct, qu'il était possible de déterminer le tissu d'origine de l'ADNct identifié. En effet, plusieurs études montrent que les profils de méthylation des ADNct présentent une bonne corrélation avec les profils de méthylation référencés des tissus à l'origine de la tumeur (Sun *et al.*, 2015 ; Lehmann-Werman *et al.*, 2016). L'étude menée par Hao *et al.* (2017) a également utilisé le profil de méthylation de l'ADNct pour déterminer les sites de métastases chez les patients atteints de cancer du côlon. Aussi, Snyder *et al.* (2016) montrent dans une cohorte de plusieurs patients atteints de cancer que le profil d'espacement des nucléosomes sur les ADNct correspondait à celui présent au sein des tissus contenant la tumeur chez plusieurs d'entre eux. Ainsi, une combinaison des changements somatiques et épigénétiques pourrait rendre possible la détection d'un processus tumoral, ainsi que déterminer sa localisation. Enfin, une étude récente basée sur un algorithme d'intelligence artificielle intégrant les informations issues de l'ADNct ainsi que plusieurs biomarqueurs protéiques a permis d'augmenter la sensibilité de détection d'un cancer, mais également d'indiquer les localisations possibles du site tumoral primaire (Cohen *et al.*, 2018).

Une dernière caractéristique majeure concernant l'ADNct est sa capacité à refléter l'hétérogénéité du processus néoplasique en cours chez ces patients. En effet, les caractéristiques

génétiques, et notamment les mutations génétiques, des cellules tumorales peuvent être hétérogènes au sein d'une même tumeur, entre les différentes tumeurs d'un même patient, ou encore entre les tumeurs primaires et les métastases développées. Ces profils de mutations ou variations au sein de l'ADN des cellules tumorales sont essentielles à connaître pour l'établissement d'un traitement ciblé, puisque certains traitements ciblent le produit de certains gènes, tandis que certaines mutations génétiques sont connues pour induire une résistance à ces traitements. Le génotypage des tissus tumoraux est donc actuellement l'approche standard pour la caractérisation des profils génétiques tumoraux au moment du diagnostic. Cependant, cette approche présente plusieurs limites : premièrement, la grande majorité des génotypages des tissus tumoraux se concentrent sur une seule ou quelques anomalies génétiques dans les gènes principaux qui ont démontré une valeur pronostique et/ou prédictive, ignorant l'ensemble des mutations possibles. Deuxièmement, l'échantillonnage tissulaire unique ne permet pas de saisir l'hétérogénéité génétique entre des sites tumoraux distincts et séparés dans l'espace chez un patient atteint de cancer. Aussi, les biopsies partielles des tumeurs uniques limitent leur caractérisation génétique complète puisque certaines régions de la tumeur ne seront pas atteintes. Enfin, certaines tumeurs ou métastases sont peu ou pas atteignables, en raison du caractère invasif de l'acte. (Gerlinger *et al.*, 2012 ; Perdigones et Murtaza, 2017 ; von Bubnoff, 2017). Ainsi, l'analyse de l'ADNct en tant que biopsie liquide pourrait être un moyen peu invasif d'outrepasser ces limites, et déterminer l'hétérogénéité tumorale des patients, tel que le présente la figure 32 ci-dessous.

Figure 32 : Les différents types d'hétérogénéité tumorale identifiés par le génotypage de la tumeur et de l'ADNct. (Scherer, 2020)



En effet, diverses études récentes ont suggéré que le génotypage de l'ADNct pourrait avoir le potentiel de surmonter ces lacunes précédemment citées grâce à sa capacité à identifier les profils génétiques de tous les sites tumoraux, à condition que les facteurs techniques limitants tels qu'un taux élevé de bruit de fond puissent être surmontés (Perdigones et Murtaza, 2017).

Par exemple, Chan *et al.* (2013) ont analysé par séquençage à haut débit cinq échantillons de tissus tumoraux distincts ainsi qu'un échantillon de plasma provenant d'une patiente atteinte de cancers du sein et de l'ovaire. Les auteurs ont constaté que les échantillons de cancer de l'ovaire (quatre) et du sein (un) présentaient des schémas d'anomalies génétiques sensiblement différents. L'ADNct a cependant permis d'identifier toutes les anomalies des deux types de cancer dans le plasma et a permis une estimation quantitative des contributions de chaque site de cancer (Chan *et al.* 2013). Dans une autre étude, De Mattos-Arruda *et al.* (2014) ont effectué un génotypage ciblé sur un panel de 300 gènes chez une patiente atteinte d'un cancer du sein métastatique et ont évalué la concordance entre les anomalies génétiques trouvées dans la tumeur primaire, les métastases hépatiques et les échantillons de plasma. L'ADNct a permis d'identifier toutes les mutations qui étaient soit partagées entre les sites tumoraux primaires et métastatiques, soit uniques aux deux. En outre, la surveillance de ces anomalies dans le plasma au fil du temps a permis une évaluation précise de la réponse tumorale à la thérapie ciblée. Murtaza *et al.* (2015) ont évalué l'hétérogénéité intra-tumorale dans des biopsies multiples et des échantillons de plasma prélevés sur une patiente atteinte d'un cancer du sein métastatique sur une période clinique de 3 ans. Dans cette étude, les auteurs ont constaté que l'analyse de l'ADNct reflétait la proportion d'anomalies génétiques déterminée par le séquençage de huit échantillons tumoraux distincts. Enfin, la première analyse de séquençage comparative chez 100 patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules à un stade précoce a été récemment réalisée par Abbosh *et al.* (2017). Les auteurs ont comparé les profils de mutations de l'ADNct avec ceux identifiés par analyse des échantillons de tumeurs. Au moins deux anomalies tumorales ont été trouvées dans 46 des 96 échantillons d'ADNct (48%). Dans les cas présentant de l'ADNct, presque toutes les mutations (94%) partagées entre toutes les régions tumorales ont été détectées par le génotypage de l'ADNct, tandis qu'une minorité seulement (27%) des anomalies uniques à une région tumorale ont pu être identifiées. Les auteurs soulèvent toutefois que la réussite à identifier l'hétérogénéité intra-tumorale dans le plasma était associée au sous-type histologique : l'ADNct était détecté dans la majorité des carcinomes épidermoïdes pulmonaires (97%), tandis que ce génotypage non invasif a échoué chez 81% des patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires. Ces études démontrent que le profil génétique de l'ADNct représente probablement la stratégie la plus précise, et en même temps la moins invasive, pour identifier l'hétérogénéité tumorale chez les patients cancéreux. Cependant, une partie de la littérature suggère que des améliorations techniques sont nécessaires pour augmenter la sensibilité de détection des anomalies présentées par des petites sous-populations cellulaires tumorales, présentes en faible nombre.

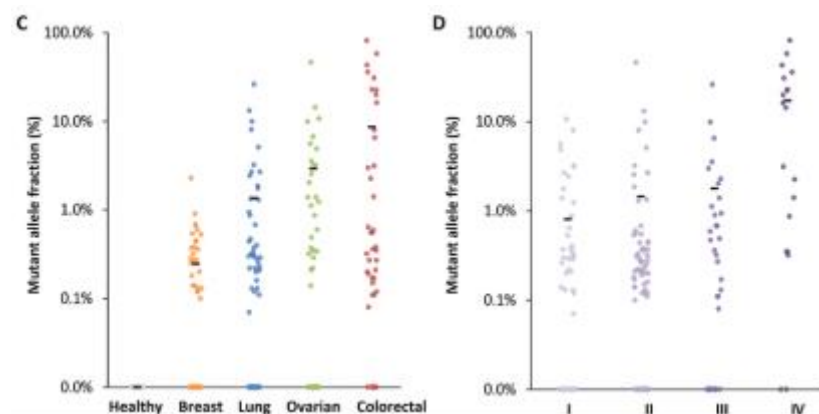
L'ADNct a été observé et caractérisé dans de nombreux types de cancer : cancer du sein, cancer colorectal, cancer des ovaires, cancer du poumon, cancer gastrique, cancer pancréatique, mélanome, etc. (Sausen *et al.*, 2015 ; Calapre *et al.*, 2017 ; Phallen *et al.*, 2017). Le cancer du sein et le cancer colorectal ayant un fort impact au sein de la population mondiale, les études s'intéressant à caractériser leurs différents biomarqueurs font partie des plus nombreuses. Ainsi, les

différentes utilisations de l'ADN circulant en tant que biomarqueur en oncologie humaine seront par la suite principalement illustrées sur la base des études concernant ces deux types de cancers.

□ L'ADN circulant en tant que biomarqueur diagnostique

Concernant le cancer du sein, une méta-analyse récente a rapporté sur la base de 24 études une sensibilité égale à 70% et une spécificité égale à 87% de l'ADNcf pour la détection du cancer du sein. En considérant seulement 6 des 24 études utilisant une méthode moderne quantitative d'évaluation de l'ADNct, les performances en termes d'outil diagnostique étaient largement améliorées, avec une sensibilité et une spécificité respectivement égale à 88% et 98%. Ces valeurs rejoignent voire dépassent aisément celles notamment de la mammographie numérique (Lin *et al.*, 2017). Toutefois il est à noter que certaines études incluses dans cette méta-analyse comprenaient des cancers du sein peu avancés, tandis que d'autres comprenaient des cancers du sein métastasés. Une étude récente menée sur 32 patientes atteintes de cancers du sein de stade I à II par séquençage à haut débit a permis d'identifier des mutations somatiques d'intérêt parmi l'ADNcf (figure 33) dans 19 cas (59%) (Phallen *et al.*, 2017). En sachant que la quantité d'ADNct est bien plus importante lors de cancer du sein métastaté qu'en phase précoce, et que des variations importantes peuvent être enregistrées parmi les patientes présentant un cancer de même stade (Bettegowda *et al.*, 2014), les auteurs suggèrent que les sensibilité et spécificité de l'ADNct dans la surveillance d'apparition du cancer du sein devraient être évaluées par de larges études prospectives et des populations homogènes.

Figure 33 : Fractions d'ADNct parmi l'ADNcf isolé chez des patients sains et des patients atteints de cancers colorectaux, du sein, du poumon, ou de l'ovaire (C), et en fonction du stade tumoral (D). (Phallen *et al.*, 2017)



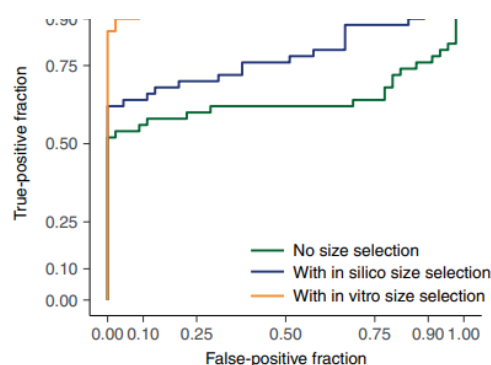
Concernant le cancer colorectal, une récente méta-analyse menée par X. Wang *et al.* (2018) inclut 14 études utilisant l'ADNcf ou les séquences Alu (courts fragments d'ADN appartenant à la

famille des petits éléments nucléaires intercalés) pour la détection de ce cancer, totalisant 1258 patients atteints et 803 individus sains. La sensibilité a été estimée à 73,5%, la spécificité à 91,8%, avec une aire sous la courbe ROC égale à 0,8818 (RV+ = 8,295, RV- = 0,300). Les auteurs concluent que la performance diagnostique de l'ADNcf dans le cadre du cancer colorectal présente une sensibilité encore insuffisante mais une spécificité acceptable. L'étude effectuée par Bettgowda *et al.* (2014) a montré par séquençage de nouvelle génération que la détection de cancer colorectal de stade I et II fut possible dans respectivement 47% et 55% des cas, tandis que l'étude menée par Phallen *et al.*, (2017) utilisant une autre technique de séquençage de nouvelle génération montre que les cancers colorectaux de stade I et II furent détectés dans respectivement 50 et 89% des cas.

Le profil de méthylation de certains promoteurs de gènes peut, lorsqu'il est modifié, indiquer que ces brins d'ADN circulants proviennent de cellules tumorales, et ainsi faire partie de l'ADNct. Ainsi, la détection de la méthylation du promoteur du gène de la Septine 9 (impliquée dans le phénotype oncogénique du cancer colorectal) a permis d'identifier les cancers colorectaux avec une sensibilité égale à 74,8% et une spécificité égale à 87,4% (Jin *et al.*, 2015). Cette dernière étude a montré que ce test identifiait des cancers colorectaux de stade I à 66,7%, de stade II à 82,6%, de stade III à 84,1% et de stade IV à 100%. Enfin, une combinaison de mesures de différents paramètres a été proposée par l'essai CancerSEEK, dont l'ADNct et l'ACE, et a permis l'identification de huit différents types tumoraux en phase précoce (Cohen *et al.*, 2018). Plus de 65% des cancers colorectaux en phase précoce ont été détectés par cette étude.

Il est à noter que l'amélioration des techniques à venir dans les prochaines années telles que la plasmaphérèse, ou la sélection des fragments de taille comprise entre 90 et 150 paires de bases avant séquençage pourrait améliorer la détection des faibles quantités d'ADNct couramment rencontrées lors de cancer en phase précoce, et ainsi améliorer la sensibilité de ce test diagnostique. En effet, une étude a déterminé que l'ADNct est généralement plus fragmenté que l'ADNcf, avec un enrichissement maximal de l'ADNct en fragments de taille comprise entre 90 et 150 paires de bases (Mouliere *et al.*, 2018). Cette étude montre que les performances diagnostiques de l'ADNct à détecter un cancer sont remarquablement améliorées après sélection des fragments d'ADN de 90 à 150 paires de bases. Illustrée par la figure 34 ci-dessous, l'étude de 48 patients atteints de cancer et 46 patients sains a permis de calculer l'aire sous la courbe ROC pour la détection de cancer à l'aide de l'ADNct, qui sans enrichissement était égale à 0,64 (courbe verte) tandis qu'après un enrichissement *in vitro* (courbe orange) cette aire était égale à 0,97.

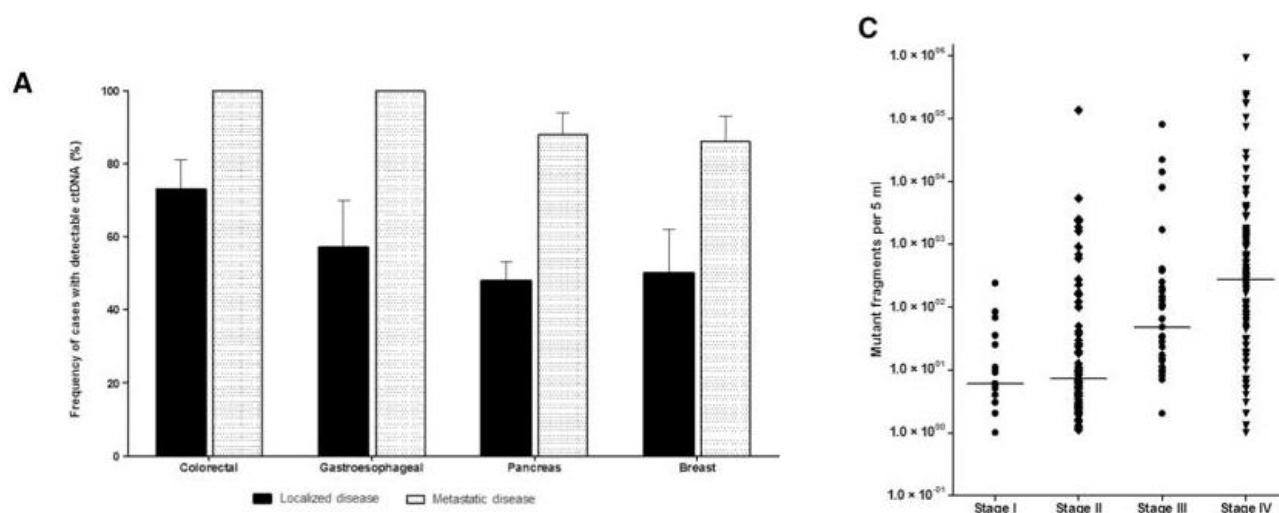
Figure 34 : Courbes ROC étudiant la capacité de l'ADNct à détecter un cancer (48 individus atteints de cancers variés et 46 individus sains), montrant une ASC égale à 0,64 sans sélection par rapport à la taille des fragments d'ADN (courbe verte), à 0,78 après sélection *in silico*, et à 0,97 après sélection *in vitro*. (Moulière *et al.* 2018)



□ L'ADN circulant en tant que biomarqueur pronostique

La quantité d'ADNct est dans la plupart des études augmentée en fonction du stade d'avancée du processus tumoral, tel que peut le montrer la figure 35 (Bettegowda *et al.*, 2014 ; Zhou *et al.*, 2019). Ainsi, une quantité importante d'ADNct peut être témoin d'une atteinte tumorale plus importante, et est ainsi liée à un pronostic plus sombre.

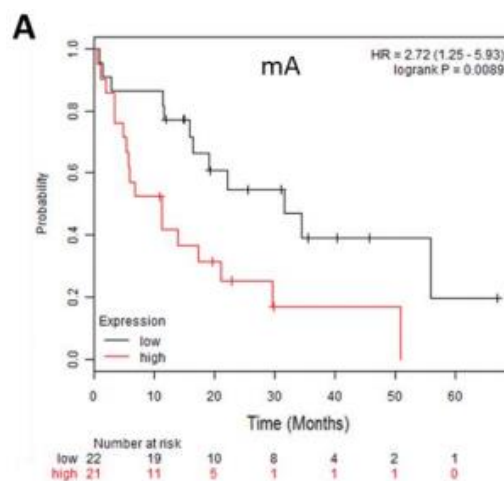
Figure 35 : Pourcentages de patients atteints de cancers colorectaux, gastro-oesophagiens, pancréatiques et mammaires sous forme localisée et métastatique présentant une quantité détectable d'ADNct (A). Quantité d'ADNct totale mesurée chez les patients atteints de cancers en fonction du stade d'avancement tumoral (C). (Bettegowda *et al.*, 2014).



Aussi, une augmentation de la quantité totale d'ADNcf et d'ADNct dans le sang a été associée à un moindre taux de survie globale. En effet, l'étude de Fujita *et al.* (2012) incluant 336 patientes atteintes de cancer du sein de stade I à II a montré par une analyse multivariée qu'une quantité plus importante d'ADNct était associée à une plus faible durée de survie sans maladie (HR = 2,7, IC95% = [1,5-4,9], p=0,001) et une plus faible durée de survie globale (HR = 4,0, IC95% = [1,6-10,1], p=0,003) comparativement aux patients présentant une quantité intermédiaire ou faible d'ADNct. La même équipe soutient des résultats comparables parmi des patientes atteintes de cancer du sein et recevant une chimiothérapie néoadjuvante (Fujita *et al.*, 2014). Toutefois, l'étude de Garcia-Murillas *et al.* (2015) n'a pas trouvé de valeur pronostique en termes de durée de survie sans maladie chez les patientes atteintes de cancer du sein peu avancé présentant une quantité d'ADNct détectable au moment du diagnostic (n=29) comparé à celles ne présentant pas de quantité détectable d'ADNct (n=13). De surcroît, l'analyse des mutations détectées sur l'ADNct des patients a montré que certaines mutations sont associées à un moins bon pronostic. Par exemple, l'essai clinique de phase III EFECT a analysé 227 échantillons de plasma de patientes atteintes de cancer du sein métastasé, et a montré que la détection initiale d'une mutation sur le gène ESR1 était significativement associée à une moindre durée de survie sans progression sous traitement à base d'exemestane ou fulvestrant (Turner *et al.*, 2019).

Une méta-analyse effectuée par Basnet *et al.* (2016) a montré que la détection d'ADNcf dans le plasma était associée à une survie sans récurrence moins longue (HR = 2.78, IC95% = [2.08–3.72]) ainsi qu'une plus courte survie globale (HR = 3.03, IC95% = [2.51–3.66]) chez les patients atteints de cancer colorectal, indépendamment du stade de la maladie, de la taille de la tumeur, des autres marqueurs tumoraux ainsi que de la méthode de dosage employée. Une autre étude concernant 97 patients atteints également de cancer colorectal métastatique, suivis durant 36 mois, a montré que la présence d'ADNcf était associée à une durée de survie significativement moins longue (18,07 mois contre 28,5 mois) (El Messaoudi *et al.*, 2016). De plus, d'autres paramètres dans cette étude étaient corrélés avec une durée de survie globale plus courte : le taux d'ADNct présentant des mutations ciblées, ainsi que le nombre de mutations retrouvées chez les patients, tel que le montre la figure 36. Cette observation quant à une survie globale plus courte chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique présentant un ADNcf détectable a également été confirmée par la méta-analyse menée par Fan *et al.* (2017).

Figure 36 : Courbe de Kaplan-Meier présentant les taux de survie globale en fonction de la quantité élevée (>3,06ng/mL, ligne rouge) ou faible (<3,6ng/mL, ligne noire) d'ADNct (mA) chez les patients atteints de cancer colorectal. (El Messaoudi *et al.*, 2016)



□ L'ADN circulant en tant que biomarqueur prédictif

La plupart des apports prédictifs de l'ADNct sont basés sur les mutations détectées, dont certaines permettent de prédire une résistance à un traitement. En effet, certains traitements ciblent des protéines, en général de surface, dont la mutation implique une résistance à ce traitement. La plupart de ces résistances sont prédites par le génotypage issu des biopsies tissulaires effectuées sur les tumeurs primaires et/ou métastatiques. La détection de ces mutations parmi l'ADN tumoral circulant laisse donc envisager la possibilité de prédire l'ensemble des résistances tumorales à l'aide d'un prélèvement bien moins invasif que les biopsies. Plusieurs études montrent une grande

concordance entre les mutations détectées au sein de l'ADNct et des biopsies de tumeurs (Murtaza *et al.*, 2013 ; Murtaza *et al.*, 2015).

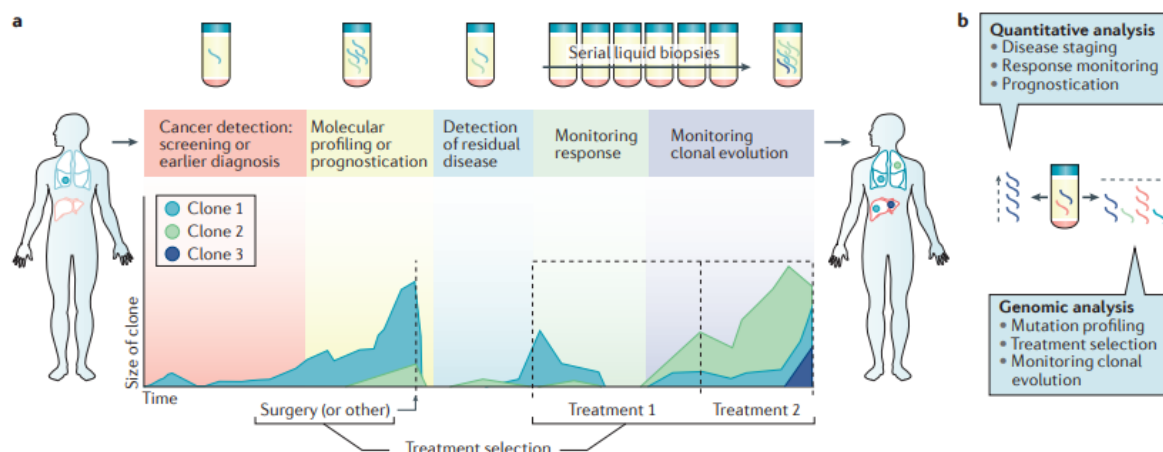
Par exemple, des études rétrospectives ont montré parmi de larges populations de patientes atteintes de cancer du sein métastasé que la réponse au traitement ciblant le récepteur HER2 était moins bonne lors de mutation au niveau du gène PI3K (hétérodimère impliqué dans la prolifération et croissance tumorale). Une récente méta-analyse rassemblant 247 patientes a montré que l'analyse de l'ADNcf permettait de diagnostiquer une mutation au niveau de PI3K avec une sensibilité de 86% et une spécificité de 98%, permettant de proposer l'analyse de l'ADNcf comme un outil fiable pour déterminer le statut PI3K des patientes atteintes de cancer du sein (Zhou *et al.*, 2016).

De la même manière, concernant le cancer colorectal, la thérapie basée sur des anticorps anti-EGFR est aujourd'hui un traitement standard de première intention. Elle ne peut toutefois être mise en place que chez les patients dont les cellules tumorales ne présentent pas de mutation sur les gènes KRAS et NRAS. Une étude prospective ColoBEAM menée par Harle *et al.* (2019) a montré une grande concordance concernant le statut de ces gènes entre la biopsie tumorale et l'ADNct, avec une précision de 89,3% (Se = 87,5%, Sp = 92%) chez les patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie. Cette étude confirme donc que l'ADNct peut être considéré comme marqueur substitutif du statut de mutation des cellules tumorales déterminé par biopsie tumorale.

□ L'ADN circulant en tant que biomarqueur pharmacodynamique

L'ADN circulant a montré différentes utilités très intéressantes pour le suivi des patients atteints de processus néoplasiques. Notamment, l'évolution de la quantité d'ADN circulant permet de suivre l'évolution de la charge tumorale et ainsi d'attester de l'efficacité ou non d'un traitement, et la détection précoce de récidives. D'autre part, comme précédemment indiqué, l'analyse de l'ADNct permet d'identifier l'hétérogénéité tumorale. Ainsi, le suivi de l'ADNct permet de suivre l'hétérogénéité tumorale, et d'identifier l'émergence ou la sélection d'un type cellulaire au cours d'un traitement (figure 37). Cette dernière indication est donc particulièrement importante dans le choix de traitements de seconde intention.

Figure 37 : Applications de l'analyse de l'ADNct dans la gestion de la maladie au cours du traitement. (Wan *et al.*, 2017)



Concernant le cancer du sein, Garcia-Murillas *et al.* (2015) montrent que chez 7 patientes parmi 37, de l'ADNct a pu être détecté entre deux et quatre semaines après chirurgie, et a été associé à un fort risque de récurrence (HR = 25,1, IC95% = [4-130]). Au cours du suivi, de l'ADNct a pu être détecté chez 12 patientes parmi 15 ayant connu une récurrence, et cette détection précédait la mise en évidence clinique de récurrence de 7,9 mois en moyenne. De plus, Dawson *et al.* (2013) ont montré que parmi 30 femmes atteintes de cancer du sein et présentant une anomalie génétique détectable par biopsie, 29 (97%) présentaient de l'ADNct détectable dans le plasma. Une augmentation du taux d'ADNct a reflété la progression de la maladie chez 17 parmi 19 femmes, et précédait en moyenne de 5 mois la mise en évidence de progression par imagerie. Cette étude montre également que la présence de cellules tumorales circulantes a été mise en évidence chez seulement 87% (27/30) des femmes, et une élévation du marqueur CA15-3 chez 78% (21/27) d'entre elles. De plus, les taux d'ADNct ont montré une variation dynamique plus importante et une meilleure corrélation avec les variations de la charge tumorale comparativement aux deux autres biomarqueurs.

Des observations semblables sont mises en évidence concernant le cancer colorectal. L'équipe de Tie *et al.* (2015) note qu'une diminution significative de la quantité d'ADNct était observée avant un second cycle de chimiothérapie et correspondait aux réponses objectivées par examen tomodensitométrique effectué à 8-10 semaines de traitement. Une forte réduction était associée à une plus longue survie sans progression, bien que cette association n'ait pas été significative. Une seconde étude du même auteur analysant 1046 échantillons plasmatiques chez 230 patients atteints de cancer colorectal de stade II, montre qu'une quantité détectable d'ADNct post-opératoire était associée à une plus faible durée de survie sans récurrence. Les auteurs concluent que la détection après résection chirurgicale de cancer colorectal de stade II permet de mettre en évidence la présence de maladie résiduelle et d'identifier les patients à haut risque de récurrence (Tie *et al.*, 2016). Garlan *et al.* (2017) ont également démontré que les patients présentant une diminution du taux d'ADNct après un premier ou un deuxième cycle de chimiothérapie montrent une meilleure réponse au traitement à travers des durées de survie sans progression et survie globale significativement plus longues que ceux ne présentant pas ou peu de diminution (survie sans

progression : 8.5 versus 2.4 mois: HR = 0,19, IC95% = [0,09–0,40], p < 0.0001 ; survie globale : 27.1 versus 11.2 mois : HR = 0,25, IC95% = [0.11–0.57], p < 0.001).

L'étude de Misale *et al.* (2012) a décrit l'apparition de la mutation du gène KRAS détectée au sein de l'ADNcf des patients atteints de cancer colorectal traités par des anticorps anti-EGFR 10 mois avant la détection de récurrence par les moyens d'imagerie. Une autre étude montre également que le génome des tumeurs colorectales s'adapte dynamiquement en fonction des thérapies mises en place (Siravegna *et al.*, 2015). Dans cette étude, cinq patients recevant une thérapie anti-EGFR ont montré l'émergence d'une mutation du gène KRAS dans l'ADN circulant, évoquant la possibilité d'apparition de clones cellulaires présentant une nouvelle mutation au niveau du site KRAS au cours du traitement. De plus, cette étude montre que la fréquence de cette mutation a diminué lorsque le traitement anti-EGFR fut suspendu et substitué par un second traitement de chimiothérapie, permettant par la suite la remise en place du traitement anti-EGFR. L'ensemble de ces données met en évidence que les différents cycles de traitements peuvent être ajustés en fonction des données issues de l'analyse de l'ADNct.

- *Rôles biomarqueurs de l'ADN circulant chez le chien*

- L'ADN circulant en tant que biomarqueur diagnostique

Un nombre restreint d'études a été réalisé concernant l'intérêt de l'ADN circulant en oncologie chez le chien.

Plusieurs études se sont intéressées à la variation de quantité d'ADNcf chez les chiens atteints de processus néoplasique. La plupart de ces études montrent une augmentation significative de la quantité d'ADNcf chez les patients atteints de processus néoplasique par rapport aux chiens sains (tableau 5).

Tableau 5 : Etudes montrant la différence de quantité d'ADNcf entre des groupes de chiens atteints de processus néoplasiques et des groupes de chiens sains.

Etude	Types tumoraux étudiés	Quantité d'ADNcf – Tumeurs	Quantité d'ADNcf – Sains	Valeur de p
Letendre et Goggs, (2017)	Sarcomes	8,1 µg/mL (5,1 – 15,8), n = 15	4,4 µg/mL (0,6 – 8,5), n = 15	0,003
Beffagna <i>et al.</i> , (2017)	Tumeurs mammaires	Fragments courts : 128,5 ng/mL (56,85 – 200,2) Fragments longs : 87,48 (33 – 142) n=44	Fragments courts : 28,8 ng/mL (6,5 – 51,1) Fragments longs : 18,25 (3,9 – 32,6) n=10	Fragments courts : p = 0,018 Fragments longs : p = 0,009
Tagawa <i>et al.</i> , (2019)	Différentes tumeurs malignes	6 290 ng/mL (51 – 11 500) n = 50	481 ng/mL (205 – 802) n = 11	0,011
Burnett <i>et al.</i> , (2016)	Différentes tumeurs	730 µg/L * n = 19	583 µg/L (550 - 610) n = 24	< 0,01
Schaefer <i>et al.</i> , (2007)	Néoplasies lymphoïdes	15,72 ng/mL** (0 – 91). n = 24	4 ng/mL (1 – 15) n = 40	< 0,0001

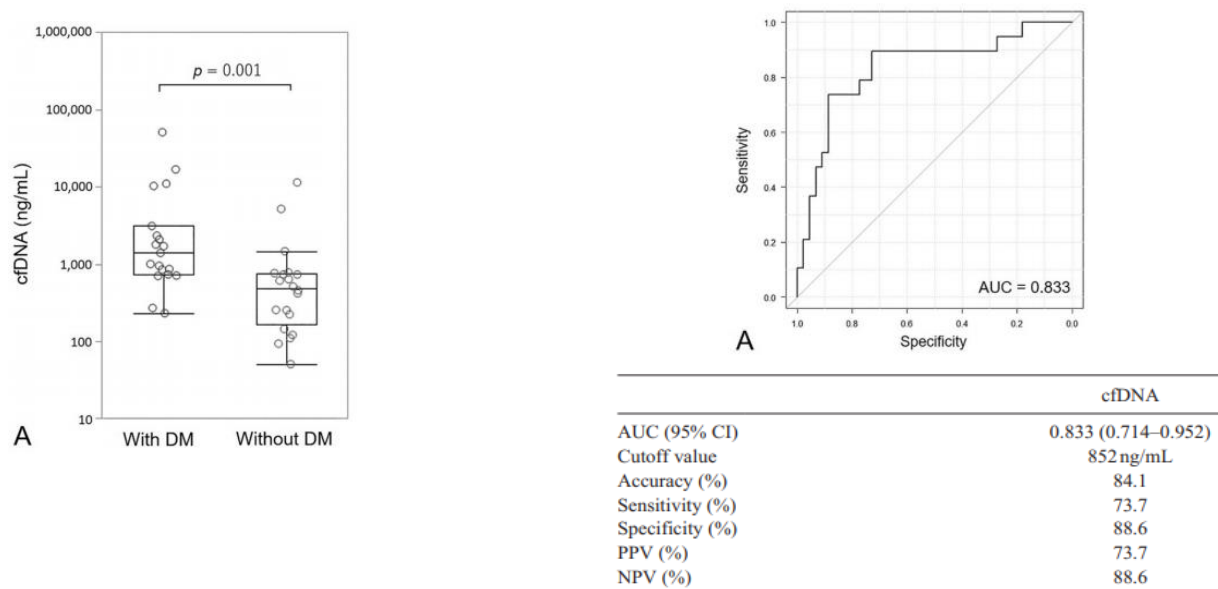
* Valeur approximative obtenue par lecture graphique, valeur exacte non fournie par l'étude.

** Valeur obtenue après application du facteur de multiplication fourni par l'étude entre la quantité d'ADNcf obtenue chez les individus sains et ceux atteints de processus néoplasiques lymphoïdes.

Ainsi, il existe plusieurs démonstrations de l'augmentation de la concentration plasmatique d'ADNcf chez les chiens atteints de processus néoplasiques. Outre cette observation, plusieurs données issues de ces études sont à noter : deux études incluant différents types de tumeurs soulèvent que les individus atteints de néoplasies lymphoïdes montrent une quantité d'ADNcf plasmatique significativement plus importante que les autres types d'atteintes néoplasiques (Schaefer *et al.*, 2007 ; Tagawa *et al.*, 2019). De plus, les lésions néoplasiques malignes montrent une quantité plasmatique d'ADNcf significativement supérieure (Tagawa *et al.*, 2019), ou un index d'intégrité (rapport entre le nombre de fragments longs et courts d'ADNcf) significativement inférieur (Beffagna *et al.*, 2017 ; Tagawa *et al.*, 2019) aux valeurs obtenues chez les chiens présentant des tumeurs bénignes.

Aussi, l'étude de Tagawa *et al.* (2019) montre que la quantité d'ADNcf plasmatique est corrélée avec le stade clinique ; une augmentation significative (p<0,001) de cette quantité est notée chez les individus présentant une atteinte métastatique par rapport aux chiens ne présentant pas de métastase (figure 38), permettant d'obtenir une aire sous la courbe ROC égale à 0,833 pour la performance de la quantité plasmatique d'ADNcf à diagnostiquer une atteinte métastasée (figure 38).

Figure 38 : Diagramme (à gauche) montrant la concentration plasmatique d'ADNcf chez les chiens présentant un cancer métastasé (With DM) et non métastasé (Without DM). Courbe ROC (à droite) montrant les capacités diagnostiques de la concentration plasmatique d'ADNcf à détecter la présence de métastases chez les chiens présentant une atteinte néoplasique maligne. (Tagawa *et al.*, 2019)



Il est toutefois à noter que certaines études ne consolident pas ces résultats. En effet, l'étude de Schaefer *et al.* (2007) précédemment citée, conclut à une absence de différence significative entre les quantités d'ADNcf plasmatique des chiens sains et de ceux atteints de sarcomes, carcinomes et autres tumeurs. L'étude menée par Letendre et Goggs (2017) également précédemment citée a mesuré la quantité d'ADNcf plasmatique par deux techniques différentes. Bien qu'une des deux techniques ait montré une différence significative entre les individus sains et atteints (cf Tableau 5), cette différence ne fut pas observée par l'autre technique employée, ni par aucune des deux techniques après une étape de purification de l'ADN. Enfin, l'étude de Lee *et al.* (2019) a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre la quantité d'ADNcf des chiens sains et celle de chiens atteints de tumeurs mammaires. Ces divergences de résultats poussent un certain nombre de ces auteurs à proposer une étude impliquant un nombre plus important de chiens. Il est par ailleurs possible d'observer des différences d'ordre de grandeur importantes entre les résultats exprimés par les différentes études ; cela étant principalement dû aux techniques employées. Une harmonisation des techniques est donc proposée par plusieurs auteurs dans le but de permettre une comparaison fiable des résultats.

Enfin, trois études comparent la concentration plasmatique d'ADNcf entre les chiens atteints de processus néoplasique et ceux atteints de pathologies non néoplasiques (Burnett *et al.*, 2016 ; Letendre et Goggs, 2017 ; Beffagna *et al.*, 2017). Aucune des trois études ne montre de différence significative entre ces deux populations. Cela relève un défaut de spécificité de l'ADNcf en tant que biomarqueur diagnostique d'atteinte néoplasique. Ainsi, d'éventuelles pathologies non néoplasiques

d'un individu devront être prises en compte par le clinicien dans l'interprétation de la concentration plasmatique d'ADNcf à visée diagnostique en oncologie.

Quelques études se sont également intéressées à la détection spécifique d'ADNct. En 2013, une première étude a pratiqué le séquençage complet du génome tumoral de quatre chiens atteints de tumeurs mammaires (Beck *et al.*, 2013). En se basant sur les réarrangements génétiques observés au sein des tumeurs, les auteurs ont pu détecter chez les quatre chiens (100%) de l'ADN circulant présentant ces mêmes réarrangements, soit l'ADN circulant tumoral. Les fractions d'ADNct parmi l'ADNcf chez chacun des quatre chiens (non opérés ni sous traitement) étaient égales à 1%, 10%, 11% et 24%.

Tagawa *et al.* (2020) se sont intéressés à la mutation du gène BRAF chez les chiens atteints de carcinomes urothéliaux. En effet, il a été montré que près de 80% de ces tumeurs chez le chien présentent une mutation au niveau de ce gène (Mochizuki *et al.*, 2015 ; Decker *et al.*, 2015), dont la mutation produit l'activation d'une voie de signalisation (MAPK) induisant une prolifération et une différenciation cellulaires anormales. Cette étude a sélectionné 15 chiens présentant un carcinome urothélial, et par analyse des biopsies tumorales, 11 de ces 15 chiens (73,3%) présentaient la mutation BARF V595E au sein de la tumeur. L'analyse de l'ADNcf a montré que cette mutation fut initialement détectable chez neuf de ces 11 chiens (81,8%), et détectable ultérieurement au cours de la progression de la maladie chez les chiens restants. La concentration d'ADNct plasmatique était significativement supérieure chez les chiens présentant la mutation BRAF par rapport aux chiens présentant l'allèle sauvage (respectivement 14.05 ± 13.51 ng/ml *versus* 0.21 ± 0.41 ng/ml, $p = 0.031$). Ainsi, les auteurs suggèrent que la quantité d'ADNct présentant la mutation BRAF pourrait représenter un biomarqueur diagnostique non invasif utile lors de carcinome urothélial présentant lui-même cette mutation.

Les longs éléments nucléaires intercalés (LINE, *long interspersed nuclear elements*) font partie des séquences répétées dispersées au sein de l'ADN, capables de se dupliquer et de s'insérer à d'autres sites dans le génome. Leur expression est régulée notamment par leur niveau de méthylation, et l'hypométhylation de ces séquences est associée à l'oncogenèse et à la formation de métastases (Hur *et al.*, 2014 ; Lavasanifar *et al.*, 2019). Ainsi, Lee *et al.* (2019) ont étudié l'hypométhylation des séquences LINE-1 parmi l'ADNcf chez des chiens sains ($n = 11$), des chiens atteints de tumeurs mammaires malignes ($n = 19$), bénignes ($n = 15$), et d'autres types de cancers ($n = 11$). Cette étude a mis en évidence que l'indice du niveau relatif de méthylation des séquences LINE-1 de l'ADNcf est significativement réduit ($p < 0,001$) chez les chiens présentant des tumeurs mammaires bénignes et malignes (respectivement 0.29 ± 0.061 et 0.39 ± 0.066) par rapport aux chiens sains (0.92 ± 0.067). Toutefois, cette diminution était moins importante concernant les autres types de tumeurs (figure 39). Les auteurs suggèrent donc que l'indice de méthylation des séquences LINE-1 parmi l'ADNcf pourrait être un biomarqueur diagnostique de tumeurs mammaires chez le chien. En effet, ces différences significatives ont permis de générer des courbes ROC concernant les performances de l'indice de méthylation des séquences LINE-1 à distinguer les chiens sains des chiens atteints de tumeurs mammaires bénignes d'une part et malignes d'autre part, dont les aires sont toutes deux supérieures à 0,9 (figure 40).

Figure 40 : Diagramme en boîte représentant l'indice de méthylation des séquences LINE-1 au sein de l'ADNcf chez des chiens sains (Healthy), atteints de tumeurs mammaires bénignes (Benign), malignes (Malignant) et d'autres types tumoraux (Other). (Lee *et al.*, 2019)

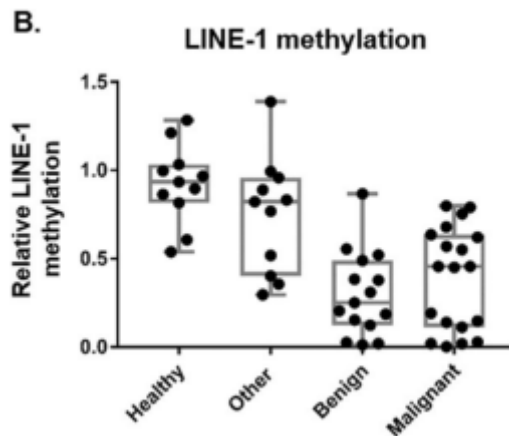
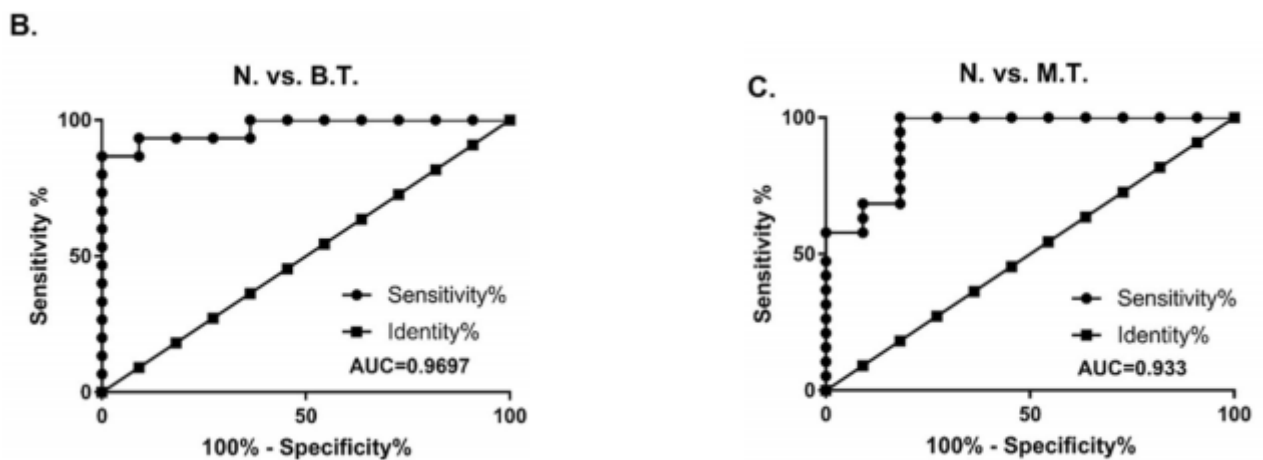


Figure 39 : Courbes ROC de l'indice de méthylation des séquences LINE-1 contenues dans l'ADNcf des chiens distinguant les chiens sains des chiens atteints de tumeurs mammaires bénignes (B) et malignes (C).



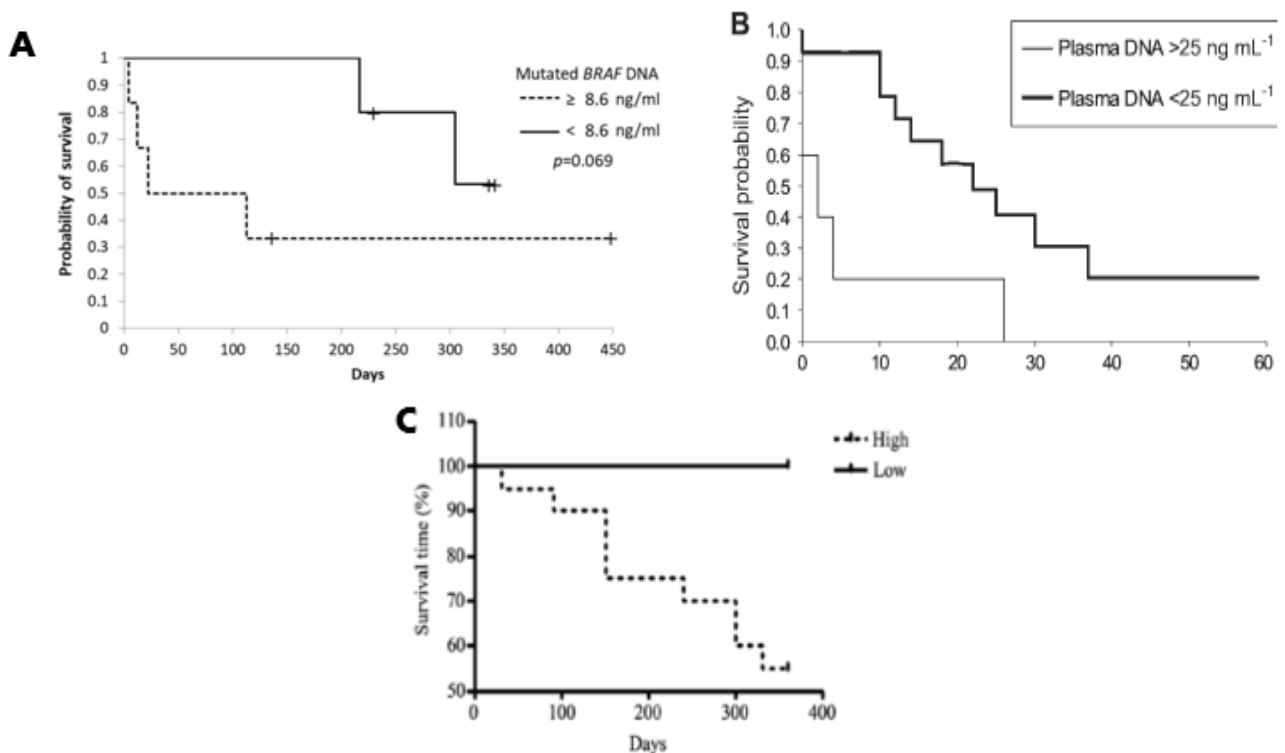
□ L'ADN circulant en tant que biomarqueur pronostique

L'impact pronostique de l'ADN circulant a été investigué chez le chien par trois études. La première effectuée par Schaefer *et al.* (2007) a montré que chez les chiens atteints de cancers lymphoïdes (n = 19, 16 lymphomes et 3 leucémies), les individus présentant une concentration d'ADNcf supérieure à 25 ng/mL avaient une durée de rémission significativement inférieure à celle des individus présentant une concentration d'ADNcf inférieure à 25 ng/mL lors de traitement par chimiothérapie (temps de survie en rémission médian respectivement égal à 3 semaines et 23 semaines, p = 0,0116) (figure 41B).

L'étude menée par Gelaleti *et al.* (2014) a porté sur le nombre de petites séquences nucléaires intercalées spécifiques des carnivores (CAN SINEs, carnivore-specific Short interspersed nuclear elements) dans le plasma de 28 femelles atteintes de tumeurs mammaires. En considérant 1 913 200 copies par μL comme valeur seuil, les chiennes présentant une concentration élevée de copies connaissaient un taux de survie global significativement moins élevé que celles présentant une faible concentration de copies (OR = 0.1, IC 95% = 0.46-0.87, p=0.03) (figure 41C).

Enfin, bien qu'une différence significative ne fût pas atteinte, l'étude de Tagawa *et al.* (2020) a montré que parmi les 11 chiens atteints de carcinome urothélial présentant une quantité initialement détectable d'ADNct avec la mutation BRAF, une concentration supérieure ou égale à 8,6 ng/mL (n = 5) d'ADNct était associée à une médiane de survie plus faible que lorsqu'une concentration initiale inférieure à 8,6 ng/mL (n = 6) était enregistrée (respectivement 305 *versus* 67.5 jours, p = 0.069) (figure 41A).

Figure 41 : Courbes de Kaplan-Meier étudiant les taux de survie des chiens atteints de processus tumoral en fonction de la concentration d'ADNcf ou d'ADNct.



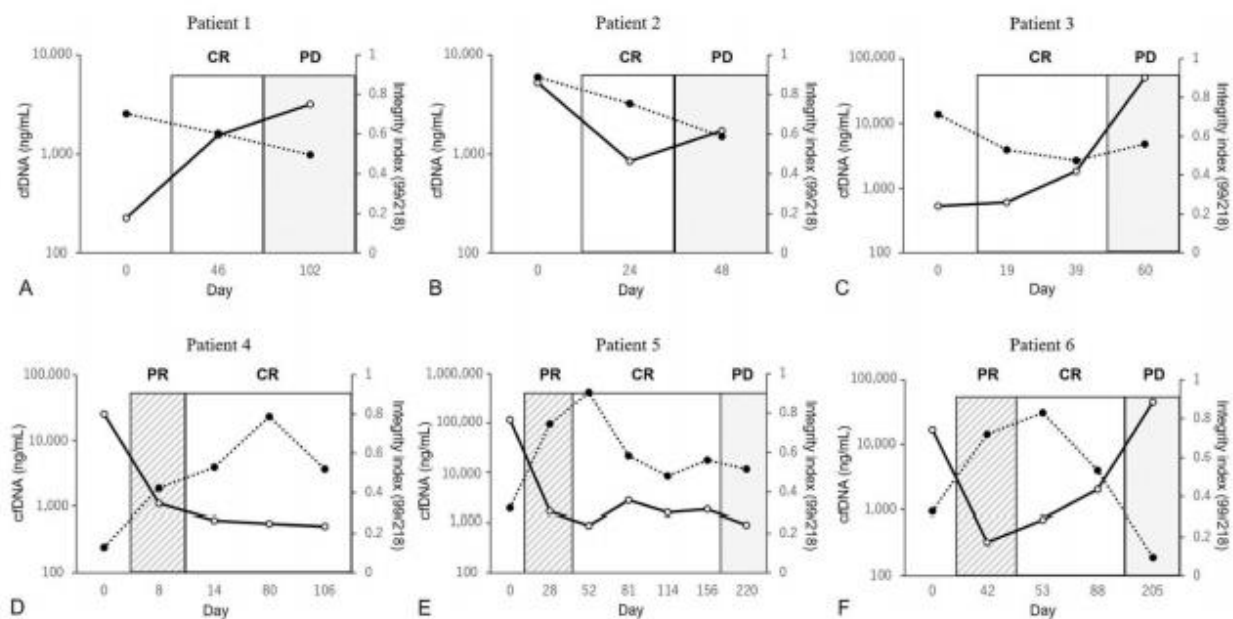
Ainsi, ces trois premières études montrent que l'ADNcf et l'ADNct semblent présenter un intérêt en tant que biomarqueur pronostique chez le chien atteint de processus néoplasique.

□ L'ADN circulant en tant que biomarqueur pharmacodynamique

L'intérêt de l'ADN circulant en tant que biomarqueur de suivi et pharmacodynamique a été investigué également par trois études. Un premier suivi de la concentration d'ADNct a été mené en 2013 par Beck *et al.* sur une chienne atteinte de tumeur mammaire. Ils ont pu mettre en évidence que la fraction d'ADNct parmi l'ADNcf avant chirurgie d'exérèse était de 10%, puis a diminué pour atteindre 5% lors de la 83^e semaine post-chirurgie, et 4,2% lors de la 89^e semaine. Les auteurs ont par ailleurs mis en évidence chez cette chienne la présence d'une métastase pulmonaire par examen tomodensitométrique lors de la 89^e semaine, et supposent que la fraction d'ADNct observée correspondait à la fraction d'ADNct résiduelle émise par cette lésion métastatique (Beck *et al.*, 2013).

Tagawa *et al.* (2019) ont effectué dans leur étude, un suivi de la concentration plasmatique et de l'index d'intégrité de l'ADNcf chez six chiens atteints de processus néoplasiques divers (un carcinome urothélial, un hémangiosarcome splénique, un sarcome indifférencié, une leucémie, et deux lymphomes) jusqu'à plus de 200 jours. Chez plusieurs patients, la concentration d'ADNcf a augmenté avec la progression des lésions métastatiques ou des récives tumorales, tandis que l'indice d'intégrité avait tendance à diminuer en fonction de la progression de la tumeur, ce changement étant inversement proportionnel aux changements de la concentration de ADNcf (figure 42). De plus, des fluctuations de l'ADNcf obtenues auprès de plusieurs patients ont été observées plusieurs semaines à plusieurs mois avant l'observation clinique d'une progression de la maladie.

Figure 42 : Evolution de la concentration (ligne continue) et de l'indice d'intégrité (ligne en pointillés) de l'ADNcf selon la réponse au traitement en fonction du temps (en jours). (Tagawa *et al.*, 2019)

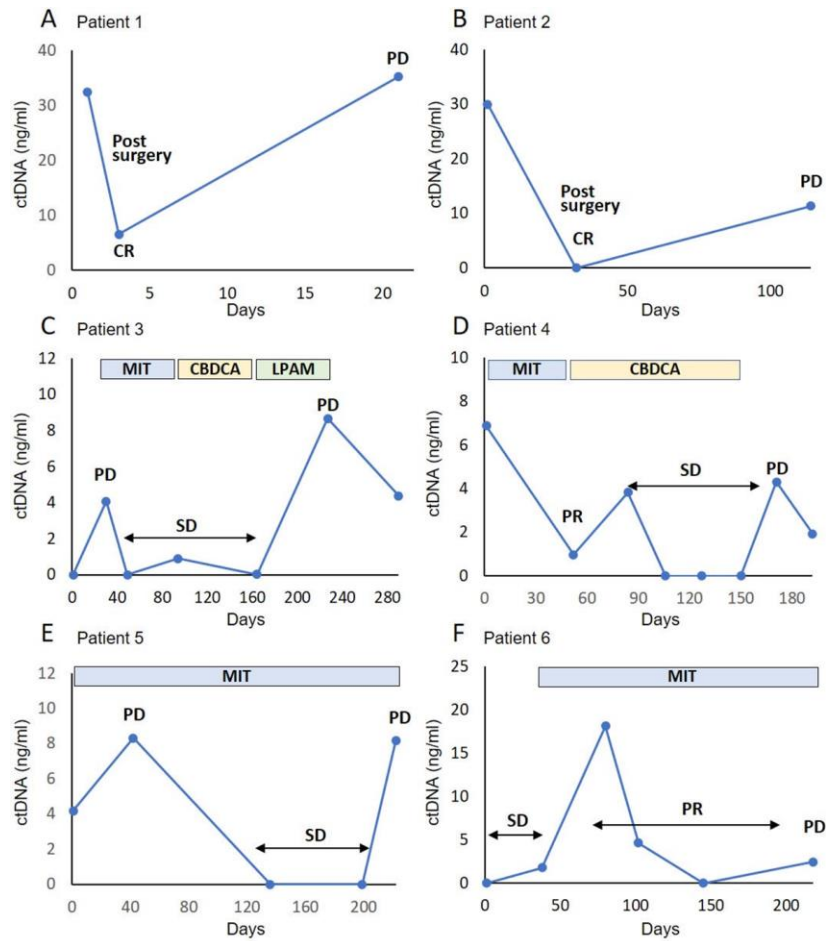


L'axe verticale à gauche représente la concentration en ADNcf plasmatique en ng/mL, et l'axe verticale à droite représente l'indice d'intégrité de l'ADNcf.

Patient 1 : carcinome transitionnel de la vessie traité par chirurgie et inhibiteur de la cyclo-oxygénase-2. Patient 2 : sarcome indifférencié traité par chirurgie. Patient 3 : hémangiosarcome splénique traité par chirurgie et chimiothérapie. Patient 6 : Leucémie traitée par chimiothérapie. CR = réponse complète, PD = maladie progressive, PR = réponse

Tagawa *et al.* (2020) ont effectué dans leur étude un suivi de la concentration plasmatique d'ADNct (contenant la mutation BRAF V595E) chez six chiens atteints de carcinome urothélial et traités par un inhibiteur de la cyclooxygénase 2 associé ou non à une chirurgie ou un traitement de chimiothérapie. Les auteurs ont observé que les niveaux d'ADNct dans le plasma étaient approximativement corrélés avec la réponse au traitement chez plusieurs chiens, suggérant que le niveau d'ADNct pourrait être utile en tant que biomarqueur pharmacodynamique (figure 43). Toutefois, cette corrélation n'était pas observée chez certains animaux. En raison du faible nombre d'animaux observés, les auteurs suggèrent que des études de suivi incluant un nombre important de chiens soient menées pour émettre une conclusion fiable quant au rôle de l'ADNct en tant que biomarqueur de suivi.

Figure 43 : Evolution de la concentration plasmatique d'ADNct incluant la mutation BRAF V595E chez six chiens atteints de carcinome urothélial en fonction de la réponse au traitement au cours du temps (en jours). (Tagawa et al. 2020)



Taux d'ADNct mesuré à différents moments chez six chiens atteints de carcinome urothélial. L'axe vertical représente la concentration d'ADNct et l'axe horizontal représente le temps en jours. Tous les patients ont reçu des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase-2 par voie orale pendant le traitement. CR = réponse complète, SD = maladie stable, PD = maladie progressive, PR = réponse partielle, MIT = mitoxantrone, CBDCA = carboplatine, LPAM = Melphalan.

En conclusion, de nombreuses études chez l'Homme ont montré l'intérêt majeur de l'ADN circulant en tant que biomarqueur diagnostique, pronostique et de suivi chez les patients atteints de processus néoplasique. Les études, bien moins nombreuses, chez le chien semblent montrer des résultats similaires. Toutefois, des études incluant un nombre de chiens plus important sont nécessaires pour établir des résultats fiables et être intégrés à la pratique clinique en oncologie. Les avantages de l'ADN circulant sont nombreux ; son étude est non invasive, semble fiable pour détecter un processus tumoral de manière sensible et spécifique, et elle permet de caractériser correctement l'ensemble du processus tumoral d'un individu. L'ADN circulant pourrait donc être un outil performant au service d'une médecine personnalisée.

b. Les acides ribonucléiques (ARN) circulants

Les principaux ARN circulants sont les micro-ARN (miARN). Il s'agit d'une classe d'ARN très conservée dans l'évolution, courts (en moyenne 19 à 23 nucléotides), simples brins, exprimés de manière endogène, et non codants. Ils agissent comme régulateurs post-transcriptionnels, en se basant sur le principe de correspondance partielle ou complète avec l'ARNm complémentaire. Lorsqu'un miARN interagit avec l'ARNm, la traduction de ce dernier sera alors inhibée, induisant sa dégradation. L'expression d'un gène peut être régulée par plusieurs miARN, et inversement, un seul miARN peut réguler l'expression de plusieurs gènes du fait de la complémentarité souvent partielle entre les deux brins d'ARN. A ce jour, plusieurs milliers de miARN ont été identifiés chez l'Homme (Dong *et al.*, 2013). Leurs implications dans le domaine de l'oncologie en médecine humaine ont été grandement étudiées ces dernières années. De plus, les miARN pouvant être mesurés dans le sang des patients, cette classe de biomarqueurs s'inscrit dans le concept de biopsie liquide.

- ***Les miARN chez l'Homme***

Un intérêt grandissant en oncologie chez l'Homme est porté dans le domaine des miARN, étudiés dans de nombreux types de cancers en tant que biomarqueurs diagnostiques, pronostiques, prédictifs et de suivi. Il est possible de citer, de manière non exhaustive, le mélanome, le cancer des poumons, du sein, de la vessie, de la prostate, du colon et du col de l'utérus (McGuire *et al.*, 2015 ; Fabris *et al.*, 2016 ; Huber *et al.*, 2018 ; Tölle *et al.*, 2018 ; Müller *et al.*, 2020). Ainsi, plusieurs milliers d'études sont publiées chaque année sur ce sujet depuis plus d'une décennie, et plus de 2654 miARN ont été identifiés à ce jour chez l'Homme d'après le registre miRBase22 (www.mirbase.org). A titre d'exemple, cette partie détaillera particulièrement les intérêts potentiels des miARN en tant que biomarqueurs mis en évidence dans les cancers du poumon et du sein.

Bien que de nombreuses études se soient focalisées sur certains miARN individuellement, leurs performances en termes de sensibilité et de spécificité sont nettement moindres comparativement à la combinaison de différents panels composés de plusieurs miARN (H. Wang *et al.*, 2015).

- **Les miARN en tant que biomarqueurs diagnostiques des tumeurs mammaires et pulmonaires chez l'Homme**

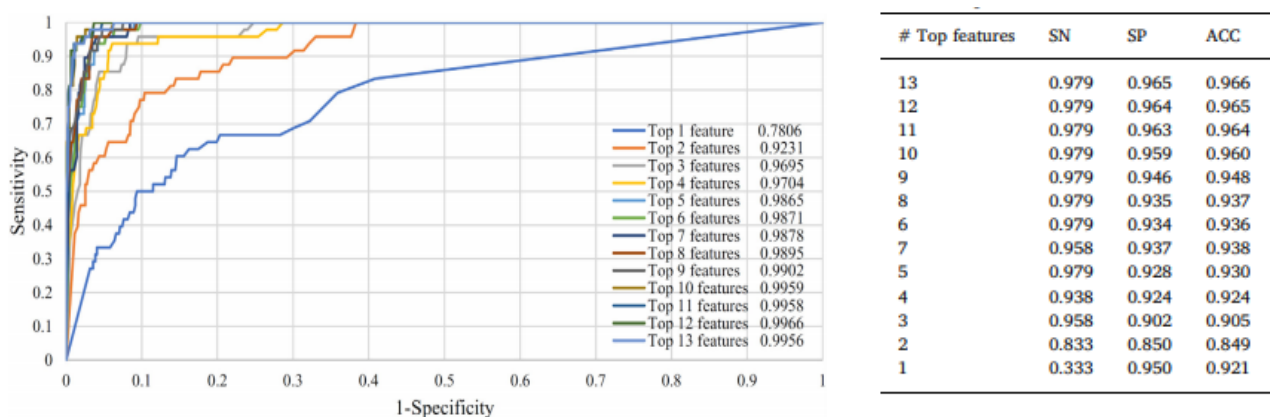
Le miARN-21 est l'un des plus étudiés en oncologie humaine, puisqu'il est trouvé surexprimé dans la majorité des tumeurs solides. Il favorise notamment la prolifération et la migration cellulaire, et inhibe l'apoptose. Dans une étude comparant 23 sujets atteints de tumeur pulmonaire non à petites cellules (TPNPC) et 17 sujets sains, une augmentation significative de la concentration plasmatique en miARN-21 a été notée chez les individus malades, permettant de diagnostiquer la

présence d'une tumeur pulmonaire avec une sensibilité égale à 70%, et une spécificité égale à 100% (Xie *et al.*, 2010).

Plusieurs études se sont intéressées à définir les capacités diagnostiques des miARN lors de tumeurs pulmonaires au stade le plus précoce possible, détectée par examen tomodensitométrique effectué chez des patients asymptomatiques et gros consommateurs de tabac. En effet, une première étude effectuée par Bianchi *et al.* (2011) évalue le potentiel d'un panel de 34 miARN en tant que biomarqueur diagnostique chez des sujets atteints de TPNPC asymptomatiques, dont l'atteinte fut découverte par examen tomodensitométrique lors d'une étude précédemment effectuée chez des patients asymptomatiques à haut risque de développer une TPNPC. Cette étude montre que ce panel de 34 miARN permet de distinguer les patients atteints (n = 32) des patients sains (n = 30) avec une précision de 80% (ASC = 0,89, sensibilité = 71%, spécificité = 90%). Il est intéressant de noter que cette étude s'est concentrée majoritairement sur des patients atteints en stade précoce, la précision de ce test pour distinguer les sujets atteints en stade I uniquement des sujets sains était estimée à 77% (ASC = 0,89, sensibilité = 59%, spécificité = 90%), ce qui montre une performance diagnostique au stade le plus précoce non négligeable.

Les résultats les plus importants en termes de performances diagnostiques ont été publiés récemment par l'étude de Zhang *et al.* (2020), incluant 48 sujets asymptomatiques diagnostiqués par examen tomodensitométrique comme atteints de TPNPC en stade précoce et 984 individus contrôles. Ces travaux montrent qu'un panel de 13 miARN a permis d'identifier les individus malades des individus sains avec une précision de 96,6% (ASC = 99,56%, sensibilité = 97,9% et spécificité = 96,5%). Cette étude montre également que chaque ajout d'un miARN au panel des miARN montrant les meilleures capacités à distinguer les individus malades et sains étudié permet d'accroître les performances diagnostiques (figure 44).

Figure 44 : Courbes ROC et détail des capacités diagnostiques des panels de miARN composés des 1 à 13 miARN montrant les meilleures capacités à distinguer les individus malades et sains



D'autre part, dans le but de montrer la spécificité des miARN à distinguer une atteinte cancéreuse pulmonaire précoce d'autres atteintes pulmonaires non cancéreuses, l'équipe de Shen *et al.* (2011) a étudié 65 patients asymptomatiques chez qui la présence un nodule solide pulmonaire a été détectée lors d'un examen tomodensitométrique de contrôle, dont 33 nodules malins et 32 nodules bénins. Le panel composé des miARN-21, miARN-210 et miARN-486 dosé dans le plasma des individus inclus a permis de distinguer les nodules bénins des nodules malins avec une sensibilité égale à 76,32% et une spécificité égale à 85%.

Concernant les patientes atteintes de cancer du sein, de nombreuses études proposent des panels de miARN permettant d'obtenir des valeurs correctes de performances diagnostiques. L'étude menée par Shimomura *et al.* (2016) inclut 1280 patientes atteintes de cancers du sein, 2836 patients sains, 451 patients atteints d'autres types de cancer, et 63 patients atteints de maladies bénignes non mammaires. Un panel de 5 miARN : miARN-1246, miARN-1307-3p, miARN-4634, miARN-6861-5p et miARN-6875-5p a permis d'identifier les patientes atteintes de cancer du sein des autres groupes étudiés avec une précision évaluée à 89,7%, une sensibilité égale à 97,3% et une spécificité égale à 82,9%. Il est toutefois à noter que la majorité des faux positifs ont été obtenus chez les individus présentant d'autres types de cancers (33/100 cancers pancréatiques, 42/98 cancers du tractus biliaire, 29/50 cancers du côlon, 23/50 cancers de l'estomac, 33/50 cancers de l'œsophage, 10/52 cancers du foie et 4/51 cancer de la prostate). Cela montre qu'un résultat positif concernant ce panel de miARN reste relativement spécifique d'une atteinte tumorale, toutefois il faut donc prendre en compte que d'autres atteintes tumorales que le cancer du sein, peuvent induire un résultat positif.

L'étude menée par Heneghan *et al.* (2010), incluant 163 patients atteints de différents types de cancer (mélanome, cancer du sein, de la prostate, du rein et du colon) et 63 patients sains, a montré qu'une augmentation du miARN-195 seul permettait de distinguer les patientes atteintes du cancer du sein des autres types de cancers et des patients sains avec une sensibilité égale à 88% et une spécificité égale à 91%. De plus, le panel composé des miARN-195, miARN-155 et let-7a permettait d'augmenter cette sensibilité à 94%.

De nombreuses autres études ont montré que différents miARN, et de manière plus importante plusieurs panels de miARN différents, montrent de bonnes capacités diagnostiques des cancers du sein chez la femme (Hamam *et al.*, 2017). De plus, plusieurs études montrent le potentiel des miARN en tant que biomarqueurs diagnostiques d'atteinte métastatique (McGuire *et al.*, 2015 ; Hamam *et al.*, 2017).

Ainsi, les miARN montrent de très bonnes performances diagnostiques dans le domaine de l'oncologie, applicables à de nombreux types de cancers. Néanmoins, l'une des limites potentielles principales des miARN est que leur spécificité n'est pas parfaite. En effet, il est à noter d'une part que certains miARN ont été montrés comme biomarqueurs significativement augmentés ou diminués pour plusieurs atteintes néoplasiques différentes, tels que le miARN-21, identifié comme significativement augmenté pour 16 différents types de cancers (K. Wu *et al.*, 2015). D'autre part, la revue publiée par Haider *et al.* (2014) montre que six miARN souvent reportés comme biomarqueurs pour certaines atteintes néoplasiques sont aussi significativement associés à plus de dix pathologies non néoplasiques.

- Les miARN en tant que biomarqueurs pronostiques des tumeurs mammaires et pulmonaires chez l'Homme

Tout comme le potentiel diagnostique des miARN dans le cas de tumeurs mammaires, le potentiel biomarqueur pronostique a également beaucoup été étudié pour ce type tumoral. Plusieurs panels de cinq miARN (miARN-10b-5p, miARN-145-5p, miARN-148b-3p, miARN-425-5p miARN-652-3p) ou encore de quatre miARN (miARN-18b, miARN-103, miARN-107 et miARN-652 ; miARN-18b miARN-103 miARN-107 et miARN-652) ont montré un intérêt significatif en termes de pronostique sur la survie globale et de risque de récurrence (Kleivi Sahlberg *et al.*, 2015 ; Bertoli *et al.*, 2015 ; Hamam *et al.*, 2017).

De nombreuses études ont également évalué les miARN en tant que biomarqueur pronostique lors de cancer pulmonaire, tel qu'exposé dans le tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6 : miARN circulants associés à une valeur pronostique chez les patients atteints de TPNPC (adapté de Müller *et al.*, 2020)

miARN	Niveau d'expression du miARN	Valeur pronostique observée	Type d'échantillon	Référence
<i>Let-7</i>	Sous-exprimé	Mauvais pronostic de survie globale	Plasma	Yu <i>et al.</i> (2008)
<i>miARN-16</i>	Sur-exprimé	Meilleur pronostic de survie globale	Plasma	Wang <i>et al.</i> (2013)
<i>miARN-17-5</i>	Sur-exprimé	Mauvais pronostic de survie globale	Plasma	Chen <i>et al.</i> (2013)
<i>miARN-19</i>	Sur-exprimé	Mauvais pronostic de survie globale	Plasma	Lin <i>et al.</i> (2013)
<i>miARN-21</i>	Sur-exprimé	Mauvais pronostic de survie globale	Plasma	Robles <i>et al.</i> (2015)
<i>miARN-137</i>	Sur-exprimé	Mauvais pronostic de survie globale	Plasma	Yu <i>et al.</i> (2008)
<i>miARN-126</i>	Sous-exprimé	Plus grand risque de progression	Plasma	Sanfiorenzo <i>et al.</i> (2013)

<i>miARN-155</i>	Sur-exprimé	Plus grand risque de progression	Plasma	Sanfiorenzo <i>et al.</i> (2013)
<i>miARN-486</i>	Sous-exprimé	Plus grand risque de récurrence	Plasma	Lin <i>et al.</i> (2013)

□ Les miARN en tant que biomarqueurs prédictifs des tumeurs mammaires et pulmonaires chez l'Homme

Les miARN ont fait l'objet de plusieurs recherches notamment pour leur potentiel apport prédictif quant à la sensibilité des processus tumoraux aux différents traitements possibles. En effet, connaître au moment du diagnostic la sensibilité ou le manque de sensibilité d'une tumeur à certains agents médicamenteux serait un atout majeur dans la prise en charge idéale de chaque patient.

Chez les patients présentant des tumeurs pulmonaires localisées, une radiothérapie à haute dose permet d'obtenir de bons résultats, avec une durée de survie globale et sans récurrences augmentées. Ainsi, des études cliniques ont été menées pour déterminer avec précision l'intérêt de la radiothérapie chez les patients atteints, améliorer la sélection de ces derniers et réduire les effets secondaires dus aux rayons. L'étude de Chen *et al.* (2016) montre qu'une augmentation initiale de la concentration d'un panel de quatre miARN (miARN-98-5p, miARN-302e, miARN-495-3p et le miARN-613) permet de distinguer les individus ayant une réponse complète ou partielle à la radiothérapie des individus présentant une maladie stable ou progressive. Cette étude est rejointe par le travail de Sun *et al.* (2018), étudiant un panel de 11 miARN associé à différents paramètres cliniques (dose ionisante, chimiothérapie adjuvante, âge, stade de la maladie). Cette combinaison a permis de distinguer les individus ayant répondu à la radiothérapie de ceux n'ayant pas répondu.

De la même manière, plusieurs études montrent que différents miARN seuls ou panels de miARN permettent de prédire les individus sensibles ou non aux différentes molécules de chimiothérapie. Par exemple, une augmentation significative des miARN-21, -210 et -125b indépendamment étudiés a été observée chez les individus atteints de TPNPC montrant une résistance à la cisplatine (Gao *et al.*, 2012 ; Cui *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2013). À l'inverse, une augmentation de la concentration sanguine du panel composé des miARN-21, 25, 27b et -326 était significativement associée au groupe d'individus atteints de TPNPC ne répondant pas à un protocole de chimiothérapie à base de cisplatine et pemetrexed et présentant une durée de survie sans progression de la maladie significativement moins importante. Il a également été montré que le niveau d'expression du miARN-21 était significativement différent entre les individus atteints d'adénocarcinomes pulmonaires présentant une mutation concernant le gène EGFR, et permettait ainsi de prédire le caractère répondant ou non des tumeurs à un traitement à base de gefitinib (inhibiteur de la tyrosine kinase) (Shen *et al.*, 2013).

Plusieurs études ont également investigué le potentiel prédictif des miARN chez les femmes atteintes de cancers du sein ces dernières années. Il a été montré qu'une concentration sanguine initiale élevée de miARN-210 était significativement associée aux patientes présentant une maladie résiduelle après une chimiothérapie à base de trastuzumab comparativement aux patientes présentant une réponse complète (Eun-Jung *et al.*, 2012). Dans le même sens, plusieurs miARN ont montré des concentrations sériques ou plasmatiques avant traitement significativement différentes entre les individus présentant une réponse au traitement, et ceux présentant une chimiorésistance, et ce concernant plusieurs molécules de chimiothérapie différentes. Il est possible de citer entre autres les miARN-122, miARN-375, miARN-125b, miARN-221 (Hamam *et al.*, 2017 ; Nassar *et al.*, 2017).

Ainsi, de nombreux résultats évoquent les miARN comme biomarqueurs sanguins indépendants montrant un grand potentiel dans la prédiction de réponse à différents protocoles de traitement, et permettraient ainsi une prise en charge plus précise et mieux ciblée des patients atteints.

□ Les miARN en tant que biomarqueurs de suivi des tumeurs mammaires et pulmonaires chez l'Homme

Plusieurs études ont permis de montrer le caractère dynamique des concentrations sanguine des miARN au cours du traitement, montrant jusqu'à plusieurs centaines de miARN dont la concentration fut significativement augmentée ou diminuée après traitement chirurgical ou de chimiothérapie lors de tumeurs mammaires chez la femme (Sochor *et al.*, 2014 ; Khalighfard *et al.*, 2018 ; Kahraman *et al.*, 2018) ou de tumeurs pulmonaires chez l'Homme (Leidinger *et al.*, 2012). Ces observations permettent aux auteurs de nombreuses études de proposer les miARN comme outil biomarqueur de suivi des patients sous traitement, pour attester de l'efficacité ou non de ce dernier. Toutefois, peu d'études sont disponibles à l'heure actuelle concernant les miARN montrant une évolution significative lors de récurrence tumorale, ou plus particulièrement leur capacité à détecter un processus néoplasique récidivant de manière précoce.

Une étude récente menée par Li *et al.* (2020) a permis de montrer que les miARN-92b et -375 montraient une concentration sanguine significativement plus élevée après induction d'une chimiorésistance chez les individus présentant une TPNPC, et que ces concentrations diminuaient après mise en place d'une chimiothérapie efficace. Les auteurs suggèrent alors l'utilisation possible de ces miARN en tant que biomarqueur de suivi au cours du traitement de TPNPC, permettant de mettre en évidence les résistances aux protocoles de chimiothérapies.

Ces études montrent la potentielle utilité des miARN en tant que biomarqueur de suivi, bien que des études supplémentaires soient encore nécessaires à l'heure actuelle.

En conclusion, une grande variété de miARN a été identifiée à ce jour chez l'Homme, et de nombreuses preuves ont été mises en évidence concernant les potentiels des miARN en tant que

biomarqueurs diagnostique, pronostique, prédictif et de suivi lors de processus néoplasiques chez l'Homme. De nombreux scientifiques s'accordent ainsi à dire que les miARN forment la nouvelle génération de biomarqueurs lors d'atteinte néoplasique ; leurs différentes capacités de biomarqueur montrent de grandes perspectives depuis ces dernières années, leur analyse est rapide, peu coûteuse et accessible.

- *Les miARN chez le chien*

Bien que plusieurs études aient été effectuées concernant les miARN en tant que biomarqueur chez le chien, seulement quelques-unes se sont intéressées à leur expression dans le sang de chiens atteints de processus néoplasiques.

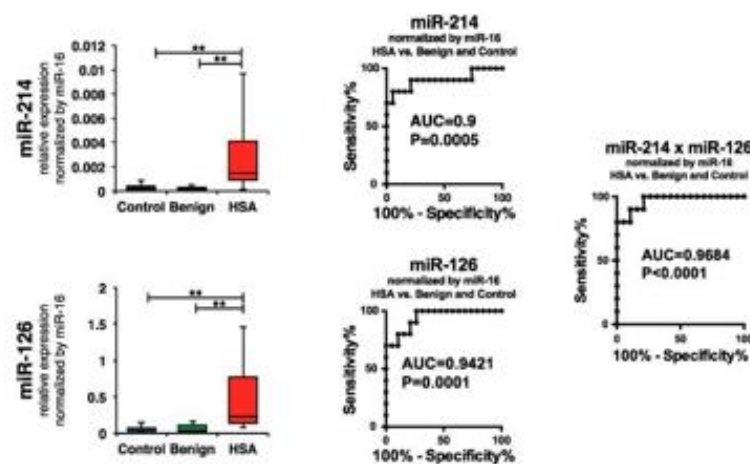
L'étude de Enelund *et al.* (2017) tout d'abord explore la stabilité des miARN dans le sérum et le plasma du chien, en dosant quatre miARN connus chez cette espèce. Ces travaux concluent que les miARN sont stables pendant une heure à température ambiante, mais une perte d'information est objectivée à partir de 24h. Ainsi, les auteurs soulignent l'importance de la durée de conservation en tant que condition pré-analytique majeure, qui doit être la plus réduite possible si l'échantillon est conservé à température ambiante.

- Performances diagnostiques des miARN sanguins chez le chien

In vitro, l'équipe de Fish *et al.* (2018) a comparé les profils de miARN contenus par les exosomes libérés par trois lignées différentes de cellules de tissu mammaire normal et cinq lignées de cellules mammaires tumorales. Au total, 145 miARN ont été différemment exprimés (par un facteur au moins égal à 1,5 avec $p < 0,05$) par les cellules tumorales par rapport aux cellules saines, dont 118 surexprimés et 27 sous-exprimés. Toutefois, deux études réalisées chez le chien ont observé les profils de miARN au sein des tumeurs étudiées (tumeurs mammaires et lymphomes multicentriques B et T) et dans le plasma de ces mêmes chiens. Les deux études concluent à une absence de corrélation entre les profils de miARN enregistrés au sein de la tumeur et dans le sang (Bulkowska *et al.*, 2017 ; Craig *et al.*, 2019). Ainsi, les augmentations ou réductions de concentrations sanguines enregistrées pour certains miARN pourraient ne pas être uniquement dues à une expression différentielle de ceux-ci par la tumeur, mais pourraient provenir d'une réponse générale de l'organisme à la présence de cette dernière. Les miARN dont les études montrent une augmentation ou une diminution d'expression au sein d'un tissu tumoral par rapport au même tissu en conditions physiologiques peuvent ne pas se révéler être de bons candidats en tant que biomarqueurs sanguins. L'étude menée par Bulkowska *et al.* (2017) montre en effet qu'il n'y a pas de corrélation entre le profil d'expression de miARN au sein de tumeurs mammaires canines et celui retrouvé au sein du plasma : les miARN ayant montré les expressions les plus élevées au sein de la tumeur n'ont pas été retrouvés surexprimés dans le plasma de ces chiennes.

En 2015, l'équipe de Heishima *et al.* a étudié les concentrations sanguines de miARN-126 et -214, tous deux jouant un rôle dans l'angiogenèse et la tumorigenèse, chez des chiens sains (n=10), des chiens atteints d'hémangiosarcome (n=10), et des chiens atteints de splénomégalies bénignes (trois hématomes spléniques, quatre foyers hyperplasiques bénins, et deux splénorrhagies). Les chiens atteints d'hémangiosarcome ont montré une augmentation importante significative de l'expression sanguine (relativement à l'expression de miARN-16, dont l'expression est constante entre chacun des groupes) de ces deux biomarqueurs par rapport aux chiens atteints de processus bénins et aux chiens sains (figure 45). Les miARN-126 et -214 montrent des valeurs d'aires sous la courbe ROC indépendamment très élevées, respectivement égales à 0,9421 et 0,9, et l'association des deux présente de meilleures performances encore pour différencier les chiens atteints d'hémangiosarcome des deux autres groupes (ASC = 0,9684, figure 45).

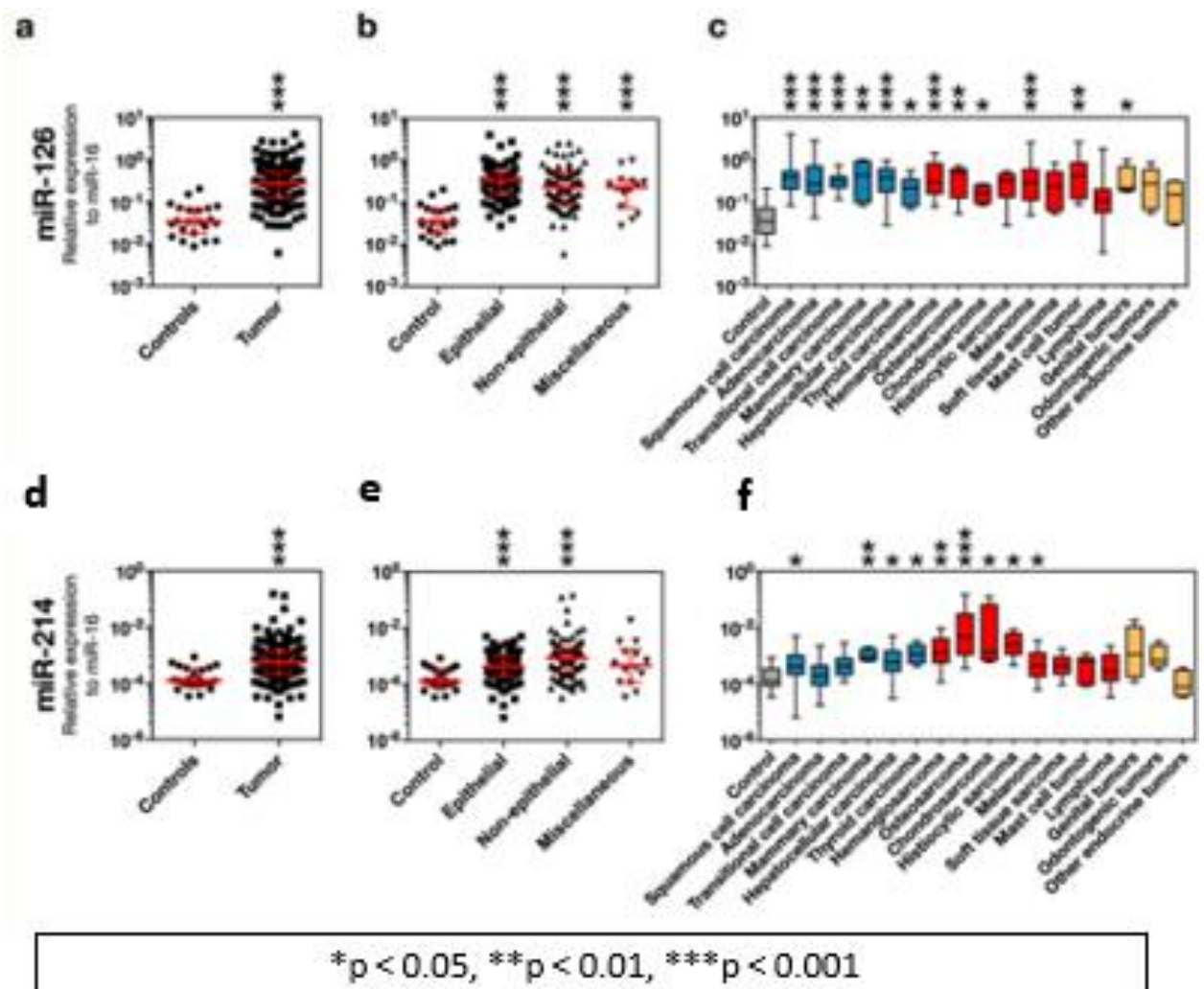
Figure 45 : Expressions de miARN-126 et mi-ARN-214 relatives à l'expression de miARN-16 chez des chiens atteints d'hémangiosarcome (n=10), de splénomégalies bénignes (n=9) et sains (n=10). Courbes ROC montrant les performances diagnostiques de ces deux biomarqueurs. (Heishima *et al.*, 2015)



En se basant sur ce constat, le même auteur a réalisé une étude en 2017 incluant 78 chiens atteints de tumeurs épithéliales, 77 chiens atteints de tumeurs non épithéliales (sarcomes, mélanomes, mastocytomes, lymphomes et autres), et 22 chiens sains (Heishima *et al.*, 2017). Les mêmes marqueurs miARN-126 et -214 furent étudiés. Le niveau de miARN-214 dans les cas porteurs de tumeurs étaient significativement plus élevé que celui des cas témoins (figure 46, d). Le miARN-214 était significativement augmenté dans les groupes de tumeurs épithéliales et non épithéliales, et les tumeurs non épithéliales présentaient les niveaux médians les plus élevés de miARN-214 (figure 46, e). Parmi les sous-catégories, 4 types de tumeurs non épithéliales (ostéosarcome, sarcome histiocytaire, chondrosarcome et hémangiosarcome) et 2 types de tumeurs épithéliales (carcinome thyroïdien et carcinome mammaire) ont montré une augmentation élevée ou modérée des niveaux de miR-214 avec une signification statistique (figure 46, f). Aussi, les taux de miARN-126 circulant étaient significativement élevés dans les cas porteurs de tumeurs, et étaient généralement augmentés dans la plupart des sous-types histologiques (figure 46, a). Les tumeurs épithéliales présentaient les niveaux médians de miR-126 circulant les plus élevés (Fig. 46 b, d). Six sous-types de tumeurs épithéliales (mammaire, hépatocellulaire, épidermoïde, thyroïde, carcinome

à cellules transitionnelles et adénocarcinome) et 4 sous-types de tumeurs non épithéliales (ostéosarcome, tumeur des mastocytes, mélanome et hémangiosarcome) ont montré une augmentation statistiquement élevée ou modérée de miRNA-126 (Fig. 3c, e). Le sarcome histiocytaire, les tumeurs odontogènes et le sarcome des tissus mous ont été classés dans les groupes modérément augmentés, cependant, leurs médianes n'étaient pas significativement différentes de celles des témoins.

Figure 46 : Expressions de miARN-126 et mi-ARN-214 relatives à l'expression de miARN-16 chez des chiens sains et atteints de tumeurs épithéliales, non épithéliales et diverses. (Heishima *et al.*, 2017)



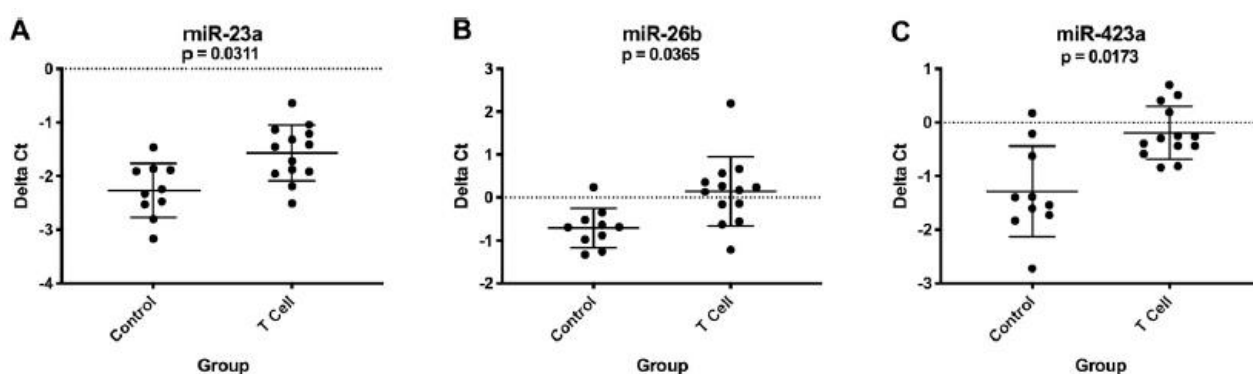
L'analyse de la courbe ROC discriminant les chiens atteints de tumeurs des chiens sains, a montré des valeurs élevées d'ASC pour le miARN-214 circulant pour le cas des tumeurs non épithéliales (ASC = 0,83), en particulier dans les sarcomes (hémangiosarcome, ostéosarcome, chondrosarcome, sarcome histiocytaire et tissus mous sarcome; ASC = 0,92) et sarcomes agressifs (hémangiosarcome, ostéosarcome et sarcome histiocytaire; ASC = 0,94). Mais les valeurs étaient relativement basses dans les tumeurs épithéliales (ASC = 0,75) et le groupe comprenant tous les types de tumeurs (ASC = 0,79). Le miARN-214 en circulation a montré des spécificités (90,9–95,5%)

et des sensibilités élevées (81,5–81,6%) pour la détection des sarcomes et des sarcomes agressifs, mais il a montré des spécificités et des sensibilités relativement faibles (respectivement 63,6–90,9% et 56,8–80,8%) dans le groupe des tumeurs épithéliales et le groupe comprenant tous les types de tumeurs. Les valeurs d'ASC des courbes ROC discriminant les chiens atteints de tumeurs des chiens sains par la concentration de miARN-126 circulant, étaient généralement élevées dans le groupe contenant tous les types de tumeurs (ASC = 0,93), les tumeurs épithéliales présentant la valeur d'ASC la plus élevée (ASC = 0,95). Le miARN-126 en circulation avait généralement des valeurs de spécificité et de sensibilité élevées (respectivement 81,8–90,0% et 85,2–93,6%) pour les valeurs seuils optimales. La combinaison des deux miARN a encore augmenté les précisions de détection : l'ASC, la sensibilité et la spécificité ont respectivement augmenté jusqu'à 0,88 , 88,76% et 86,36% dans le groupe contenant tous types de tumeurs, 0,92 , 92,3% et 90,9% dans les tumeurs épithéliales, 85,9% , 85,7% et 86,4% dans les tumeurs non épithéliales, 86,7% , 81,6% et 95,5% dans les sarcomes, et 91,8% , 88,9% et 95,5% dans les sarcomes agressifs. Cette étude propose donc des valeurs diagnostiques élevées pour les marqueurs miARN-126 et -214 pour détecter divers types de tumeurs. Il est de plus à noter que les valeurs de ces deux marqueurs n'ont pas montré de corrélation forte avec d'autres paramètres cliniques (hématocrite, numération plaquettaire, temps de coagulation, urée, créatinine, PAL, ALAT et ASAT), ce qui permet donc d'attester du caractère indépendant de ces biomarqueurs.

Plusieurs études supplémentaires se sont intéressées à d'autres mi-ARN, et plus particulièrement concernant certaines atteintes tumorales particulières. Une première étude menée par Oosthuyzen *et al.* (2018) a analysé l'expression de miARN-122 (un marqueur sensible et spécifique de lésions hépatiques chez l'Homme et les rongeurs) chez des chiens présentant des lésions hépatiques et des chiens sains. Ils ont pu mettre en évidence une augmentation significative de la concentration sérique de miARN-122 ($p = 0,05$) chez les chiens présentant une atteinte hépatique néoplasique par rapport aux chiens sains.

Cette étude fut suivie par la travail mené par Craig *et al.* (2019), qui ont comparé les profils de concentration plasmatique de 38 miARN chez 22 chiens atteints de lymphome multicentrique de phénotype B, 13 de lymphome multicentrique de phénotype T et 10 chiens sains. Par rapport au groupe contrôle, les chiens atteints de lymphome de type B présentaient six miARN surexprimés et neuf miARN sous-exprimés. Concernant les chiens atteints de lymphome de type T, trois miARN ont montré une diminution de leurs concentrations plasmatiques (figure 47). Il est toutefois à noter que les valeurs de concentrations plasmatiques de miARN montrent des recouvrements relativement importants entre les groupes de chiens atteints et ceux de chiens sains.

Figure 47 : Distributions des expressions plasmatiques de trois miARN ayant montré une différence significative ($p < 0,05$) entre les chiens atteints de lymphome de type T ($n=13$) et les chiens sains ($n=10$). (Craig *et al.*, 2019)



Ces deux dernières études, associées à celles précédemment citées, montrent, comme chez l'Homme, la diversité des miARN identifiés lors de différentes atteintes néoplasiques chez l'animal, et la possibilité de montrer leur potentiel en tant que biomarqueur.

En effet, d'autres travaux, menés par Bulkowska *et al.* (2017), ont sélectionné trois autres miARN identifiés comme étant les plus exprimés au sein de tumeurs mammaires de 146 chiennes (miARN-144, -32 et -374a) ainsi que le miARN-1246, connu pour être surexprimé chez les femmes atteintes de cancer du sein. De manière étonnante, aucune différence de concentration plasmatique concernant ces quatre miARN, n'a été observée entre un groupe de 50 chiennes atteintes de tumeurs mammaires et 12 chiennes saines. De plus, aucune différence de profil d'expression de ces miARN, n'a été observé entre les chiennes présentant une atteinte néoplasique métastasée ($n = 12$) et non métastasée ($n = 38$). Ces quatre miARN ne semblent donc pas être de bons candidats en termes de biomarqueur diagnostique des tumeurs mammaires chez la chienne.

L'étude de Fish *et al.* (2020) a, quant à elle, étudié les profils d'expression de miARN dans le plasma de 10 chiennes atteintes de carcinomes mammaires et 10 chiennes saines par séquençage à haut débit et dPCR (digital PCR). Parmi 452 miARN détectés par séquençage, une expression différentielle entre les deux groupes a été notée pour 65 miARN. Par méthode dPCR ciblant sept miARN différents, deux d'entre eux furent significativement surexprimés dans le plasma des chiennes atteintes de tumeurs : miARN-19b (médiane groupe tumeurs = 18 073 copies/ μ L [de 11 635 à 31 825] *versus* groupe sains = 8 249,4 copie/ μ L [de 2 993,9 à 32 364]. $p = 0,003$) et miARN-125a (médiane groupe tumeurs = 368 copies/ μ L [de 29,2 à 739,1] *versus* groupe sains = 0,7 copie/ μ L [de 0,0 à 364,1], $p < 0,001$). Ainsi, cette étude a montré que les aires sous la courbe ROC pour distinguer les chiennes atteintes de carcinome mammaire des chiennes saines étaient égales à :

- miARN-125a : ASC = 0,930
- miARN-19b : ASC = 0,88, voire ASC = 0,978 lorsque la valeur aberrante du groupe de chiennes saines fut retirée.

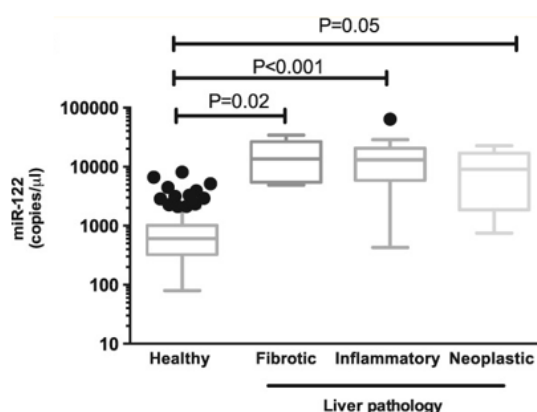
De plus, cette étude a montré que la concentration plasmatique de miARN-18a mesurée par séquençage à haut débit chez les chiennes présentant des tumeurs mammaires augmentait significativement ($p=0,05$) lors d'une atteinte de stade III par rapport à une atteinte de stade I à II.

Cette même augmentation significative de concentration plasmatique en miARN-18a fut observée lorsqu'une invasion lymphatique était visible sur les biopsies tumorales, et pourrait donc être biomarqueur prédictif de métastases.

Il est toutefois important de souligner que les résultats montraient des différences majeures entre les techniques de séquençage à haut débit et par dPCR (digital PCR). Par exemple, l'expression de miARN-18a ne présentait pas de différence en fonction des caractères histopathologiques lorsque le dosage fut effectué par dPCR. Une attention particulière doit donc être portée sur les techniques employées en fonction des utilisations prévues. Les auteurs suggèrent donc l'élaboration d'un consensus établissant la technique à employer pour la détection et le dosage des miARN plasmatiques.

Enfin, en termes de performance diagnostique, il est également important de souligner que la spécificité des miARN semble réduite en raison du fait que des affections non néoplasiques peuvent également présenter des profils d'expression proches de ceux observés lors d'affection néoplasiques. Par exemple, l'étude de Bulkowska *et al.* (2017) a montré qu'il n'y a aucune différence significative entre les concentrations plasmatiques de miARN-122 entre les chiens atteints de néoplasie hépatique, de fibrose hépatique ou de maladie hépatique inflammatoire (figure 48).

Figure 48 : Concentrations plasmatiques de miARN-122 chez des chiens sains (n = 120), atteints de fibrose hépatique (n = 6), de maladie hépatique inflammatoire (n = 19) et de néoplasie hépatique (n = 5). (Bulkowska *et al.*, 2017)



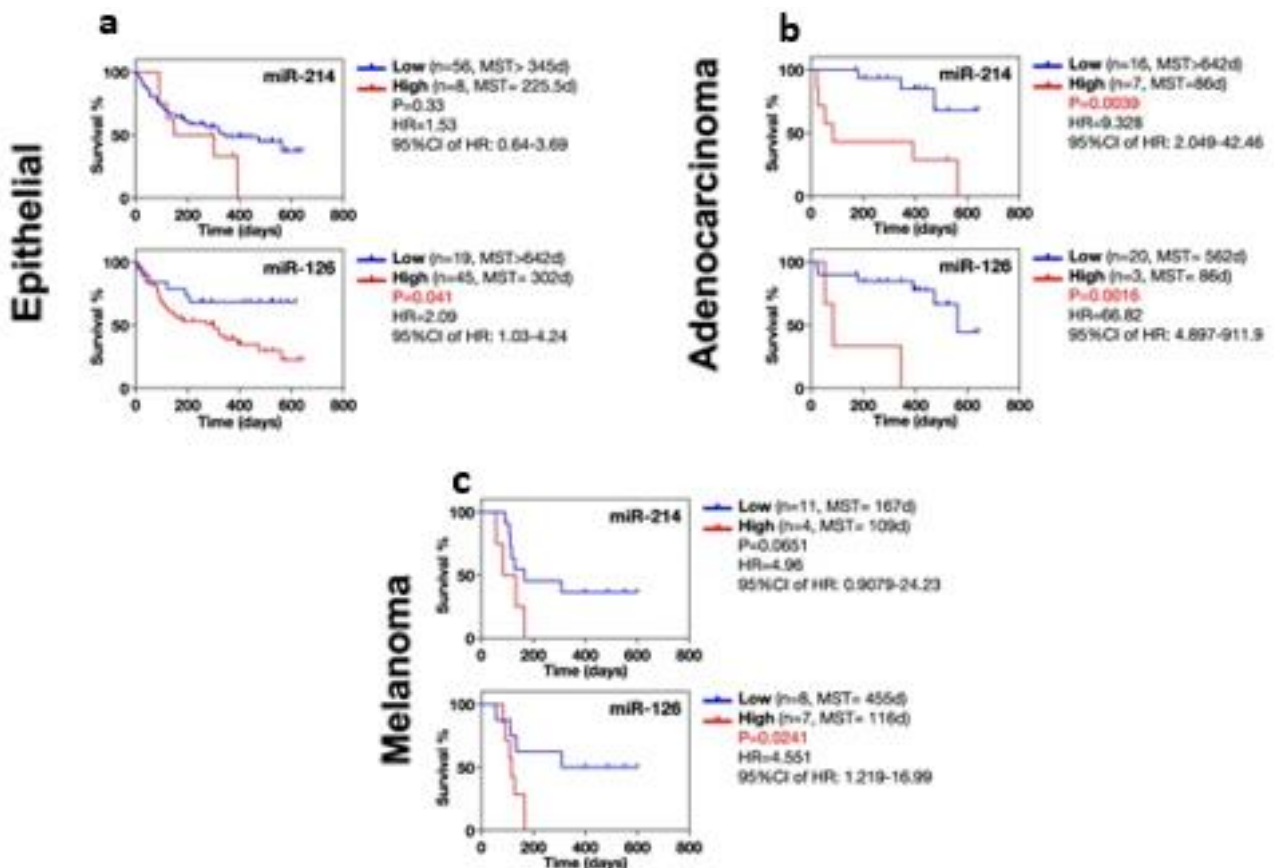
Ce manque de spécificité des miARN en condition néoplasique, semble être la principale limite de cette catégorie de biomarqueur. Si l'utilisation des miARN vient à se développer en pratique clinique, le clinicien devra être vigilant à considérer les éventuelles variations des miARN utilisés possiblement causées par des atteintes non néoplasiques.

□ Performances pronostiques des miARN sanguins chez le chien

Concernant les performances pronostiques des miARN sanguins chez le chien, une augmentation de la concentration sérique de miARN-125a a montré une corrélation, bien que non significative ($p = 0,07$), avec une diminution de la durée de survie chez les chiennes atteintes de carcinome mammaire (Fish *et al.*, 2020).

Aussi, tous types tumoraux confondus, les concentrations de miARN-126 et -214 n'ont pas montré d'impact significatif sur les durées de survie (Heishima *et al.*, 2017). Toutefois, suivant les types tumoraux, certaines observations ont pu être réalisées : une augmentation de la concentration sérique en miARN-126 chez les chiens atteints de tumeurs épithéliales est significativement corrélée à une durée médiane de survie globale inférieure à celle observée lors de concentrations plus faibles (figure 49a). Les chiens atteints d'adénocarcinomes et présentant des concentrations sériques élevées de miARN-126 ou miARN-214 montrent une durée de survie médiane significativement moins importante que lors de concentrations plus faibles (figure 49b). Enfin, concernant les mélanomes, une concentration augmentée de miARN-126 est également significativement corrélée à un moindre temps de survie globale. Cette même tendance a été observée concernant le miARN-214 lors de mélanome, mais l'association ne fut pas significative ($p = 0,0651$) (figure 49c). Toutefois, les concentrations sériques de ces deux miARN n'ont pas montré d'impact pronostique chez les chiens atteints de tumeurs non épithéliales.

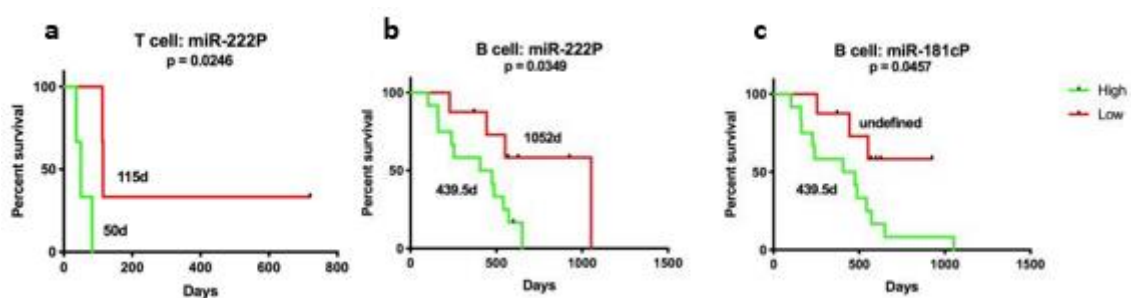
Figure 49 : Courbes de Kaplan Meier montrant les taux de survie chez les chiens atteints de tumeurs épithéliales, d'adénocarcinomes et de mélanome en fonction des concentrations sériques de miARN-126 et -214. (Heishima *et al.*, 2017)



Ce même auteur a publié une étude s'intéressant exclusivement à l'impact pronostique de ces deux derniers miARN chez des chiens atteints d'ostéosarcome (n=76), ayant subi une amputation puis un protocole de chimiothérapie (Heishima *et al.*, 2019). Cette étude montre qu'une augmentation de la concentration sérique de miARN-214 était significativement associée à une moins bonne durée de rémission et une moins longue durée de survie globale. A l'inverse, des concentrations élevées de miARN-216 étaient significativement associées à des durées de rémission et de survie globale plus importantes. Il est à noter que les valeurs de ces marqueurs furent indépendantes des différentes caractéristiques histopathologiques (index mitotique, sous-type histologique), mais une association fut remarquée avec le grade de la tumeur. Les auteurs montrent également que l'association de ces deux marqueurs ainsi que de la mesure de la concentration sérique de PAL permet d'augmenter la précision des temps de survie par rapport à la concentration sérique de PAL seule.

Concernant les chiens atteints de lymphomes multicentriques de type B, des concentrations plasmatiques élevées de miARN-21, -31, -155 et -222 étaient significativement corrélées à des taux de survie sans progression de la maladie plus faibles, et des concentrations plasmatiques élevées de miARN-181c et -222 induisaient de manière significative une durée de survie globale médiane moins élevée (figure 50 b et c) (Craig *et al.*, 2019). D'après la même étude, concernant les chiens atteints de lymphomes multicentriques de type T, une diminution de la durée médiane de survie sans progression de la maladie était observée de manière significative lors de concentrations élevées de miARN-31, -145, -150, -155 et 222 (figure 50a). Toutefois aucune variation de concentration plasmatique des miARN étudiés, n'a été associée à un impact sur la survie globale de ce dernier groupe.

Figure 50 : Courbes de Kaplan Meier montrant les taux de survie globale chez les chiens atteints de lymphome de type T (a) et B (b et c) en fonction des concentrations sériques de miARN-222 (a et b) et -181c (c). (Craig *et al.*, 2019)



Ainsi, plusieurs miARN circulants semblent avoir montré un intérêt en tant que biomarqueur pronostique chez les chiens atteints de différents types tumoraux, bien que peu d'études aient été effectuées sur ce sujet.

□ Performances des miARN circulants en tant que biomarqueur de suivi chez le chien

Aucune étude à ce jour menée chez le chien, n'a montré un intérêt de l'usage des miARN circulants dans le suivi des individus de processus tumoraux. Toutefois, l'étude menée par Heishima *et al.* (2015) montre une décroissance de la concentration sérique des miARN-126 et -214 chez 10 chiens après exérèse chirurgicale d'un hémangiosarcome. Ceci atteste du caractère dynamique de ces marqueurs, et pourrait induire un intérêt dans le suivi de ces animaux si ces concentrations montrent des variations visibles lors de développement de métastases.

Aussi, l'étude menée par Craig *et al.* (2019) montre un changement de profil des miARN chez les chiens atteints de lymphomes lors de rechute. En effet, les concentrations de certains miARN se sont révélées significativement augmentées (miARN-125b) ou diminuées (miARN-30b, -35a et -182) au moment de la rechute par rapport au dosage au moment du diagnostic. Ces variations pourraient avoir un intérêt dans le suivi de ces animaux dans le but de détecter précocement les rechutes.

Ainsi, bien que ces deux études émettent des informations laissant présager un intérêt potentiel des miARN dans le suivi des animaux atteints de processus néoplasique, des études supplémentaires sont nécessaires dans le but d'investiguer cet aspect.

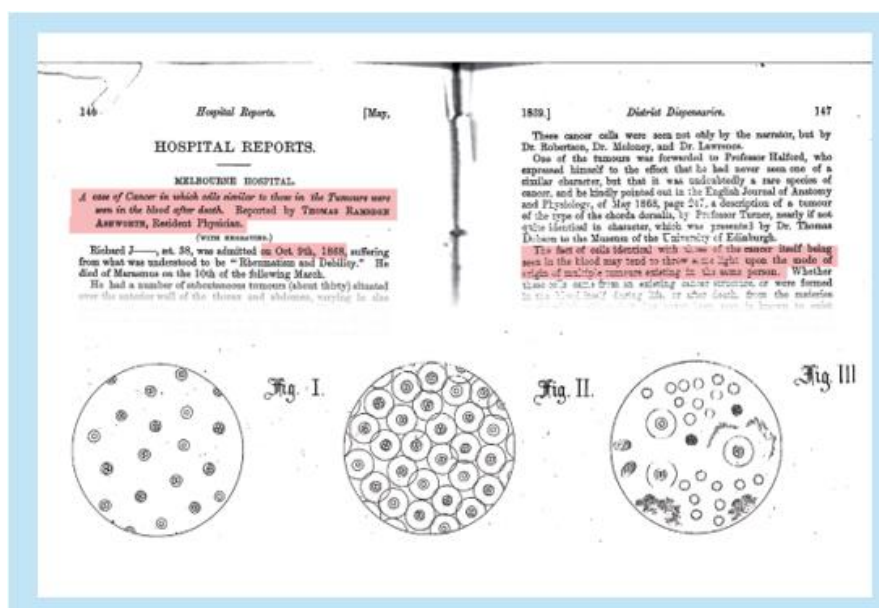
En conclusion, les miARN circulants ont montré chez l'Homme comme chez le chien leur intérêt pour le diagnostic, le pronostic, la prédiction des réponses aux traitements ainsi que pour le suivi des individus atteints de processus néoplasiques. C'est pour cette raison que les miARN sont présentés comme les futurs biomarqueurs majeurs dans le domaine de l'oncologie par de nombreux auteurs.

D. Les biomarqueurs cellulaires

a. Les cellules tumorales circulantes

Les cellules tumorales circulantes (CTC) sont des cellules issues d'une tumeur solide, ayant perdu leur capacité d'adhésion puis migré dans le compartiment sanguin intravasculaire. Elles ont été décrites pour la première fois en 1869 par Thomas Ashworth, ayant pu les observer dans le sang de patient atteint de cancer (figure 51) (Ashworth T., 1869).

Figure 51 : Journal médical historique de Thomas Ashworth, décrivant pour la première fois les cellules tumorales circulantes. (Ashworth T. 1869)



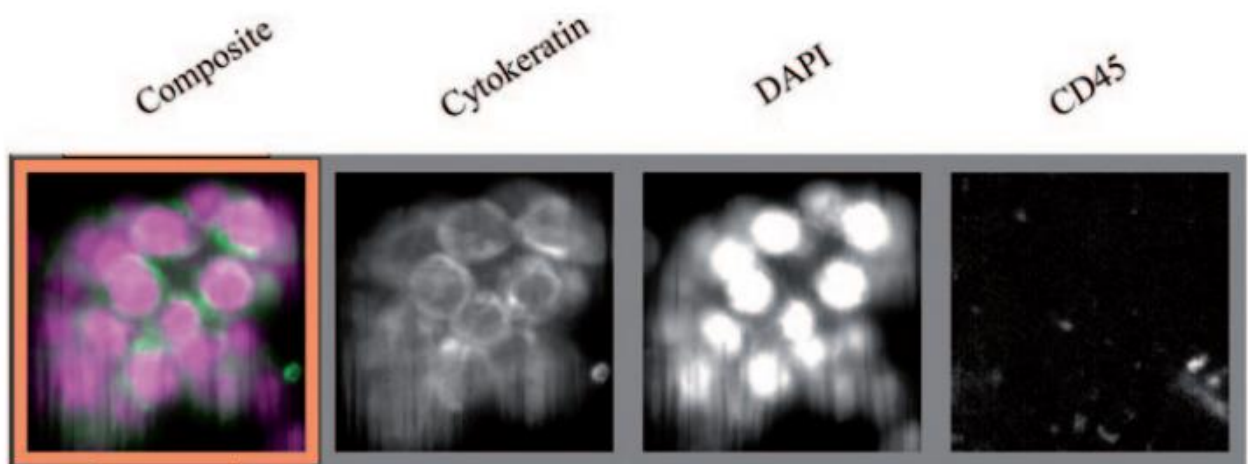
Ce sont ces cellules qui sont à l'origine des métastases présentes à distance de la tumeur d'origine par adhésion à l'endothélium puis extravasation (Osmani *et al.*, 2019). Grâce à l'avancée des techniques actuelles, il est possible de caractériser leurs différents marqueurs, leur séquence ADN, leur transcriptome et leur protéome. Puisque ces cellules dérivent du processus tumoral initial, leurs caractéristiques devraient permettre de connaître celles de la tumeur. Les CTC font donc partie du principe récemment dénommé « biopsie liquide », qui pourrait se substituer aux biopsies usuelles du tissu cancéreux difficilement répétables.

Plusieurs méthodes de dosages ont été proposées pour détecter les CTC dans le sang des patients (Maly *et al.*, 2019). Ces cellules étant très rares, de l'ordre de 1 CTC parmi 10^6 à 10^7 leucocytes, les outils utilisés pour leur détection doivent être pourvus d'une grande sensibilité. Des techniques d'enrichissement et d'isolation de ces cellules sont nécessaires. Elles se basent sur la reconnaissance de marqueurs des CTC, sur leur caractéristiques physiques ou biologiques (densité, taille, capacité d'invasion), ou sur des techniques moléculaires telles que la RT-PCR pour la

détection d'ARN spécifiques des CTC notamment. Cependant, une seule technique d'identification, d'isolement et de dénombrement des CTC a été approuvée en 2004 par la FDA : le système CellSearch®.

Ce système automatisé nécessite un échantillon de 7,5mL de sang. Une première étape d'enrichissement est effectuée à l'aide d'un anticorps couplé à un ferrofluide dirigé contre les molécules d'adhésion des cellules épithéliales (dans ce cas : Epithelial Cell Adhesion Molecule - EpCAM). Les cellules liées à l'anticorps sont alors séparées des cellules sanguines à l'aide d'un champ magnétique. Les cellules épithéliales sont ensuite identifiées à l'aide d'anticorps couplés à un fluorochrome dirigés contre des marqueurs intracellulaires spécifiques des cellules épithéliales : les cytokératines CK8, CK18 et/ou CK19, et à l'aide d'anticorps couplés à un fluorochrome dirigés contre l'ADN : le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Enfin, un anticorps couplé à un fluorochrome dirigé contre le CD45, marqueur des cellules leucocytaires, est rajouté dans le but de différencier les CTC des leucocytes séquestrés et marqués de manière non spécifique. Les cellules marquées et isolées sont enfin transférées sur une cassette et maintenues dans un champ magnétique. Une technologie d'imagerie de haute résolution permet alors de détecter et de visualiser toute cellule sélectionnée présente sur la cassette, et soumet les images à un évaluateur pour vérification. Les cellules considérées comme étant des CTC sont donc de phénotype EpCAM+/cytokératine+/DAPI+/CD45- (figure 52).

Figure 52 : Exemple d'identification de CTC marquées CK+/DAPI+/CD45- par le système CellSearch®. (Paoletti et Hayes., 2016)

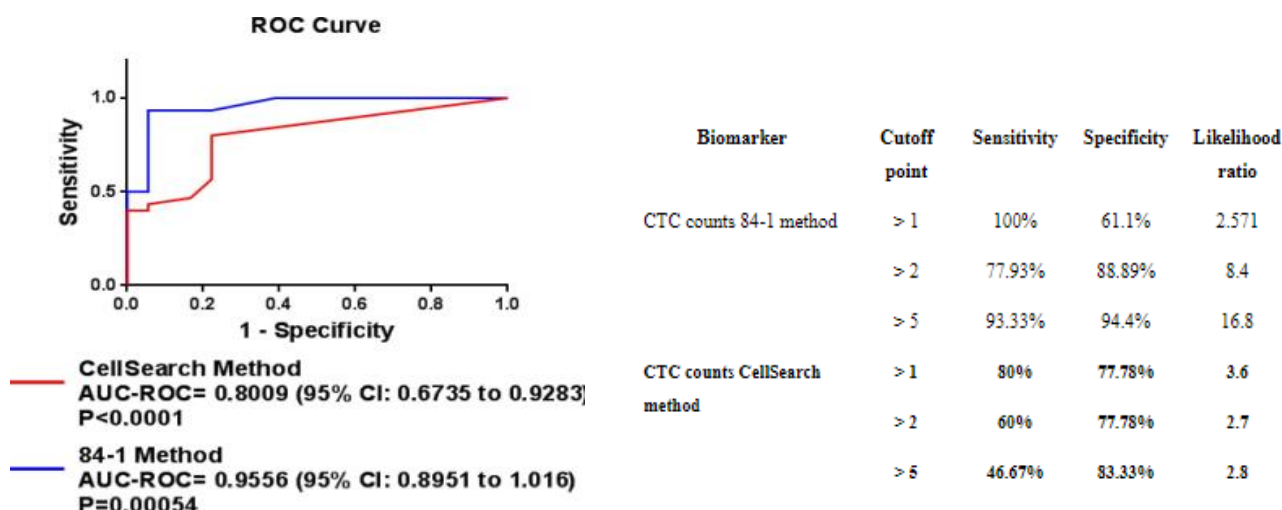


En raison du fait que cette technologie soit la seule approuvée par la FDA, la majorité des études ont été réalisées à l'aide du système CellSearch®. Les sensibilité et spécificité des autres techniques sont très variables. Notamment les technologies basées sur l'étude des profils ADN, ARN et protéiques qui nécessitent plus de matériel que ce qui est contenu dans une seule cellule, imposant donc des techniques pré-analytiques d'amplification pouvant mener à des artefacts.

Toutefois, plusieurs limites sont à relever concernant cette technique. Tout d'abord, la spécificité de cette technique est légèrement altérée par le fait que des individus atteints de maladies inflammatoires voire des individus sains peuvent présenter une ou plusieurs cellules reconnues

comme CTC dans 7,5mL de sang, bien que cela soit très rare (Allard, 2004). La principale limite de cette technique semble être un manque de sensibilité en raison du ciblage spécifique des cellules présentant des marqueurs épithéliaux. En effet, il a été montré que les cellules tumorales présentent une plasticité épithélio-mésenchymateuse ; c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de passer d'un type épithélial à un type mésenchymateux notamment pour accéder à l'espace intra-vasculaire, puis de subir la transition inverse dans le processus d'extravasation et formation de métastase. Ainsi, les CTC présentant un phénotype mésenchymateux ne présenteront pas ou peu d'antigène de cellules épithéliales, notamment l'EpCAM, et produiront préférentiellement de la vimentine plutôt que de la kératine. Ainsi, il est possible que ces cellules ne soient pas isolées par le système CellSearch®, qui présentera alors un manque de sensibilité notable (Maly *et al.*, 2019 ; Nicolazzo *et al.*, 2019). Lowes *et al.* (2016) montrent que le système CellSearch®, comparativement à une autre technique de détection des CTC incluant des marqueurs de cellules mésenchymateuses, n'a pas permis de détecter 40 à 50% des CTC de type mésenchymateux chez des patients atteints de cancer de la prostate. De la même manière, Satelli *et al.* (2017) montrent la nette supériorité d'une technique de détection des CTC utilisant un marqueur de la vimentine associé aux cellules mésenchymateuses par rapport à la technique CellSearch® chez des patients atteints de carcinome prostatique (figure 53). Toutefois, une possibilité de marquage supplémentaire a été ajoutée au système CellSearch®, ayant un intérêt particulier dans la recherche de marqueurs spécifiques tumoraux associés à des valeurs pronostiques ou impliqués dans des résistances aux traitements de chimiothérapie.

Figure 53 : Courbes ROC de la méthode CellSearch® et de la méthode 84-1 associée à un marqueur de la vimentine. Valeurs diagnostiques des deux techniques pour la détection du cancer de la prostate en fonction de différentes valeurs seuils. (Satelli *et al.*, 2017)



Un exemple de tumeur solide mésenchymateuse est le mélanome, dont les CTC ne peuvent pas être détectées par les marqueurs épithéliaux usuels. Ainsi, des kits CellSearch® contenant des marqueurs différents, notamment le CD146, et l'antigène de haut poids moléculaire associé aux

mélanocytes (HMW-MAA), sont disponibles pour détecter spécifiquement les cellules circulantes provenant de mélanomes, définies comme étant de phénotype CD146⁺, HMW-MAA⁺, CD45⁻, CD34⁻.

- *Les CTC chez l'Homme*

- Les CTC en temps que biomarqueur diagnostique

Chez l'Homme, de très nombreuses études ont été effectuées dans le but de mettre en évidence la présence de CTC chez les patients atteints de divers processus néoplasiques, ainsi que leur rôle pronostique et prédictif principalement. Toutefois, ces études sont très récentes, et la démonstration de leur utilité clinique commence juste à être montrée pour certains cas de cancers. De ce fait, leur utilisation n'est pas à ce jour démocratisée dans la pratique clinique. Toutefois, au vu du nombre important de preuves établies concernant leur potentiel, il est raisonnable de penser que cette approche sera courante en pratique dans les années à venir, et s'inscrira dans une démarche de médecine personnalisée de manière relativement simple et accessible.

La présence de CTC a été montrée dans de nombreux types de cancers : par exemple gastrique, prostatique, du tissu mammaire, pulmonaire, ovarien, colorectal, vésical, pancréatique (Allard, 2004). Toutefois, chez les patients atteints de processus néoplasique non métastatique de stade précoce, la détection de CTC par CellSearch® n'a été positive que chez un faible taux d'individus ; entre 5 et 30% suivant les types de cancer (Cabel *et al.*, 2017). Ainsi, l'intérêt de la détection de CTC en tant que biomarqueur diagnostique des cancers en phase précoce, semble limité dû à une très faible sensibilité par cette technique. Toutefois, l'étude de Ilie *et al.* (2014) a montré que des CTC ont été détectées chez cinq patients parmi 168 atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique sans signe d'atteinte tumorale, par technique d'enrichissement et de filtration ISET (*Isolation by Size of Epithelial Tumor cells*), une autre technique d'isolation des cellules épithéliales tumorales par la taille. Chacun des cinq patients a déclaré des nodules tumoraux visibles par scanner entre 1 et 4 ans suivant la détection de CTC, tandis qu'aucun des patients n'ayant pas présenté de CTC, n'a déclaré de tumeur dans les 5 ans de suivi. Les individus atteints de cancer ont pu subir une exérèse chirurgicale des tumeurs pulmonaires et n'ont pas déclaré de récurrence dans les 12 mois suivant la chirurgie. Fait intéressant, les CTC isolées présentaient des phénotypes hétérogènes de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, correspondant aux phénotypes des tumeurs pulmonaires analysées. Ainsi, la présence de CTC dans le sang des patients présentant un risque de cancer, sans mise en évidence d'atteinte avérée, pourrait être un biomarqueur diagnostique précoce de développement de processus néoplasique.

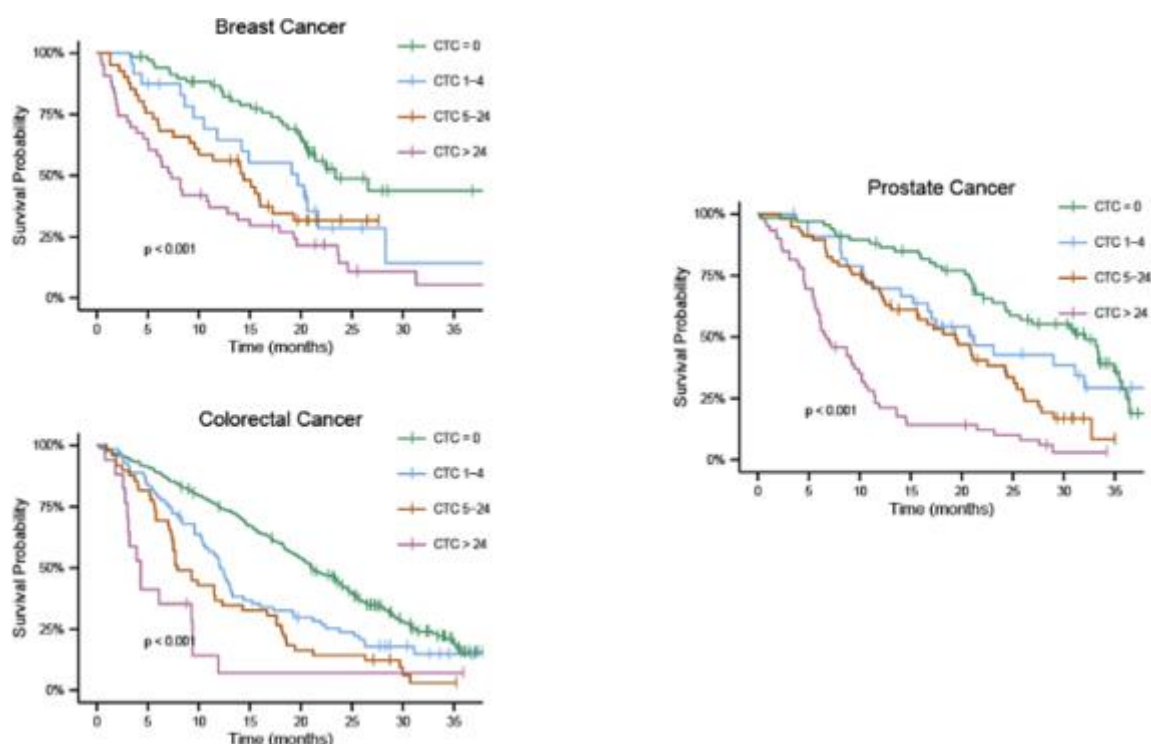
Toutefois, il est à noter que la plupart des études évaluant les valeurs diagnostiques des CTC pour la détection des processus tumoraux montrent une forte spécificité, mais une faible sensibilité. Par exemple, les méta-analyses menées par Msaouel et Koutsilieris (2011), Wu *et al.* (2016) et Sun *et al.* (2017) étudiant respectivement les cancers de la vessie et de l'urothélium, les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes hépatocellulaires, ont calculé des sensibilités respectivement égales à 24,6%, 35,1% et 63% et des spécificités égales à 100%, 89,4% et 98%

pour la détection du processus néoplasique. Fait intéressant, Sun *et al.* (2017) montrent une supériorité de ces valeurs diagnostiques chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire par rapport à celles de l'AFP (sensibilité et spécificité respectivement égale à 54% et 90%).

□ Les CTC en temps que biomarqueur pronostique

Les trois premières études qui ont marqué l'intérêt pronostique du décompte des CTC ont été menées chez des patients atteints de cancer du sein (Cristofanilli *et al.*, 2004), de cancer colorectal (Cohen *et al.*, 2008), et de cancer de la prostate résistant à la stérilisation (Bono *et al.*, 2008) au stade métastatique (figure 54).

Figure 54 : Courbes de Kaplan-Meier indiquant le taux de survie globale en fonction du nombre de CTC chez les patients atteints de cancers métastatiques du sein, colorectal et de la prostate avant initiation d'une thérapie de chimiothérapie. Graphiques générés par les données présentées par Cohen et al., (2008), Cristofanilli et al., (2004) et par Bono et al., (2008). (Andree *et al.*, 2016)

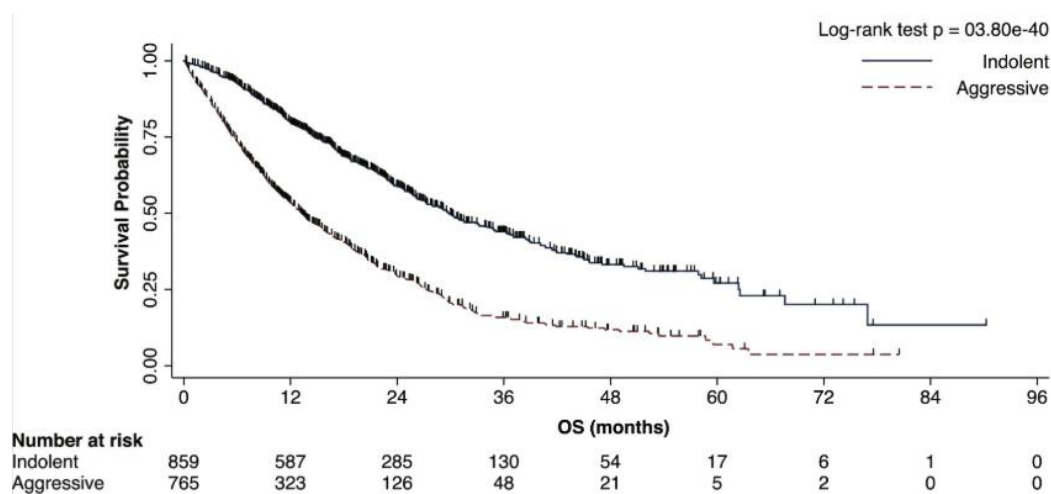


Ces études ont été suivies et leurs résultats confirmés par de nombreuses autres études et méta-analyses, démontrant que la présence de CTC a un impact pronostique indépendant négatif sur les différents taux de survie de patients atteints de nombreux types de cancers (parmi lesquels

les cancers colorectaux, prostatiques, du sein, de l'œsophage, de la vessie, des ovaires, gastriques, pulmonaires ou encore hépatiques (Msaouel et Koutsilieris, 2011 ; Ma *et al.*, 2012 ; Zhou *et al.*, 2015 ; Zheng *et al.*, 2016 ; Sun *et al.*, 2017 ; Tan et Wu, 2018 ; Hou *et al.*, 2018 ; Bidard *et al.*, 2018 ; Yang *et al.*, 2018 ; Wang *et al.*, 2019).

En outre, dans le but de préciser le pronostic des patientes atteintes de cancer du sein, un consensus d'experts internationaux a confirmé l'identification de deux sous-groupes en fonction du nombre de CTC dénombrées. En effet, l'étude de Cristofanilli *et al.* (2019) s'est intéressée à 2436 femmes atteintes de cancer du sein de stade IV. Un classement a été effectué en fonction du nombre de CTC dans 7,5mL de sang : un groupe présentant un nombre de CTC supérieur ou égal à cinq CTC (stade IV_{agressif}, n=911) et un groupe présentant moins de cinq CTC (stade IV_{indolent}, n=1033). Les patientes de stade IV_{indolent} ont montré une plus longue médiane de survie que les patientes de stade IV_{agressif} (respectivement 36,3 mois contre 16 mois, p<0,00001) (figure 55). Ce groupe d'expert considère donc les CTC comme outil pronostique important devant être introduit dans la démarche de stadification actuelle des patientes atteintes de cancer du sein avancé.

Figure 55 : Courbe de Kaplan-Meier étudiant la durée de survie globale chez les patientes atteintes de cancer du sein de stade IV_{indolent} (<5 CTC/7,5mL, ligne continue) et de stade IV_{agressif} (≥ 5 CTC : ligne discontinue). (Cristofanilli *et al.*, 2019)



□ Les CTC en temps que biomarqueur de suivi

Plusieurs études ont montré l'intérêt des CTC dans le suivi des patients, particulièrement pour déterminer la réponse aux traitements néoadjuvants, adjuvants ou aux traitements des métastases. En effet, un certain nombre d'études concernant différents types tumoraux ont montré qu'une décroissance du nombre de CTC après l'instauration d'un traitement de chimiothérapie était associée à de meilleurs taux de survie, des durées de survie sans progression plus importantes. A l'inverse, une augmentation du nombre de CTC au cours du traitement est associée à de plus faibles

taux de survie et une progression du processus néoplasique (Goldkorn *et al.*, 2014 ; Z.-X. Wu *et al.*, 2016 ; Yan *et al.*, 2017 ; Heller *et al.*, 2018 ; Pantel *et al.*, 2019). Goldkorn *et al.* soulignent également que les variations du nombre de CTC forment une donnée plus fiable que celles de la PSA pour le suivi des patients atteints de cancer prostatique. L'impact pronostique des CTC dans le suivi des patients est tel que l'essai clinique de phase III mené par Scher *et al.* (2015) chez 1195 patients atteints de cancer prostatique métastasé résistant à la castration, a montré que le nombre de CTC associé à la mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) pouvait être considéré comme critère de substitution de la survie globale lors de traitement associant l'acétate de abiraterone et la prednisone. En effet, cette association a répondu aux quatre critères de Prentice permettant d'établir la pertinence d'un critère de substitution. Ainsi, l'association du nombre de CTC et de la mesure de LDH sanguine après 12 semaines de traitement formerait un biomarqueur qui pourrait se substituer au critère de jugement clinique (ici la survenue du décès du patient malgré le traitement) lors des essais cliniques et lors des traitements des patients.

□ Les CTC en temps que biomarqueur prédictif

Les CTC ont également montré leur intérêt en tant que biomarqueur prédictif, que ce soit pour la survenue d'un décès ou pour l'efficacité d'un traitement. En effet, l'isolement des CTC permet par la suite de les caractériser par différents marqueurs (récepteurs cellulaires notamment) et par leur profil génétique, leur transcriptome ou encore leur protéome. Aussi, certaines mutations génétiques et certains récepteurs sont connus pour être prédictifs de résistance à certains traitements de chimiothérapie suivant le type de cancer, ou encore pour être la cible de certains types de traitement. Ainsi la présence ou l'absence de ces récepteurs ou mutations génétiques guident le clinicien dans le choix du traitement le plus adapté à la lésion tumorale du patient. Toutefois, cette caractérisation n'est effectuée aujourd'hui que par des marquages histologiques ou analyses moléculaires effectués sur des biopsies de la tumeur, acte invasif voire impossible à réaliser en fonction de sa localisation et de la capacité du patient à subir cette intervention. De plus, une hétérogénéité est fréquemment rencontrée entre la tumeur primaire et les métastases lorsqu'elles ont lieu, ce qui rend nécessaire la connaissance des caractéristiques de la tumeur primaire mais également des nodules métastatiques pour pouvoir adapter le traitement. Aussi, il a été montré que les CTC peuvent avoir également un profil de caractéristiques différent de celui de la tumeur primaire, et pourraient ainsi être le reflet de l'hétérogénéité rencontrée entre les métastases et le site tumoral primaire et permettre un ajustement plus précis des protocoles de traitement (Paoletti et Hayes, 2016).

Par exemple, dans une étude de 254 patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique, Fehm et al. (2010) ont comparé les statuts HER2 des tumeurs primaires et des CTC et ont pu mettre en évidence que 30% des patientes dont la biopsie de la tumeur initiale a révélé un statut HER2 négatif ont présenté des CTC HER2 positifs, et pourraient donc tirer bénéfice d'un traitement ciblé sur ce récepteur. L'étude effectuée par Paoletti *et al.* (2015) a récemment rapporté le développement d'un indice de thérapie endocrinienne lié aux CTC (CTC-ETI). Cet index comprend une évaluation semi-quantitative de l'expression des récepteurs aux œstrogènes (ER) et BLC2 (qui prédisent tous deux une sensibilité à la thérapie endocrinienne) et HER2 et Ki-67 (qui prédisent une résistance à la thérapie endocrinienne). Cet index a montré une valeur analytique élevée à l'aide du système

CellSearch®, même lorsque cette technique est réalisée par différents opérateurs formés. Le CTC-ETI variait considérablement parmi 50 patients atteints d'un cancer du sein métastatique ER positif. Par conséquent, le CTC-ETI peut identifier les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique ER positif dont les CTC révèlent un caractère réfractaire à la thérapie endocrinienne et pour lesquelles un traitement par chimiothérapie serait plus adapté, de la même manière que si elles présentaient un cancer ER négatif. Un essai prospectif est en cours pour confirmer cette hypothèse (essai COMETI, identifiant ClinicalTrials.gov: NCT01701050).

Il en va de même pour le cancer de la prostate, pour lequel il a été montré que le variant 7 du récepteur aux androgènes (V7-AR) est impliqué dans la résistance aux thérapies anti-androgéniques telles que l'enzalutamide ou l'abiraterone, particulièrement lorsque cette protéine se retrouve en position nucléaire par rapport à cytoplasmique ou membranaire (Antonarakis *et al.*, 2014). Une récente étude prospective multicentrique (PROPHECY ; Armstrong *et al.*, 2019) a pu confirmer le fait que les patients atteints de cancer prostatique métastatique résistant à la castration et dont les CTC étaient positives pour l'expression de V7-AR (« CTC V7-AR positifs »), présentaient de manière significative, des taux de survie globale ou sans progression et des réponses tissulaires, plus faibles que les patients ayant des CTC négatives pour l'expression de V7-AR (« CTC V7-AR négatifs ») lors de traitement à base d'enzalutamide ou d'abiraterone. En effet, les individus « CTC V7-AR positifs » ont présenté une durée médiane de survie sans progression et une durée médiane de survie globale significativement moindres que les individus « CTC V7-AR négatifs » : respectivement 3,1 *versus* 6,9 mois (HR = 2,4 ; IC 95% = [1,5 – 3,7]) et 10.8 *versus* 27.2 mois (HR = 3,9 ; IC 95% = [2,2 – 6,9]).

Carter *et al.* (2017) ont également mis en évidence que le profil de variabilité du nombre de copies des gènes des CTC de patients atteints de cancers du poumon à petites cellules a permis de prédire avec 83,3% de précision le caractère chimiorésistant ou chimiosensible du processus tumoral.

Enfin, il est important de souligner que malgré les différentes preuves de l'intérêt des CTC dans l'apport diagnostique, pronostique, pharmacodynamique ou prédictif de la réponse aux traitements, les preuves de l'utilité clinique de ce biomarqueur sont rares. C'est la raison pour laquelle l'American Society of Clinical Oncology et le National Comprehensive Cancer Network ne recommandent pas à l'heure actuelle l'utilisation des CTC dans les lignes directrices que ces institutions spécialisées proposent dans la gestion des processus néoplasiques.

Une première preuve de l'utilité clinique du nombre de CTC dans le sang des patientes atteintes de cancers du sein a été récemment publiée par l'équipe de Bidard *et al.*, (2019). Le choix du traitement (Hormonothérapie : HT ou chimiothérapie : CT) chez les patientes atteintes d'un cancer du sein présentant des récepteurs aux œstrogènes (HR+) et HER2- ne peut se reposer sur des critères objectifs prouvés, et dépend donc principalement des outils pronostiques et du clinicien. Pour cette étude, 761 patientes atteintes d'un tel cancer ont été divisées en deux groupes sans traitement préalable et ayant eu un décompte de CTC avant initiation du traitement. Un premier groupe a reçu un traitement (HT ou CT) en fonction du choix du clinicien qui n'avait pas connaissance du nombre de CTC par 7,5mL de sang. Le deuxième groupe a reçu un traitement en fonction du nombre de CTC : une hormonothérapie si CTC < 5 / 7,5mL ou une chimiothérapie si CTC ≥ 5 / 7,5mL. Parmi les choix de traitement instauré par le clinicien, 67% des traitements HT furent confirmés par CTC < 5 / 7,5mL de sang, tandis que 48% des chimiothérapies furent confirmées par CTC ≥ 5 / 7,5mL de sang. Concernant les patientes ayant reçu une HT alors qu'elles

avaient un nombre supérieur ou égal à 5 CTC par 7,5mL de sang, leur étude a montré que le choix guidé par le nombre de CTC permettait d'obtenir une durée de survie sans progression significativement plus importante (HR=0.67, 95%CI=[0.49–0.92]; p=0.01) et une durée de survie globale ayant tendance à être plus importante (HR=0.68, 95%CI=[0.44–1.07]; p=0.09). Aussi, les patientes ayant reçu une CT malgré un nombre de CTC inférieur à 5 par 7,5mL n'ont pas montré de différence en termes de durées de survie par rapport aux patientes dont le choix de HT fut guidé par un compte de CTC inférieur à 5 par 7,5mL. Ainsi, le choix de thérapie guidé par le nombre de CTC a montré qu'il permettait l'amélioration de la survie sans progression. Le nombre de CTC montre donc son utilité clinique d'après cette étude.

Toutefois, bien que cette dernière étude apporte une première preuve de l'utilité de ce biomarqueur en clinique, d'autres études sont nécessaires pour mieux caractériser les CTC chez les patients atteints de processus néoplasiques, pour apporter des preuves supplémentaires de leur utilité, et ainsi être un biomarqueur approuvé par les comités d'experts dans la prise en charge de ces patients.

- *Les CTC chez le chien*

Trois études ont été publiées concernant la détection de CTC chez le chien par réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse (RT-PCR). Il est en effet possible de détecter dans le sang la présence d'ARNm spécifiquement exprimés dans les CTC et non dans les cellules leucocytaires du sang périphérique par méthode de RT-PCR (Mostert *et al.*, 2009).

L'étude de Da Costa *et al.* (2011) a montré que parmi 16 ARNm marqueurs de CTC humains, six ont été surexprimés dans le sang des 10 chiennes atteintes de carcinome mammaire sélectionnées mais aucun des 12 chiens sains. De plus, à partir d'échantillons sanguins contenant une dilution définie de cellules issues de culture de deux lignées différentes de carcinome mammaire, la technique de RT-PCR a montré une bonne sensibilité, elle a été capable de détecter jusqu'à une CTC par 10^6 à 10^7 leucocytes avec les transcrits des gènes CK19, EGFR et CLDN7 comme marqueurs.

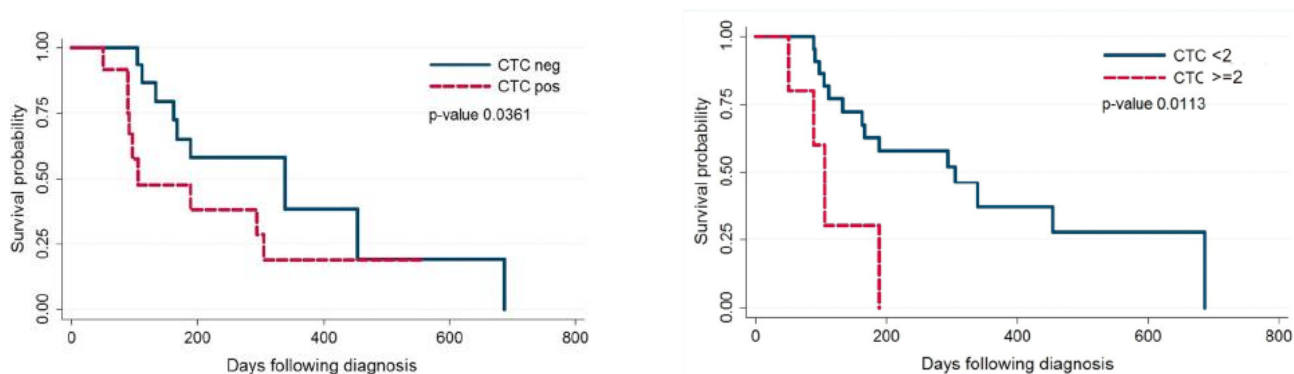
Da Costa *et al.* (2012) ont par la suite étudié la possibilité d'identifier le stade métastatique chez les chiennes atteintes de carcinome mammaire à l'aide de différents marqueurs ARN amplifiés par RT-PCR. Quatre groupes ont donc été formés ; un groupe formé de 40 chiennes atteintes de carcinome mammaire avec invasion vasculaire ou métastases, un deuxième contenant 40 chiennes sans signe d'invasion vasculaire ni métastase, un groupe avec 30 chiennes présentant une tumeur mammaire bénigne, et 10 chiennes saines. Ils ont pu identifier que le produit du gène CRYAB (gène impliqué dans la protection contre le choc thermique, l'inhibition de l'apoptose et l'architecture intracellulaire) permettait de détecter les carcinomes mammaires métastatiques avec une sensibilité de 35% et une spécificité de 100%. Puis un mélange des quatre marqueurs CLDN7, CRYAB, ATP8B1 et EGFR a été testé, en définissant un échantillon sanguin positif comme un échantillon ayant au moins un des marqueurs identifiés. Ils ont pu montrer que les chiennes du premier groupe ont été identifiées par ce mélange de marqueur avec une meilleure sensibilité égale à 77,5% mais une moindre spécificité égale à 80% (en effet 40% des chiennes atteintes de carcinome mammaire non métastatique ont présenté un échantillon positif). Ainsi, le produit du gène CRYAB ou la

recherche des produits des gènes CLDN7, CRYAB, ATP8B1 et EGFR permettent de différencier avec des précisions variables les chiennes atteintes de carcinome mammaire à un stade métastatique de celles atteintes d'un carcinome mammaire sans signe de métastase.

Enfin, dans leur étude, Da Costa *et al.* (2013) ont identifié par RT-PCR six marqueurs canins potentiels des CTC (contrairement à l'étude de 2011 étudiant des marqueurs ayant montré leur potentiel chez l'homme). Pour cela, les transcriptomes de deux lignées cellulaires de carcinome mammaire canin ont été comparés aux transcriptomes des leucocytes de chiens sains. Ils ont ainsi pu identifier 105 transcrits exprimés au moins 200 fois plus intensément par les cellules carcinomateuses par rapport aux leucocytes. Parmi ces 105 produits de gènes, 43 ARN furent identifiables après RT-PCR. Enfin, six d'entre eux furent retrouvés dans le sang des 10 chiennes atteintes de carcinome mammaire sélectionnées, identifiés comme le produit des gènes AGR2, ATP8B1, CRYAB, F3 IRX3 et SLC1A1. A l'aide d'échantillons sanguins contenant des dilutions variables de cellules carcinomateuses, ils ont pu montrer que la sensibilité de la technique par RT-PCR était suffisante pour détecter une cellule par 10^6 à 10^7 leucocytes pour les ARN CRYAB et ATP8B1. Les produits des autres gènes ont permis de détecter une CTC à des dilutions moins importantes. Ainsi, les ARNm des gènes CRYAB et ATP8B1 pourraient constituer des marqueurs de CTC chez des chiennes atteintes de carcinome mammaire, et sont détectés par RT-PCR avec une bonne sensibilité.

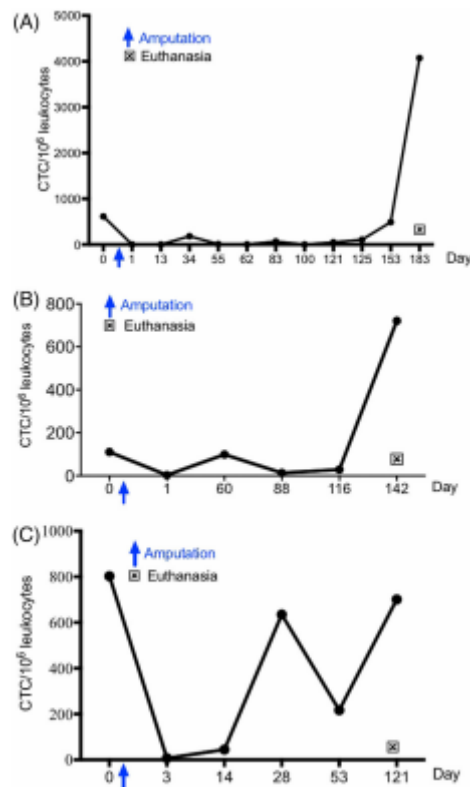
Le système CellSearch® a également pu être utilisé pour identifier les CTC dans le sang de chiennes atteintes de processus néoplasique, selon de protocole décrit dans le paragraphe au-dessus à partir de sang humain. Les CTC EpCAM+/CK+/DAPI+/CD45- ont ainsi pu être identifiées dans le sang de chiennes atteintes de carcinome mammaire métastatique par cette méthode (Marconato *et al.*, 2019). En effet, cette étude s'est intéressée à 32 chiennes présentant un carcinome métastatique. Parmi les 32 prises de sang, 27 analyses des CTC par le système CellSearch® furent interprétables (cinq échantillons sanguins ne furent pas interprétables en raison de coagulation dans le tube de prélèvement ou de contrôles de qualité non satisfaisants). Douze échantillons ont montré au moins une CTC par 7,5mL de sang, soit 44,4%, sensibilité relevée par les auteurs comme étant proche des valeurs obtenues chez les femmes atteintes de cancer du sein métastasé. Les auteurs ont pu quantifier le nombre de CTC chez 15 des 32 chiennes lors de la première visite de contrôle après chimiothérapie. Quatre des 15 chiennes ont montré au moins une CTC par 7,5mL de sang, soit 26,7%, et une diminution du nombre moyen de CTC a été notée. Malheureusement ce nombre trop faible d'individus n'a pas permis d'étudier le potentiel impact de la diminution des CTC dans le temps, sur le temps de survie global. Toutefois, cette étude a également porté sur l'impact pronostique de la présence de CTC à T0. En effet, les chiennes pour lesquelles aucune CTC n'a été détectée avant traitement ont montré une médiane de survie globale égale à 339 jours, tandis que celles ayant eu au moins une CTC par 7,5mL de sang ont montré une médiane de survie de 105 jours, cette différence ayant été relevée comme significative ($p=0,036$). En utilisant une valeur seuil égale à 2 CTC / 7,5mL, les chiennes CTC ≥ 2 avaient un temps de survie global médian égal à 105 jours contre 305 jours pour les chiennes CTC < 2 , cette différence ayant été à nouveau relevée comme significative ($p=0,0113$) (figure 56). Cette étude est donc la première à montrer la possibilité de dosage des CTC dans le sang par le système CellSearch®, montrant une sensibilité de 44,4% pour la détection de carcinome mammaire métastasé, et révélant que la présence de CTC dans le sang a un impact pronostique négatif.

Figure 56 : Courbes de Kaplan-Meier montrant le taux de survie chez les chiennes présentant un carcinome mammaire métastasé, en fonction de la présence ou non de CTC (à gauche), ou d'une valeur seuil de 2 CTC / 7,5mL de sang (à droite). (Marconato *et al.*, 2019)



Enfin, une dernière étude récente a montré la possibilité de détecter les cellules circulantes d'ostéosarcome à l'aide de la cytométrie en flux (Wright *et al.*, 2019). Les auteurs ont pu montrer une forte expression de Collagène I (constituant important des os et de la peau) par des cellules de deux lignées différentes d'ostéosarcome, et une expression moindre mais présente d'Ostéocalcine (hormone spécifique des tissus osseux). Ainsi, un marquage du Collagène I et de l'Ostéocalcine a permis de détecter des cellules positives à ces deux marqueurs par cytométrie en flux dans le sang de trois chiens atteints d'ostéosarcome. Les cellules détectées positives pour l'expression de ces deux marqueurs par la cytométrie en flux, ont pu être isolées, et les auteurs ont montré une similarité morphologique de celles-ci avec les cellules obtenues par cytoponction des tumeurs osseuses. De plus, un suivi du dosage de ces cellules a pu être effectué toutes les deux à trois semaines, avant amputation puis au cours du traitement par chimiothérapie (durant 121, 142 et 183 jours). Ils mettent alors en évidence que les trois chiens ont présenté un taux supérieur à 100 CTC / 10^6 leucocytes avant amputation. Les auteurs expliquent cette forte fréquence par le caractère très agressif des ostéosarcomes, dont les embolus cellulaires peuvent même être visualisés occasionnellement sur des frottis sanguins. Les fréquences de CTC furent fortement amoindries à la suite de l'amputation chez les trois chiens, puis furent variables au cours de la chimiothérapie. Enfin, une très forte augmentation de la fréquence des CTC, jusqu'à 4000 par 10^6 leucocytes, a été notée chez les trois chiens dans les 4 semaines précédant l'apparition manifeste de métastases ou le décès (figure 57). C'est ainsi la première étude montrant une évolution dynamique des CTC au cours d'un traitement de chimiothérapie chez le chien, connaissant une forte baisse après ablation de la tumeur et une hausse remarquable avant l'apparition de métastases ou le décès, laissant supposer un rôle de suivi des CTC chez le chien atteint d'ostéosarcome en cours de traitement.

Figure 57 : Nombre de cellules positives au Collagène I par 10⁶ leucocytes détectées au cours du temps chez trois chiens. (Wright *et al.*, 2019)



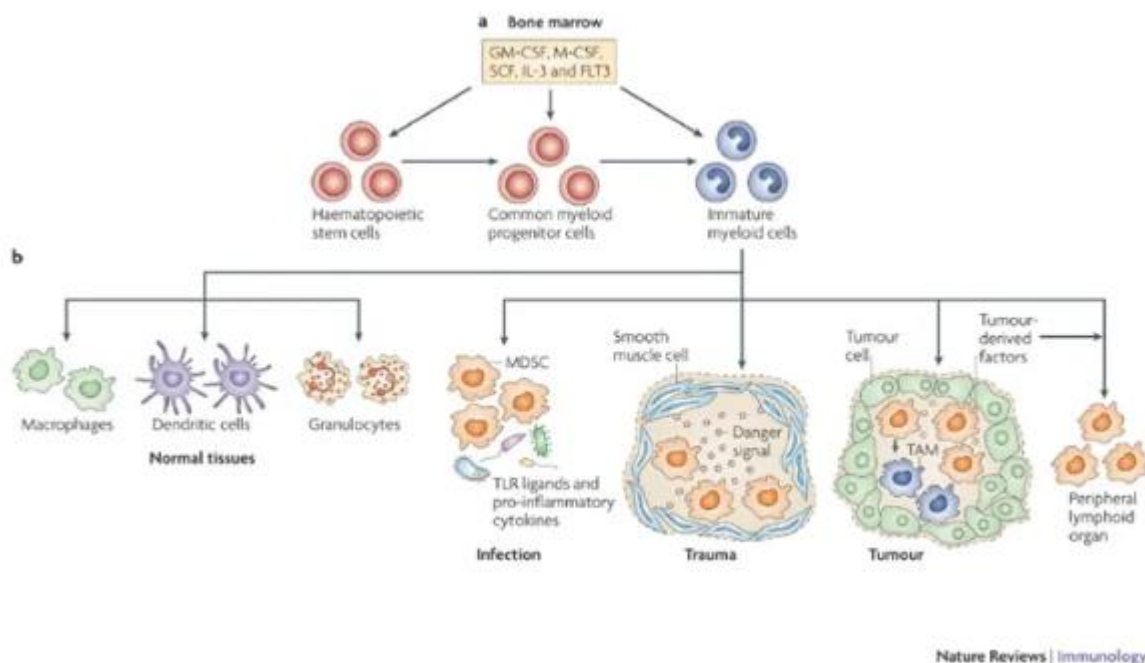
En conclusion, les CTC ont montré leur intérêt diagnostique dans la recherche de processus tumoral malgré une sensibilité limitée et variable suivant les techniques de dosage employées. Elles ont également montré leur intérêt en termes de pronostic, de suivi, ou d'outil prédictif, et certaines études avancent leur supériorité par rapport à certains biomarqueurs utilisés usuellement (l'AFP et le PSA notamment). En outre, le nombre de CTC et/ou l'expression de certains marqueurs pourraient être utiles au clinicien dans l'établissement ou l'ajustement d'une thérapie plus précise. Les preuves de leur utilité clinique sont malgré tout aujourd'hui insuffisantes et ne permettent pas leur utilisation courante en pratique. Cependant, compte tenu du fait que la recherche sur les CTC soit un domaine relativement récent, il est probable que le nombre croissant d'études mène dans un futur proche à une large utilisation de ce biomarqueur. Le nombre d'études concernant le chien est quant à lui faible. Il a été montré que différentes techniques utilisées en médecine humaine sont également applicables pour détecter et quantifier le nombre de CTC dans le sang des chiens. Leur intérêt dans l'établissement d'un pronostic et dans le suivi des chiens atteints de processus néoplasique a également été soulevé dans deux études. De nombreuses études sont encore nécessaires chez le chien pour établir l'intérêt des cellules tumorales circulantes et leur utilité clinique. Toutefois, le chien et l'Homme montrant de nombreuses similarités dans le domaine de

l'oncologie, les études menées en médecine humaine concernant les cellules tumorales circulantes poussent à croire qu'il s'agit d'un biomarqueur prometteur également en médecine vétérinaire.

b. Les Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSCs)

Les cellules myéloïdes suppressives forment un groupe de cellules hétérogènes, et représentent les stades immatures des granulocytes et des macrophages. Elles sont retrouvées principalement dans la moelle osseuse, où elles représentent 20 à 30% des cellules qui la constituent chez la souris, contre 2 à 4% au sein de la rate, 0,5% parmi les cellules mononuclées du sang périphérique, et 0% au sein des nœuds lymphatiques. Les MDSCs se composent de deux populations distinctes : les G-MDSC (granulocyte polynucléaire neutrophile) et les M-MDSCs (macrophage) issues des cellules myéloïdes immatures (IMCs) (figure 58, Gabrilovich et Nagaraj, 2009).

Figure 58 : L'origine des MDSCs. Tiré de *Myeloid-derived suppressor cells as regulator of the immune system*, Gabrilovich et Nagaraj, 2009.



Les MDSCs possèdent une forte activité immunomodulatrice en inhibant principalement la prolifération des lymphocytes T, en réduisant leur pouvoir cytotoxique, ainsi qu'en induisant leur apoptose. Elles exercent également une réduction de la prolifération et de l'activité des lymphocytes B, ainsi que des cellules Natural Killer (NK), et des cellules dendritiques. Leur pouvoir immunomodulateur provient de la sécrétion de cytokines et enzymes, notamment l'inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), l'arginase (ARG1), les Reactive Oxygen Species (ROS), l'IL-10, le Transforming Growth Factor β (TGF- β), ou encore un puissant agent oxydant : la peroxy-nitrite (Nadal *et al.*, 2018).

Physiologiquement, les MDSCs migrent vers les différents organes périphériques où elles se différencient en macrophages, cellules dendritiques ou granulocytes. Toutefois, les phénomènes inflammatoires aigus ou chroniques favorisent l'accumulation des MDSCs au sein des sites d'inflammation, empêchent leur différenciation et induisent leur activation (Gabrilovich et Nagaraj, 2009). Il a été montré que de nombreux facteurs permettent le recrutement et l'expansion des MDSCs dans l'environnement tumoral depuis la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires, notamment le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF), le facteur de stimulation des colonies de macrophages granulocytes (GM-CSF), et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF), mais aussi de nombreuses interleukines et chimiokines : le TGF- β , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-10, l'IL-12, l'IL-13, CCL-2, CXCL-5, les prostaglandines cyclooxygénase 2 (COX-2) et E2 (PGE2) (Ugel *et al.*, 2009 ; Nagaraj et Gabrilovich, 2010). Les MDSCs recrutées seraient alors activées par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF- α (Tumor Necrosis- α), l'IL-13/4 et l'interféron- γ (IFN- γ) (Marvel et Gabrilovich, 2015).

L'activité immunosuppressive des MDSCs a pour but de préserver le système immunitaire et l'environnement où siège l'inflammation d'une réponse immunitaire excessive et/ou prolongée. On peut alors comprendre que l'inflammation péri-tumorale engendrée par une atteinte néoplasique favorise également le recrutement et l'activation des MDSCs. Or, la dépression du système immunitaire autour de la tumeur favorise le phénomène d'échappement tumoral et ainsi son expansion.

De plus, les MDSCs favorisent la dissémination métastatique des cellules tumorales par plusieurs mécanismes. En effet, ces cellules favorisent l'angiogenèse au sein de la tumeur en produisant des métalloprotéases matricielles 9 (MMP9) qui elles-mêmes favorisent la production et la biodisponibilité du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Elles produisent également le facteur Bombina Varietata 8 (BV8) proangiogénique, et des chimiokines ligands 2 (CCL2) qui permettent la migration des cellules endothéliales (Safarzadeh *et al.*, 2018). Les métalloprotéases produites par les MDSCs sont également impliquées dans la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire, améliorant la capacité de migration de ces cellules au sein de l'environnement tumoral. Ces métalloprotéases induisent de surcroît la production de facteur de croissance épidermique (EGF), de facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et de facteur transformant β 1 (TGF- β 1) qui permettent la transition épithéliale-mésenchymateuse des cellules tumorales carcinomateuses et permettent leur passage dans le secteur intravasculaire (Toh *et al.*, 2011).

Les MDSCs sont donc des acteurs clés de l'échappement tumoral de par leur rôle immunosuppresseur, leur rôle dans l'angiogenèse et la dissémination des cellules tumorales au sein de l'organisme. De nombreuses études visent donc à cibler ces cellules dans l'élaboration de thérapies anti-cancéreuses.

- *Le rôle biomarqueur des MDSCs chez l'homme.*

Les MDSCs ont été découvertes dans les années 1980. Leur appellation Cellules Myéloïdes Suppressives a été proposée en 2007 par Gabrilovich *et al.*, et leur rôle dans la croissance tumorale

n'est plus à démontrer, faisant de ces cellules une cible thérapeutique prometteuse. Ainsi, le nombre de recherches concernant les MDSCs s'est considérablement accru depuis les deux dernières décennies ; de 2007 à 2017 plus de 2500 études ont été publiées concernant ces cellules d'intérêt en oncologie (Gabrilovich, 2017). Ces cellules et leurs différentes implications sont donc de mieux en mieux comprises, mais de nombreuses avancées sont à attendre dans les prochaines années.

Il existe ainsi des preuves suffisantes de l'expansion des MDSCs lors de processus néoplasique (Tcyganov *et al.*, 2018). Une augmentation significative de la proportion de MDSCs parmi les cellules mononuclées du sang périphérique (%MDSCs) a été montrée en cas de très nombreux types de tumeurs par rapport au %MDSCs de sujets sains. On peut par exemple citer, de manière non exhaustive, le lymphome (Betsch *et al.*, 2018), le cancer du sein (Jin *et al.*, 2017), le cancer de l'ovaire (Okła *et al.*, 2019), le cancer du pancréas (Goedegebuure *et al.*, 2011), le carcinome urothélial (Sheng *et al.*, 2020), le cancer du col de l'utérus (Wu *et al.*, 2018), le cancer colorectal (Limagne *et al.*, 2016), le mélanome (Poschke *et al.*, 2010), le carcinome épidermoïde (Chen *et al.*, 2017) et de nombreuses tumeurs hématopoïétiques (Bizymi *et al.*, 2019).

Ainsi, en raison du nombre important de types tumoraux présentant une augmentation significative de %MDSCs, ce critère ne peut pas représenter un biomarqueur diagnostique d'une atteinte tumorale en particulier. Toutefois, une augmentation de %MDSCs peut donc témoigner d'une possibilité d'atteinte tumorale. Peu d'études proposent une valeur de sensibilité et de spécificité pour le %MDSCs dans le diagnostic d'atteinte tumorale. Jin *et al.* (2017) ont mis en évidence que dans le cadre de la détection de cancer du sein, la proportion de M-MDSCs parmi les leucocytes du sang périphérique montre une aire sous la courbe ROC de 0,766, une sensibilité égale à 80,5% ainsi qu'une spécificité de 61,3% pour une valeur seuil de 3,05%. Cette valeur d'aire sous la courbe a été sensiblement retrouvée (égale à 0,74, $p=0,0013$) dans l'étude de Bergenfelz *et al.* (2020), comparant les taux de M-MDSCs chez les patientes atteintes de cancer du sein métastatique et les patientes saines. Ainsi, les MDSCs semblent montrer une certaine capacité diagnostique. Toutefois, bien que ces valeurs diagnostiques soient intéressantes dans le cadre des moyens de dépistage du cancer du sein par rapport aux moyens d'imagerie peu accessibles, elles sont relativement faibles et induisent un nombre non négligeable de faux positifs et faux négatifs.

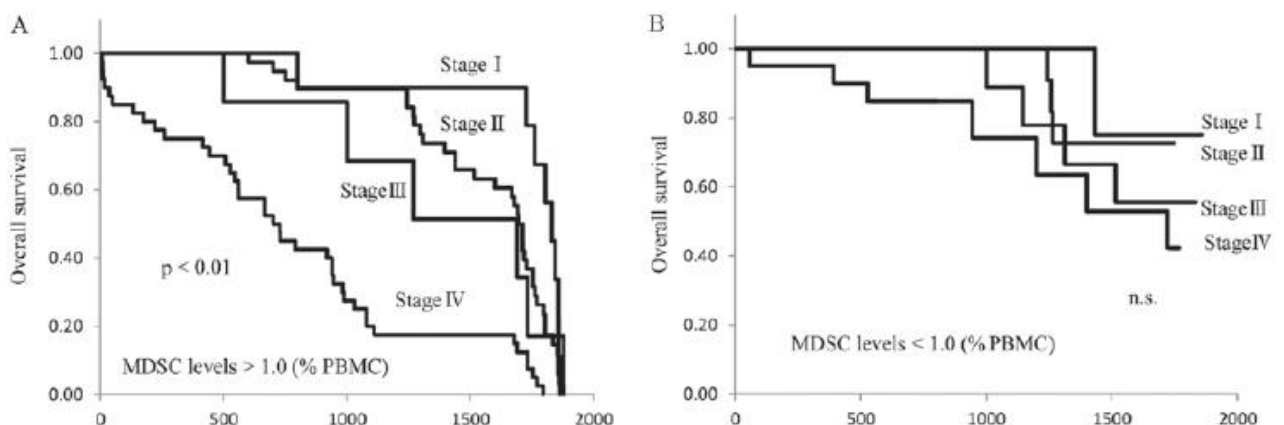
La spécificité de %MDSCs est de plus impactée par le fait que les processus néoplasiques ne sont pas les seules atteintes pathologiques entraînant une augmentation de ce paramètre. En effet, les phénomènes inflammatoires non néoplasiques, comme les phénomènes inflammatoires chroniques, aigus ou les atteintes septiques, sont également à l'origine d'une augmentation de %MDSCs (Gabrilovich, 2017). Ainsi, une augmentation de %MDSCs peut résulter d'un phénomène inflammatoire non néoplasique, dont l'hypothèse devra donc être exclue en préalable lors de l'exploration d'un possible processus néoplasique. Toutefois, certaines études révèlent une différence significative entre le %MDSCs des phénomènes inflammatoires non néoplasiques et des processus néoplasiques (Zhang *et al.*, 2019).

Il a été démontré dans de nombreuses publications que le taux de %MDSCs est significativement corrélé au stade d'avancement des processus néoplasiques. C'est-à-dire que plus la maladie est avancée, plus il semblerait que le %MDSCs soit élevé, et ce de manière significative (Jin *et al.*, 2017 ; Chen *et al.*, 2017 ; P.-F. Wang *et al.*, 2018). Ainsi, le %MDSCs chez les patients

atteints de processus néoplasiques pourrait être biomarqueur diagnostique d'un certain degré d'avancement. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer des valeurs seuils entre les différents stades cliniques des processus tumoraux, leurs différentes valeurs de sensibilité et de spécificité, et ainsi permettre d'évaluer l'intérêt du dosage des MDSCs dans l'établissement d'un degré d'avancement tumoral par rapport aux outils habituellement employés à cet effet.

Outre l'association entre une élévation de %MDSCs et le stade d'avancement du cancer, le rôle pronostique des MDSCs a été largement étudié chez les patients atteints de différents types tumoraux. Deux méta-analyses ont montré que le pronostic des patients atteints de tumeurs solides est significativement amoindri si le %MDSCs est élevé (Zhang *et al.*, 2016 ; P.-F. Wang *et al.*, 2018). En effet, les patients montrant une augmentation de %MDSCs présentaient des taux de survie globale, sans récurrence ou sans progression significativement inférieurs à ceux qui ne montraient pas de %MDSCs élevé. La méta-analyse menée par Zhang *et al.* (2019) amène les mêmes conclusions concernant les patients atteints de carcinome hépatocellulaire. De plus, le caractère indépendant du rôle pronostique du taux de MDSCs a été montré à l'aide d'analyses multivariées pour différentes atteintes néoplasiques, par rapport aux différents paramètres cliniques et pathologiques habituellement utilisés dans le but d'établir un pronostic (Gonda *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.*, 2019 ; Zhang *et al.*, 2017). Par exemple, Gonda *et al.* (2017) montrent le caractère indépendant du taux de MDSCs circulantes en tant que facteur pronostique par rapport aux différents stades cliniques d'avancement chez les patientes atteintes de cancer du sein (figure 59). De nombreuses autres publications étudiant des types tumoraux différents avancent également une valeur pronostique significative au taux de MDSC circulant (G. Yang *et al.*, 2017 ; Safarzadeh *et al.*, 2018 ; Zahran *et al.*, 2020).

Figure 59 : Courbes de Kaplan-Meier montrant le taux de survie globale chez les patientes atteintes de cancer du sein, en fonction des différents stades (I,II,III,IV), présentant un %MDSCs inférieur à 1% (A) ou supérieur à 1% (B). (Gonda *et al.* 2017)



L'hypothèse d'un rôle biomarqueur prédictif des MDSCs a été soulevée par différentes études concernant l'efficacité de différents traitements ou encore l'apparition de récurrence tumorale. L'étude de Sade-Feldman *et al.* (2016) a montré que les patients atteints de mélanome de stade IV et ayant un faible %MDSCs, présentaient une réponse objective au traitement à base d'ipilimumab et un meilleur taux de survie que les patients ayant un fort %MDSCs. A l'inverse, Passaro *et al.* (2020) ont montré que chez les patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules, un %G-MDSCs était associé de manière significative à une efficacité objective du traitement à base de nivolumab (inhibiteur de point de contrôle immunitaire), contrairement aux patients ne présentant pas de fort taux de MDSC. Romano *et al.* (2010) montrent qu'une élévation du nombre absolu initial de MDSCs dans le sang est significativement corrélée avec les résultats obtenus par TEP près deux cycles de chimiothérapie chez les patients atteints de lymphome Hodgkinien, et permet donc de prédire la réponse à la chimiothérapie. Enfin, Yamauchi *et al.* (2018) montrent que le %MDSCs initial pourrait être prédictif de l'apparition d'une récurrence tumorale après intervention chirurgicale chez les patients atteints de carcinome rectal.

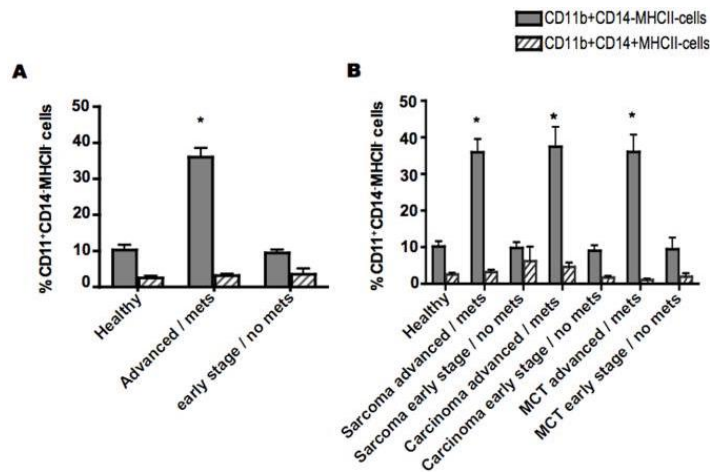
La littérature manque cependant d'apport concernant un éventuel rôle du %MDSCs dans le suivi des patients atteints de processus néoplasique. Le %MDSCs étant corrélé à la charge tumorale, un suivi longitudinal des patients en cours de traitement ou ayant achevé leur thérapie pourrait montrer une hausse du %MDSCs chez les patients présentant une récurrence ou un développement métastatique.

- *Le rôle biomarqueur des MDSCs chez le chien.*

Chez le chien, six études ont eu pour objet d'observer les MDSCs dans un contexte de processus néoplasique depuis 2012.

La première étude concernant les MDSCs chez le chien a été effectuée par Goulart *et al.* en 2012, observant 45 chiens atteints de processus tumoral (18 sarcomes, 7 carcinomes, 5 mastocytomes cutanés, dont 30 tumeurs considérées comme avancées, et 15 peu avancées). Les cellules considérées comme étant les MDSCs avaient pour phénotype suivant : CD11b⁺ CMHII⁺ CD14⁻. Le caractère immunosuppresseur de ces cellules a été confirmé par expérience de co-culture en présence de lymphocytes T autologues ou hétérologues, dont l'activité fut réduite en cas de présence des MDSCs dans le milieu de culture. Les processus néoplasiques de stade avancé montraient une augmentation significative de %MDSCs (36,04%) par rapport aux chiens sains (10,24%) et aux tumeurs de stade peu avancé (9,24%). Une même augmentation significative était enregistrée pour chaque type tumoral (sarcomes, carcinomes, mastocytomes) de stade avancé par rapport aux chiens sains et aux processus tumoraux de stade peu avancé. Aucune différence significative n'a été observée concernant les cancers peu avancés par rapport aux chiens sains (figure 60).

Figure 60 : Diagrammes en boîte représentant les %MDSCs parmi les groupes de chiens sains et atteints de tumeur. (Goulart *et al.*, 2012)



Mets : Métastases, MCT : mastocytome cutané. (* indique une différence significative avec $p < 0,001$)

Une seconde étude effectuée par les mêmes auteurs, Goulart *et al.* (2019), a mis en évidence un phénotype différent pour les M-MDSCs et les G-MDSCs. Les M-MDSCs ont pour phénotype CD5⁻ CD21⁻ MHCII⁻ CD11b⁺ CD14⁺ CADO48A⁻ et les G-MDSCs identifiées ont pour phénotype CD5⁻ CD21⁻ MHCII⁻ CD11b⁺ CD14⁻ CADO48A⁺. En effet, les marqueurs CD5 et CD21 permettent d'identifier les lymphocytes T, B et des cellules dendritiques. Le marquage MHCII⁻ permet de confirmer le caractère immature des MDSCs, le marquage CD11⁺ confirme l'appartenance de ces cellules à la lignée myéloïde, le marqueur CD14 correspond au marqueur des monocytes, et enfin le marqueur CADO48A correspond au marqueur des granulocytes neutrophiles.

Leur caractère immunosuppresseur a été vérifié à nouveau par des expériences de co-culture de ces deux types cellulaires (M-MDSCs et G-MDSCs) en présence de lymphocytes T, similaires à ce qui avait été décrit en 2012. D'autre part, une observation microscopique des deux types cellulaires a été réalisée après tri par cytométrie de flux, correspondant à leur aspect microscopique attendu (figure 61).

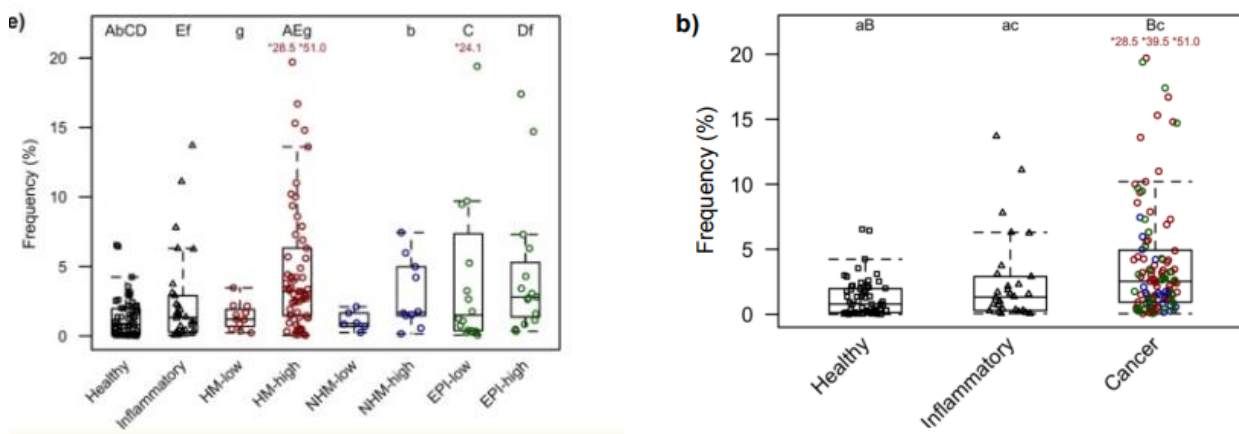
Figure 61 : Préparations de cytocentrifugation de MDSCs triées par cytométrie de flux, avec une morphologie de G-MDSCs (PMN-MDSC à gauche) et M-MDSCs (à droite), barre d'échelle : 10 µm. (Goulart *et al.*, 2019)



Cette étude de Goulart *et al.* (2019) a inclus 118 chiens atteints de processus tumoral, 40 atteints de processus inflammatoire non néoplasique, et 56 chiens sains. Différents types tumoraux ont été étudiés (tumeurs mésoenchymateuses/mésodermiques hématopoïétiques HM, tumeurs mésoenchymateuses/ mésodermiques non hématopoïétiques NHM, et tumeurs épithéliales EPI) ainsi que le caractère avancé ou peu avancé de l'atteinte tumorale (atteinte tumorale peu avancée définie par un stade I et II pour les lymphomes, et les tumeurs solides non métastatiques ; atteinte tumorale avancée définie par un stade III ou IV pour les lymphomes, et les tumeurs solides métastatiques).

Concernant les G-MDSCs, Goulart *et al.* (2019) ont pu montrer que le pourcentage de G-MDSCs parmi les cellules mononucléées du sang (%G-MDSC) était significativement augmenté chez les chiens atteints de processus tumoral par rapport aux chiens sains. Aussi, tel qu'en témoigne la figure 62, les HM avancées ont montré une augmentation significative de %G-MDSC par rapport aux HM peu avancées, tandis que cette augmentation en fonction de l'avancement tumoral n'était pas significative concernant les tumeurs NHM et EPI. Seules les tumeurs HM avancées et EPI avancées ont montré une augmentation significative de %G-MDSC par rapport aux maladies inflammatoires non néoplasiques, les processus néoplasiques peu avancés et les tumeurs NHM avancées n'ont pas montré de telle augmentation. Enfin, parmi les processus tumoraux peu avancés, seules les tumeurs EPI ont montré une augmentation significative de %G-MDSC par rapport aux chiens sains (figure 62).

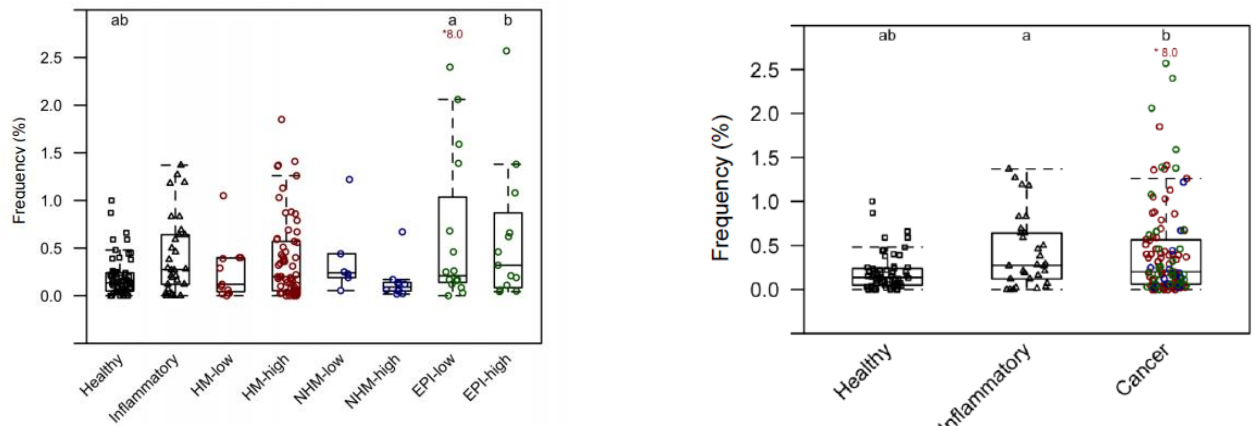
Figure 62 : Diagrammes en boîte représentant des %G-MDSCs parmi les différents groupes sains, inflammatoire non néoplasique, et tumeur. (Goulart *et al.*, 2019)



HM : tumeurs mésoenchymateuses/mésodermiques hématopoïétiques, NHM : tumeurs mésoenchymateuses/mésodermiques non hématopoïétiques, EPI : tumeurs épithéliales. Les lettres majuscules et minuscules indiquent une différence significative avec respectivement $p < 0,001$ et $p < 0,05$.

Concernant les M-MDSCs, seules les tumeurs EPI avancées et peu avancées ont montré une augmentation significative de %M-MDSCs par rapport aux chiens sains. Aucune autre différence significative n'a été notée entre les différents groupes (figure 63).

Figure 63 : Diagrammes en boîte représentant des %M-MDSCs parmi les différents groupes : sain, inflammatoire non néoplasique, et tumeurs. (Goulart *et al.*, 2019)



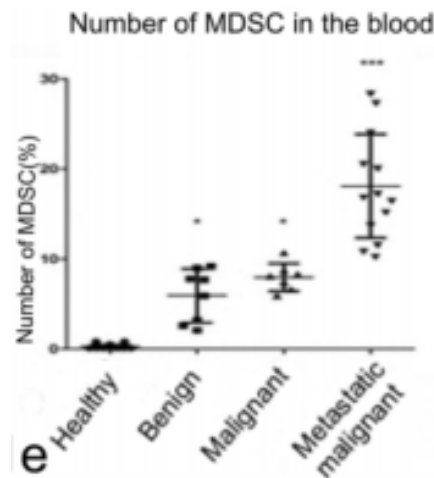
HM : tumeurs mésenchymateuses/mésodermiques hématopoïétiques, NHM : tumeurs mésenchymateuses/mésodermiques non hématopoïétiques, EPI : tumeurs épithéliales. Les lettres minuscules indiquent une différence significative avec $p < 0,05$.

Il est à noter que les taux de cellules de type $CD11b^+ CMHII^- CD14^+$, correspondant aux M-MDSCs et dont les fréquences furent bien moindres que les %G-MDSCs, n'ont pas montré de différence significative entre les différents groupes étudiés.

L'équipe de Sherger *et al.* (2012) a également montré que le pourcentage de MDSC parmi les cellules mononuclées du sang (7,9%, cellules marquées $CD11b^{low}/CADO48A^{low}$) chez 40 chiens atteints de tumeurs (sarcomes, carcinomes et mélanomes buccaux) étaient significativement augmenté par rapport à un groupe de 40 chiens sains (3,6%). Aucune différence significative n'a été observée entre les %MDSCs des groupes sarcomes, carcinomes et mélanomes buccaux.

Les trois études précédemment mentionnées ont inclus un grand nombre de types tumoraux différents. De manière intéressante, deux études ont été réalisées concernant exclusivement les tumeurs mammaires par Mucha *et al.* (2014) et Mucha *et al.* (2016), en considérant les MDSCs de phénotype $CD11b^+ Gr1^+ CD33^+$, (marqueurs de la lignée myéloïde et d'immaturité) après vérification de leur caractère immunosuppresseur. La première, publiée en 2014, a étudié un groupe de 27 tumeurs malignes et a montré une augmentation significative de %MDSCs par rapport aux chiens sains, et que le %MDSCs augmentait de manière importante avec le stade tumoral : 0,35% chez les chiens sains, et 5,94%, 8,13%, 15,69% et 15,44% chez les chiens atteints respectivement de tumeur mammaire de stade I, II, III et IV. La deuxième étude a confirmé une augmentation significative du %MDSCs chez les chiens atteints de tumeurs mammaires bénignes, malignes non métastatiques et malignes métastatiques par rapport aux chiens sains, avec une augmentation marquée du %MDSCs chez les chiens présentant une affection métastatique (figure 64).

Figure 64 : Comparaison des taux de MDSCs parmi les cellules mononucléées du sang chez des chiens sains par rapport aux chiens atteints de tumeur mammaire bénigne, maligne sans signe de métastase, et malignes avec métastases. * signifie $p < 0,05$, * signifie $p < 0,001$. (Mucha *et al.*, 2016)**



Enfin, l'étude de Hutchison *et al.* (2019) a observé les MDSCs par le même marquage que Goulart *et al.* c'est-à-dire les M-MDSCs étant considérées de phénotype MHCII⁻ CD11b⁺ CD14⁺ et les G-MDSC de phénotype MHCII⁻ CD11b⁺ CD14⁻. Les 33 chiens atteints de mélanomes étudiés ont montré une augmentation significative de %M-MDSC et de %G-MDSC par rapport à 30 chiens sains (figure 65). Aucune différence significative n'a été observée entre les chiens atteints de mélanomes de stade I/II et de stade III/IV. De même, aucune différence significative n'a été observée entre les chiens atteints de mélanome à haut ou à bas indice mitotique. Aussi, de manière similaire à ce que présente l'étude de Goulart *et al.* (2019), l'augmentation des G-MDSCs était plus marquée que l'augmentation des M-MDSC lors de processus néoplasique. Par ailleurs, cette étude est la première à montrer chez le chien une diminution des %M-MDSCs et %G-MDSCs au cours du traitement, consistant en une injection vaccinale contre le mélanome, tous les mois pendant quatre mois (figure 66). Toutefois, l'origine de la diminution au cours du protocole de vaccination n'est pas clairement établie. En effet, la diminution observée apparaît dès la première injection vaccinale, alors que la réponse immunitaire attendue n'est censée être obtenue qu'après la deuxième et troisième injection. Ainsi, la diminution du %MDSCs observée n'est probablement pas due à la réduction de la charge tumorale après une unique injection. Les auteurs supposent que cette diminution précoce est imputable à la présence de CpG dans le vaccin (un oligonucléotide composé d'une base cytosine liée à une base guanine utilisé en tant qu'adjuvant immunostimulateur), dont la capacité à induire une maturation et une différenciation des MDSCs a été montrée dans le modèle murin. Ainsi, il est possible que l'évolution dynamique des MDSCs au cours de ce traitement ne reflète pas la réponse de la tumeur au traitement, mais soit imputable à un effet direct du traitement sur ces cellules.

Figure 65 : Diagrammes à boîte montrant les %M-MDSC (A) et %G-MDSC (B) chez les chiens atteints de mélanome (MM) et les chiens sains (Control). Le diagramme en boîte, les barres verticales et les points en A et B représentent l'écart interquartile, les 10e et 90e percentiles et les valeurs aberrantes. * signifie $p \leq 0,001$. (Hutchison *et al.*, 2019)

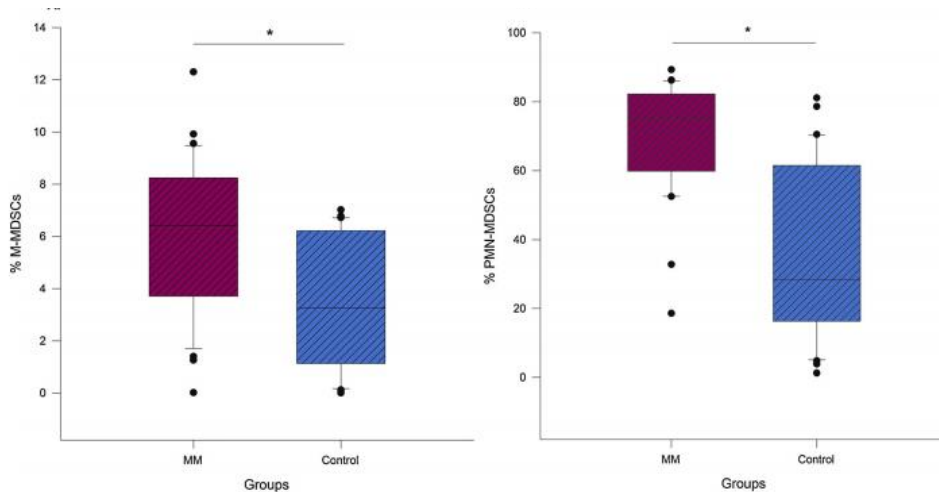
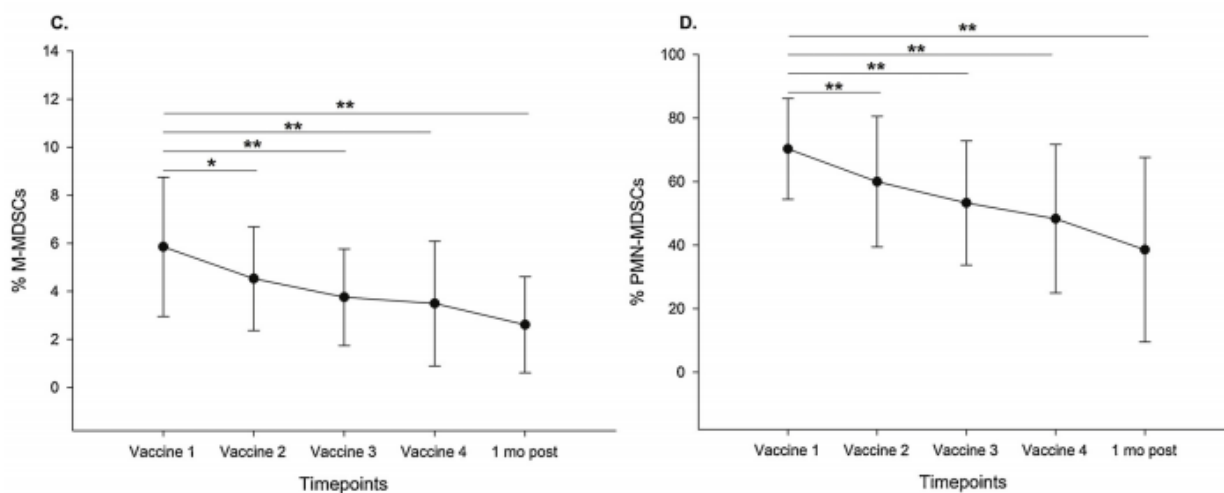


Figure 66 : Diagramme de dispersion montrant l'évolution du %M-MDSC (C) et %G-MDSC (D) au cours du protocole de traitement chez 33 chiens atteints de mélanome. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. (ANOVA * $p = 0.003$, ** $p < 0.001$).



En conclusion, les MDSCs sont des cellules cruciales, impliquées dans l'échappement tumoral, et dont le taux sanguin est aisément dosable par cytométrie en flux. Chez l'Homme ces cellules ont montré une capacité diagnostique modérée, à travers des sensibilités et spécificités modestes pour la détection de processus tumoraux. Toutefois, les capacités pronostiques du %MDSCs sanguin ont largement été démontrées, ainsi que leur capacité de prédire la réponse aux traitements en fonction de leur taux initial. Aussi, bien que leur augmentation soit plus marquée pour les processus néoplasiques avancés, leur impact pronostique n'a pas été clairement établi parmi les

chiens atteints d'une tumeur. Enfin, leur utilité en termes de suivi au cours d'un traitement n'a pas pu être clairement établie chez l'Homme comme chez le chien.

Ainsi, des études supplémentaires sont nécessaires notamment chez le chien pour confirmer les résultats obtenus, étudier l'impact pronostique des MDSCs et leur intérêt dans le suivi des animaux sous traitement. De plus, des essais cliniques sont nécessaires pour déterminer l'utilité clinique du dosage des MDSCs dans la gestion des patients atteints de processus néoplasique. En effet, les études suggèrent jusqu'à présent une augmentation significative du %MDSCs chez les chiens atteints de processus néoplasiques avancés. Il serait intéressant d'étudier le %MDSCs en tant que biomarqueur diagnostique d'une atteinte néoplasique avancée, soit présentant dissémination métastatique, pour guider les choix des cliniciens dans la gestion de ces patients. C'est dans cette démarche que s'inscrit ce travail de thèse ; la partie suivante vise à analyser le %MDSCs dans le sang de chiens atteints de processus néoplasiques peu avancés et avancés en comparaison à celui obtenu chez des chiens sains, en continuité avec le travail effectué par Clémence Nadal (Nadal, 2018) ayant permis d'attester de la possibilité de dosage des MDSCs par cytométrie de flux au sein du Biopôle de l'Enva.

Deuxième partie : étude expérimentale

1. Introduction

Le travail proposé ici a débuté en Septembre 2018, suite à la thèse vétérinaire de Clémence Nadal (2018) qui a mis au point un protocole pour identifier et calculer le %MDSCs parmi les cellules myéloïdes CD11b⁺ du sang périphériques (CMySPs) de chiens au sein du Biopôle de l'ENVA à l'aide de la cytométrie en flux (Nadal, 2018).

La présente étude avait pour but d'étudier les %MDSCs chez des chiens atteints de processus tumoraux, et plus précisément :

- 1) Etudier la différence de %MDSCs entre les chiens sains et les chiens atteints de processus tumoraux tout type confondu;
- 2) Etudier la différence de %MDSCs entre les chiens atteints de processus tumoraux peu avancés et les chiens atteints de processus tumoraux avancés ;
- 3) Etudier la différence de %MDSCs entre les chiens sains et les chiens atteints de certains types d'atteinte tumorale ; les tumeurs mammaires, les tumeurs mammaires bénignes, les tumeurs mammaires malignes, les mastocytomes, et les lymphomes ;
- 4) Etudier la performance du %MDSCs en tant que biomarqueur diagnostique précoce d'une atteinte tumorale chez le chien, c'est-à-dire sa capacité à différencier les chiens sains des chiens atteints de processus tumoraux peu avancés, à l'aide d'une courbe ROC ;
- 5) Observer l'évolution du %MDSCs au cours d'un traitement de chimiothérapie chez deux chiens.

2. Matériels et méthodes

A. Cohortes de chiens

a. Chiens sains de la cohorte 2017

Les résultats concernant les chiens sains du travail de Clémence Nadal ont été repris ici. En effet, les différentes techniques, consommables et appareils utilisés pour ce travail étant les mêmes, il a été décidé de conserver le même groupe témoin.

Les chiens sains, âgés d'au moins un an, ont été sélectionnés au sein des chiens présentés au service de médecine préventive, sur la base de l'absence de symptôme rapporté par le propriétaire et d'un examen clinique ne présentant aucune anomalie.

b. Chiens atteints de tumeurs, cohorte 2019/2020

- *Critères d'inclusion et constitution des groupes*

Les chiens malades ont été prospectivement recrutés au CHUVA durant les années 2018 et 2019, au sein des chiens spontanément présentés par leur propriétaire aux services de médecine interne et de chirurgie et diagnostiqués comme atteints d'une tumeur.

Plusieurs groupes de chiens ont été créés dans le but d'étudier indépendamment le %MDSCs en fonction du stade de l'affection tumorale d'une part, puis le %MDSCs pour certains types tumoraux d'autre part. Ainsi, deux groupes ont été créés en fonction du statut avancé ou peu avancé de l'affection tumorale d'autre part : « Processus néoplasiques peu avancés » et « Processus néoplasiques avancés ». Puis, des groupes ont été créés en fonction du type de cancer : un groupe « Tumeurs » incluant les chiens atteints de tout type de processus tumoral, un groupe « Mastocytomes », un groupe « Tumeurs mammaires de tout type », un sous-groupe « Tumeurs mammaires bénignes », un sous-groupe « Tumeurs mammaires malignes » et enfin un groupe « Lymphomes ».

Le type de cancer (carcinome, sarcome, tumeur à cellule ronde, autres) a été établi par analyse cytologique ou histologique. Le stade des processus tumoraux a été déterminé par des examens d'imagerie (radiographies thoraciques, échographie abdominale, ou examen tomodensitométrique) associés à la réalisation de cytoponctions (pour une analyse cytologique) ou de biopsies (pour une analyse histologique) si nécessaire (nœuds lymphatiques, rate ou foie par exemple).

Les cancers non métastasés, ainsi que les lymphomes de stade I (un seul nœud lymphatique touché) ou II (plusieurs nœuds lymphatiques touchés dans une même région) furent considérés comme « peu avancés ». Les cancers métastasés et les lymphomes de stade III (lymphadénopathie généralisée), IV (envahissement hépatique et/ou splénique) ou V (envahissement médullaire, sanguin ou d'organe non hématopoïétique) furent considérés comme « avancés ».

La distinction entre les chiennes atteintes de tumeurs mammaires bénignes et celles atteintes de tumeurs malignes a été effectuée sur la base des observations histologiques réalisées par le secteur d'anatomopathologie du BioPôle.

Les chiens recevant un traitement anti-inflammatoire stéroïdien (AIS) ou non stéroïdien (AINS) ont été inclus dans l'étude, et l'information était reportée. En effet, d'après Goulart *et al*, (2012), les chiens recevant un traitement anti-inflammatoire n'ont pas montré de différence en termes de %MDSCs par rapport aux chiens ne recevant pas de traitement.

Les critères d'exclusion furent les suivants :

- Présence d'une pathologie inflammatoire concomitante au processus tumoral ;
- Présence de plusieurs atteintes tumorales concomitantes ;
- Séances de chimiothérapies réalisées antérieurement au prélèvement sanguin.

D'autre part, les chiens n'ayant pas reçu de bilan d'extension complet ont été exclus des groupes étudiant le %MDSCs en fonction de l'état d'avancement du processus tumoral. Les chiennes présentant une tumeur mammaire n'ayant pas été analysée par examen histologique ont été exclues des groupes de chiennes présentant une tumeur mammaire classées en fonction du caractère bénin ou malin de la tumeur.

- *Procédure réalisée*

Pour chaque chien inclus dans l'étude, 2 à 5 mL de sang ont été prélevés sur tube EDTA, à la veine jugulaire ou à la veine saphène externe. Les analyses effectuées dans le cadre de cette étude ont pu être réalisées à partir du sang non utilisé dans le cadre de la démarche diagnostique et thérapeutique (entre 2 et 4 mL). L'étude n'a eu aucune influence sur les mesures diagnostiques ou thérapeutiques appliquées à ces animaux et leur inclusion dans l'étude n'a induit aucun traitement supplémentaire, aucune douleur ou manipulation inutile.

D'autre part, deux chiens malades ont été suivis au cours de leur traitement, et un dosage du %MDSCs a été effectué lorsqu'une quantité de sang suffisante était disponible après numération – formule sanguine, préalablement effectuée à chaque séance de chimiothérapie.

B. Technique de dosage des MDSCs

a. Isolement et marquage des MDSCs

- *Isolement des cellules mononuclées par Ficoll :*

Chaque échantillon sanguin a été placé dans un environnement à 4°C, et pris en charge dans les 24h maximum.

Dans un premier temps, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) ont été isolées par gradient de Ficoll. 4mL de sang dilué au ½ avec une solution de tampon phosphate (PBS) est déposé délicatement à la surface de 3ml de solution de Ficoll. Cette préparation est ensuite centrifugée pendant 20 minutes à 2000 rotations par minute (rpm), sans frein, et à 18°C. Les PBMCs forment alors un anneau blanc visualisable à l'interface du Ficoll et du plasma dilué. Cette

couche est prélevée et placée dans une solution de 5 mL de PBS. Deux lavages successifs sont effectués à l'aide de PBS. Après la dernière centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu avec une solution de Sérum de Veau Fœtal (SVF) + 5% diméthylsulfoxyde (DMSO) avant congélation à -80°C.

- *Marquage des MDSCs*

L'étude de Clémence Nadal *et al.* (2018) a montré qu'il était possible d'identifier par cytométrie en flux au Biopôle, les cellules parmi les PBMCs de chien présentant le phénotype CD11b⁺/CD14⁻/CMHII⁻, phénotype décrit par l'étude de Goulart *et al.* (2012) comme étant celui des MDSCs. C'est donc la même technique de marquage que nous avons reproduite ici.

Les PBMCs conservées en SVF+5% DMSO, sont décongelées quelques minutes à température ambiante, versées dans 5mL de PBS, puis centrifugées à 1200 rpm pendant cinq minutes à 4°C (cette même procédure de centrifugation sera utilisée pour toutes les centrifugations mentionnées par la suite). Le surnageant est jeté et le culot resuspendu dans 1 mL d'une solution de fixation à 1% de paraformaldéhyde puis laissé incuber durant une heure. Cette étape permet la fixation des cellules pour pouvoir ensuite réaliser le marquage avec les anticorps sans qu'elles perdent leur morphologie. Les cellules fixées sont ensuite lavées avec 4mL de tampon FACS (PBS+0,5%BSA, Bovine Serum Albumine) puis centrifugées. Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu dans 1 mL de tampon FACS. 500 µL sont prélevés et placés dans un premier tube (tube 1) qui ne sera pas marqué, et 500 µL sont placés dans un second tube (tube 2) qui subira les différents marquages successifs. Le tube 1 servira de témoin, attestant que le marquage des cellules du tube 2 a correctement été effectué. Les deux tubes sont alors centrifugés, le surnageant est éliminé, puis les cellules du tube 1 sont resuspendues dans 50 µL de tampon FACS.

La suite des manipulations concernera exclusivement les cellules contenues dans le tube 2. Les cellules du tube 2 sont resuspendues dans 50 µL de solution d'anticorps murin anti-CD11b canin (Mouse Anti-Dog CD11b, clone MCA 17775) diluée au 1/10^{ème} en tampon FACS, puis incubées durant 30 minutes dans l'obscurité. Cet anticorps n'étant pas couplé à un fluorochrome, un marquage par un second anticorps F(ab)'2 caprin dirigé contre les IgG de souris et lui-même couplé au fluorochrome PE (PhycoErythrine) est nécessaire. Cette forme d'anticorps permet d'éviter une fixation aspécifique sur les récepteurs à la partie Fc des IgG, présents sur les cellules myéloïdes, et donc de s'affranchir d'un bruit de fond indésirable. Ainsi, après deux lavages successifs à l'aide de 500 µL de tampon FACS puis centrifugation, 50 µL de solution d'anticorps F(ab)'2 Goat anti-Mouse IgG couplé PE, diluée au 1/100^{ème} en tampon FACS sont ajoutés, et une incubation de 30 minutes dans l'obscurité est réalisée. Pour finir, après deux lavages successifs dans 500 µL de tampon FACS, les cellules sont marquées par deux anticorps dilués tous deux au 1/20^{ème} : anti-CD14 (Mouse Anti-Human CD14, clone IMCA 1568) et anti-CMHII (Rat Anti-Dog MHC Class II, clone MCA 1044F), directement couplés respectivement aux fluorochromes A647 et FITC. Le tube est incubé 30 minutes dans l'obscurité.

Enfin, les deux tubes sont lavés une première fois dans 500 µL de tampon FACS et centrifugés, puis une deuxième fois dans 500 µL de PBS puis centrifugés. Les cellules contenues

dans les deux tubes sont alors suspendues dans 300 μ L de PBS pour l'acquisition au cytomètre de flux.

Les dilutions des différents marqueurs ont été choisies après plusieurs tests et contrôles menés lors des travaux précédents (Nadal, 2018).

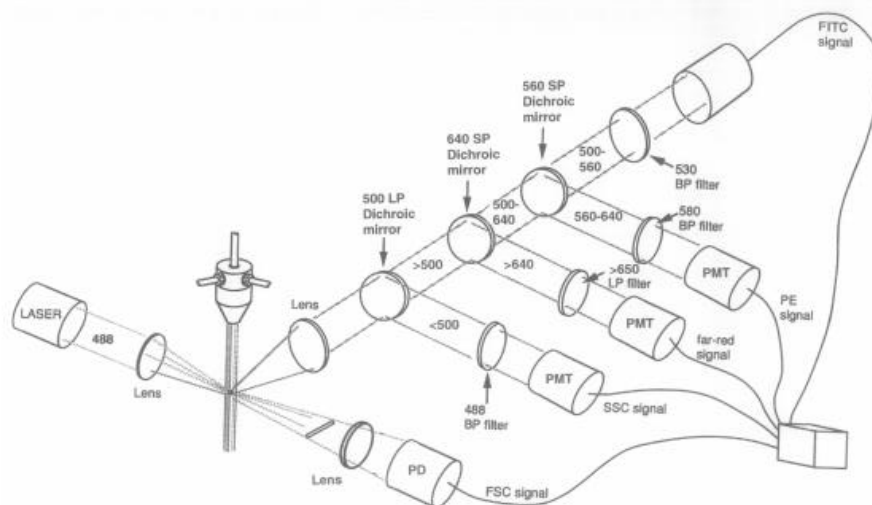
b. Cytométrie en flux – Principe et appareil

La cytométrie en flux est un outil permettant une analyse très précise de cellules en suspension. Elle est en outre couramment utilisée en médecine vétérinaire pour la réalisation des hémogrammes, et peut également être utilisée afin de déterminer certains types cellulaires à l'aide de marqueurs spécifiques, notamment le type de lymphocytes impliqués dans un lymphome.

Cet outil s'appuie sur les caractéristiques physiques des cellules. En effet, les cellules en suspension sont aspirées dans une gaine de très petit diamètre, permettant à chaque cellule d'être individualisée. Ces cellules passent dans la gaine à une vitesse variable choisie par l'opérateur, pouvant atteindre 10 000 cellules par seconde. Enfin, chaque particule (dont les cellules) passe devant une ou plusieurs sources lumineuses. La lumière au contact de la cellule est alors diffusée de deux manières : une première lumière diffusée aux petits angles, soit très peu déviée, et dont l'intensité est fonction de la taille de la cellule, apporte cette première information à travers un détecteur placé face à la source lumineuse. Un deuxième canal optique (chemin que la lumière peut suivre depuis la cellule jusqu'à un détecteur) est diffusé à 90°, dont l'intensité reflète la forme de la cellule, sa structure interne et sa granulosité. De plus, les fluorochromes portés par les cellules marquées produisent une lumière sous l'effet de l'excitation lumineuse, d'une longueur d'onde unique. C'est par le canal optique diffusé à 90° que cette lumière sera détectée. En effet, ce dernier va passer par un système de plusieurs filtres disposés en série. Chacun d'eux, placés à 45° par rapport à la trajectoire du faisceau lumineux, est capable de refléter une certaine longueur d'onde vers un détecteur, et de laisser passer le reste du spectre de longueur vers les filtres suivants. Ainsi, la ou les fluorescences (en fonction du nombre de fluorochromes différents fixés) qu'émet la cellule seront détectées grâce à plusieurs détecteurs de longueurs d'onde précises (figure 67, d'après Givan, 2001). Ainsi, chaque cellule a pu transmettre une information quant à sa taille, sa forme, son contenu, sa granulométrie, et les différents fluorochromes qu'elle porte. Ces informations sont retranscrites sous forme de cytogrammes, où chaque point représente une cellule et est placé suivant sa taille et sa granulométrie, ou en fonction des différents fluorochromes portés, comme nous le verrons ci-après.

Figure 67 : Schéma du fonctionnement des systèmes de filtres et détecteurs d'un cytomètre en flux (Givan *et al.*, 2001)

Le cytomètre utilisé dans cette étude est le cytomètre BD Accuri C6 Plus, commercialisé par



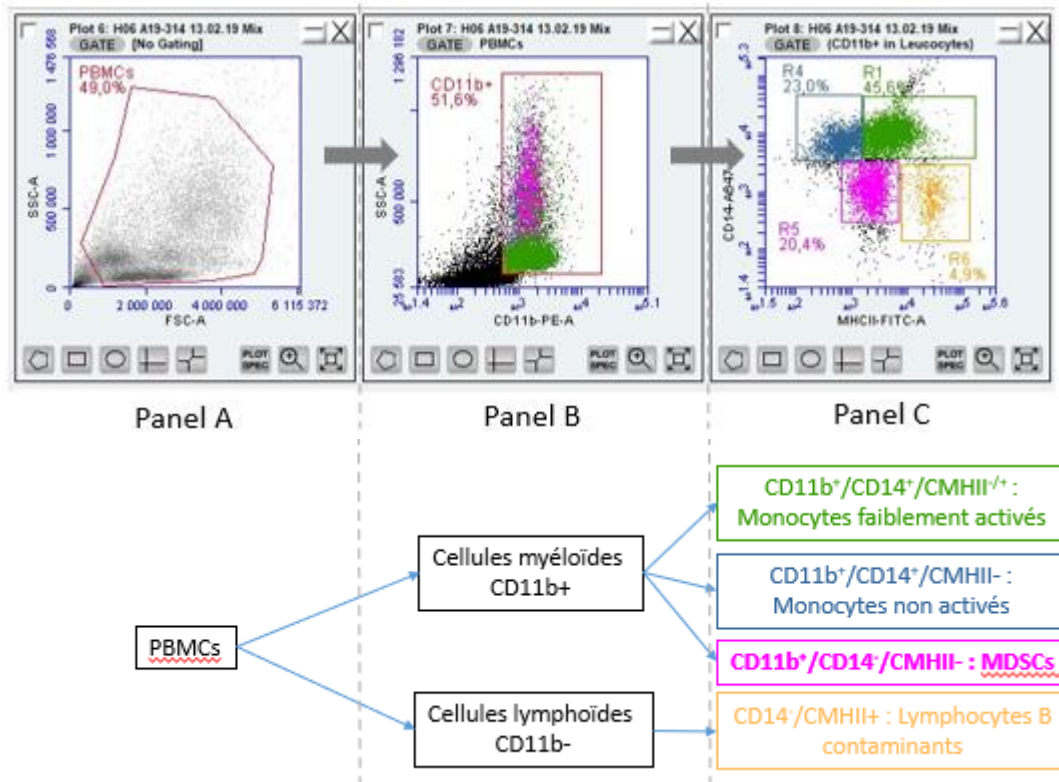
Becton Dickinson. Il comprend un laser bleu émettant à 488 nm, un laser rouge émettant à 640 nm, et un système de quatre détecteurs de fluorescences avec des filtres optiques optimisés pour la détection de nombreux fluorochromes couramment utilisés, notamment FITC, PE, PerCP-Cy™ 5.5 et APC, ainsi que de nouveaux colorants polymères tels que BD Horizon Brilliant™ Blue 515. Les données numériques transmises par le cytomètre sont interprétées à l'aide du logiciel d'analyse BD Accuri C6 Plus, fourni par la même compagnie. Le cytomètre est contrôlé tous les mois par une personne responsable, et un nettoyage SIP Clean est assuré après chaque utilisation.

c. Méthode de « gating »

Les différentes fenêtres utilisées pour la sélection des cellules CD11b⁺/CD14⁻/CMHII⁻ et exposées ci-après ont été établies par l'étude de Clémence Nadal en 2018, et reprises dans cette étude. Le premier cytogramme (à gauche de la figure 68, panel A) représente chaque cellule par un point, placé en fonction de sa taille (FSC, en abscisses) et de sa granulosité (SSC, en ordonnées). Les points placés en bas à gauche du cytogramme sont donc des particules de petite taille et de faible granulosité, considérées comme des cellules mortes et débris cellulaires. Une première sélection peut donc être faite en traçant une fenêtre (P3) isolant les éléments de taille et granulométrie correspondant à des cellules viables (PBMCs). Cette fenêtre contient donc toutes les cellules mononucléées correctement conservées contenues dans l'échantillon analysé, sans distinction particulière. Un deuxième cytogramme (panel B, figure 68) est alors généré par le logiciel à partir des cellules précédemment sélectionnées (PBMCs). Ce graphique place alors ces cellules en fonction de l'expression du marqueur CD11b (CD11b-PE-A, en abscisses) et de leur granulosité (SSC-A, en ordonnées). Sont alors sélectionnées les cellules exprimant le marqueur CD11b, soit les cellules CD11b⁺, et présentant une granulosité attendue pour les cellules myéloïdes présentes dans les PBMCs, à l'aide de la fenêtre R2. Un nouveau cytogramme est alors généré à partir des cellules CD11b⁺ précédemment sélectionnées (panel C, figure 68). Il place les cellules CD11b⁺ en

fonction de l'expression des marqueurs CMHII (en ordonnées) et CD14 (en abscisses). Les seuils de positivité ou négativité pour les différents marquages ont été établis d'après les travaux de Nadal, 2018, permettant ainsi de définir les populations présentes sur le panel C.

Figure 68 : Cytogramme représentant la méthode de gating chez un chien atteint de carcinome transitionnel



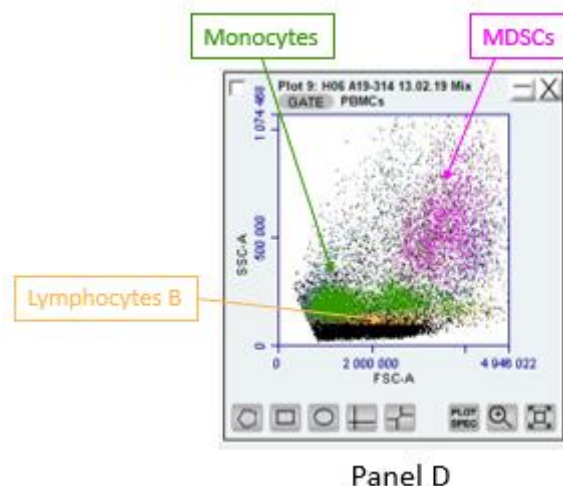
Ainsi, comme le montre la figure 68 précédente, les cellules sont séparées :

- En bleu, les cellules de phénotype CD11b⁺/CD14⁺/CMHII⁻ correspondant aux monocytes activés
- En vert, les cellules de phénotype CD11b⁺/CD14⁺/CMHII⁺, correspondant aux monocytes faiblement activés
- En rose, les cellules de phénotype CD11b⁺/CD14⁻/CMHII⁻, correspondant aux MDSCs
- En jaune, les cellules de phénotype CD11b⁻/CD14⁻/CMHII⁺, correspondant à des lymphocytes B contaminants, ayant été sélectionnés dans le cadre définissant les cellules myéloïdes CD11b⁺ alors qu'appartenant aux cellules lymphoïdes CD11b⁻.

Un dernier cytogramme (panel D, figure 69) remplace les cellules sélectionnées en R1, R2, R3 et R4 dans la fenêtre P3 du premier cytogramme, permettant de s'assurer qu'elles présentent une taille et une granularité incompatibles avec des cellules mortes, et ainsi d'affirmer leur intégrité. Sur

la figure 69, les cellules d'intérêt (en rose) présentent une taille et une granularité compatibles avec celles de MDSCs.

Figure 69 : Vérification position des différentes populations selon taille et granulosité parmi les PBMCs



C. Analyses statistiques

Pour chaque groupe de chien considéré, les différentes valeurs associées aux pourcentages de MDSCs (médianes, quartiles, écarts-types, minimum et maximum) ont été obtenues grâce au logiciel Excel® (Microsoft Corporation). Le tracé des diagrammes en boîte à moustache permettant de visualiser sur le même graphique la médiane, l'espace inter-quartile (EIQ) entre le 1er et 3ème quartile et les valeurs extrêmes des pourcentages mesurés pour chaque groupe étudié a été réalisé grâce au logiciel de statistiques XLSTAT® (Version 2020.1) sous Excel®. Des analyses ont ensuite été réalisées avec le même logiciel de statistiques XLSTAT afin de comparer les médianes des différents groupes mentionnés ci-dessus. La distribution des valeurs de %MDSCs obtenues dans le groupe de chiens sains et dans le groupe de chiens atteints de processus néoplasique ne suivant pas la distribution d'une loi Normale (figure 72), les tests de comparaisons de médianes de Mann-Whitney (comparaison de deux populations) et de Kruskal-Wallis (comparaison d'un nombre de populations au moins égal à trois) ont été choisis, toujours effectués à l'aide du logiciel XLSTAT®. Une différence entre deux médianes a été considérée comme significative dès lors qu'une valeur $p \leq 0,05$ était obtenue, avec un risque d'erreur α de 5%. Enfin, l'analyse des sensibilités et spécificités ainsi que l'élaboration de la courbe ROC ont également été effectués à l'aide du logiciel XLSTAT®.

D. Approbation

Ce protocole a reçu l'approbation du Comité d'Ethique pour la Recherche Clinique (ComERC, 2018-04-09).

3. Résultats

A. Etude caractéristique des cohortes

a. Cohorte des chiens sains

Dix-huit chiens sains ont été inclus dans cette étude. Les caractéristiques de cette cohorte sont exposées dans le tableau 7 ci-dessous :

Tableau 7 : Caractéristiques des chiens sains

Age – Moyenne (valeurs limites)	4 ans (4 mois – 8 ans)
Genre	
Femelle	7
Mâle	11
Race	
Berger Australien	2
Berger Blanc Suisse	1
Boxer	1
Cane Corso	2
Cavalier King Charles	1
Braque français X Malinois	1
Epagneul Breton	1
Labrador	2
Malinois	1
Croisé Malinois	1
Setter Gordon	2
Shi Tzu	1
Croisé	2
Total	18

b. Cohorte des chiens atteints de processus néoplasiques

Un prélèvement sanguin a pu être effectué sur 45 chiens présentant un processus néoplasique. Tous les chiens ont présenté un résultat exploitable à l'analyse par cytométrie en flux. Les caractéristiques de ces chiens sont présentées dans le tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8 : Caractéristiques des chiens présentant un processus tumoral

Age – Moyenne (valeurs limites)	9,0 ans (2 – 15)
Genres	
Femelle	32
Mâle	13
Races	
Bouledogue Français	5
Rottweiler	1
American stafforshire terrier	4
Croisé Cane Corso	1
Labrador	1
Jack Russel Terrier	2
Pinscher nain	1
Croisé golden retriever	1
Yorkshire terrier	3
Croisé	2
Berger Belge Malinois	1
Croisé caniche	1
Coton de Tulear	1
Croisé berger belge	1
Griffon Korthals	1
Boxer	3
Bull Terrier	1
Caniche nain	1
Croisé cocker	1
Berger australien	3
Croisé épagneul	1
Croisé griffon	1
Bouvier Bernois	2
Siberian Husky	1
Bichon	1
Cocker Anglais	1
Fox terrier	1
Bulldog Américain	1
Staffordshire Bull Terrier	1
Total	45

Les différentes atteintes tumorales des 45 chiens prélevés sont exposées dans le tableau 9 ci-dessous.

Tableau 9 : Liste des différentes atteintes tumorales incluses dans l'étude

Type de tumeurs	Nombre de chiens atteints
Carcinome urothélial	4
Carcinome pulmonaire	1
Carcinome épidermoïde nasal	1
Carcinome prostatique	1
Carcinome mammaire	4
Tumeurs mammaires non analysées	4
Adénome mammaire	6
Tumeur mammaire mixte bénigne	1
Fibro-myxosarcome	1
Chondrosarcome nasal	1
Mélanome buccal de haut grade	1
Mastocytome	8
Lymphome multicentrique	9
Lymphome nodal	1
Lymphome rectal	1
Leucémie dans contexte de lymphome splénique	1
Plasmocytome solitaire osseux	1
Total	46

Trois chiens ont dû être exclus de cette étude : un chien atteint d'un adénocarcinome mammaire ainsi que d'un mastocytome cutané, un chien atteint de lymphome multicentrique de type B ayant reçu plusieurs traitements de chimiothérapie antérieurs au prélèvement sanguin, et un chien atteint de carcinome urothélial présentant une atteinte inflammatoire concomitante (péritonite, pancréatite et adénopathie abdominale généralisée). Les résultats de ces trois individus sont exposés en annexe 2.

Aussi, un chien, présentant un carcinome pulmonaire, n'a pas reçu de bilan d'extension par imagerie et est donc exclu des groupes établis en fonction du stade d'avancement. De la même manière, un chien atteint d'un carcinome transitionnel a révélé une discrète adénopathie iliaque sans analyse cytologique, ne permettant pas de différencier une origine réactionnelle d'une infiltration tumorale, et n'a donc pas pu être classé dans les groupes établis en fonction du stade d'avancement.

Quatre chiennes ont présenté des tumeurs mammaires qui n'ont pas pu être analysées en raison du refus d'acte chirurgical par les propriétaires, et dont le bilan d'extension n'a pas pu être réalisé. Ces chiennes ont donc été incluses dans les groupes « Tumeurs » et « Tumeurs mammaires » mais exclues lors de l'étude des affections néoplasiques en fonction du stade d'avancement et du type tumoral.

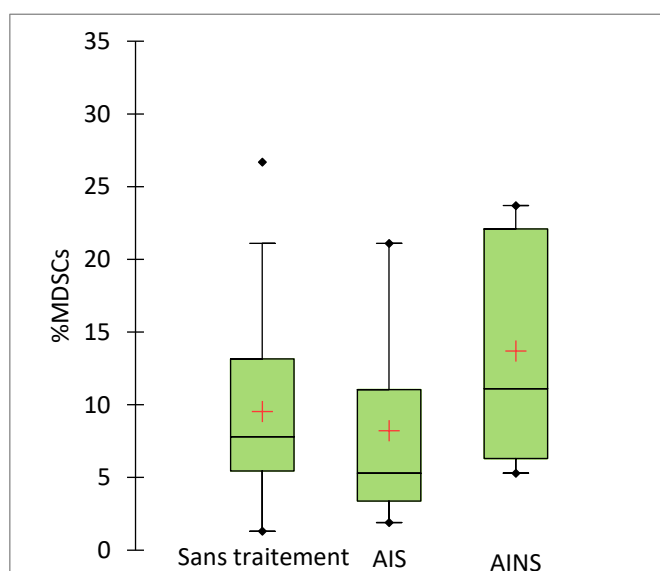
De plus, six chiens recevaient un traitement à base d'anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) au moment du prélèvement, et cinq autres chiens recevaient un traitement à base d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) au moment du prélèvement ou quelques jours auparavant. Ces chiens n'ont pas été exclus et l'information était relevée pour chaque animal (Tableau 10).

Tableau 10 : Caractéristiques des 11 chiens présentant un processus tumoral et recevant un traitement anti-inflammatoire au moment du prélèvement sanguin.

Type tumoral	%MDSCs	Traitement	Posologie
Adénocarcinome prostatique	2,90%	prednisolone	0,4mg/kg/j
Carcinome mammaire anaplasique	21,10%	prednisolone	1mg/kg/j
Lymphome multicentrique de haut grade	5,80%	prednisolone	1mg/kg q2jours
Leucémie myéloïde chronique dans un contexte de lymphome splénique	1,90%	méthylprednisolone	0,08mg/kg/j
Lymphome multicentrique de haut grade, st >=3	12,80%	prednisolone	0,6mg/kg/j
Carcinome transitionnel	4,80%	AIS non précisé	Non indiqué
Chondrosarcome nasal	5,30%	Piroxicam	0,3mg/kg/j
Carcinome urétral	6,30%	Piroxicam	0,3mg/kg/j
Carcinome transitionnel	23,70%	Meloxicam	0,1mg/kg/j
Lymphome multicentrique T de haut grade st.3 sstA	22,10%	Meloxicam	0,1mg/kg Arrêté 9 j avant le prélèvement
Tumeur mammaire non analysée	11,10%	Meloxicam	0,1mg/kg/j

Une étude de l'impact des anti-inflammatoires sur le %MDSCs a été effectuée en comparant les %MDSCs des chiens atteints d'un processus tumoral et recevant un traitement anti-inflammatoire d'une part et celui des chiens présentant un processus tumoral mais ne recevant de traitement anti-inflammatoire d'autre part (Figure 70).

Figure 70 : Diagramme en boîte comparant les %MDSCs des chiens avec traitements AIS (n = 6), AINS (n = 5), et sans traitement (n = 31).



Les boîtes vertes indiquent le premier et le troisième quartile, la barre horizontale indique la valeur médiane, l'extrémité des barres verticales indique le premier et le neuvième décile, les points indiquent les valeurs aberrantes, et la croix rouge indique la valeur de la moyenne.

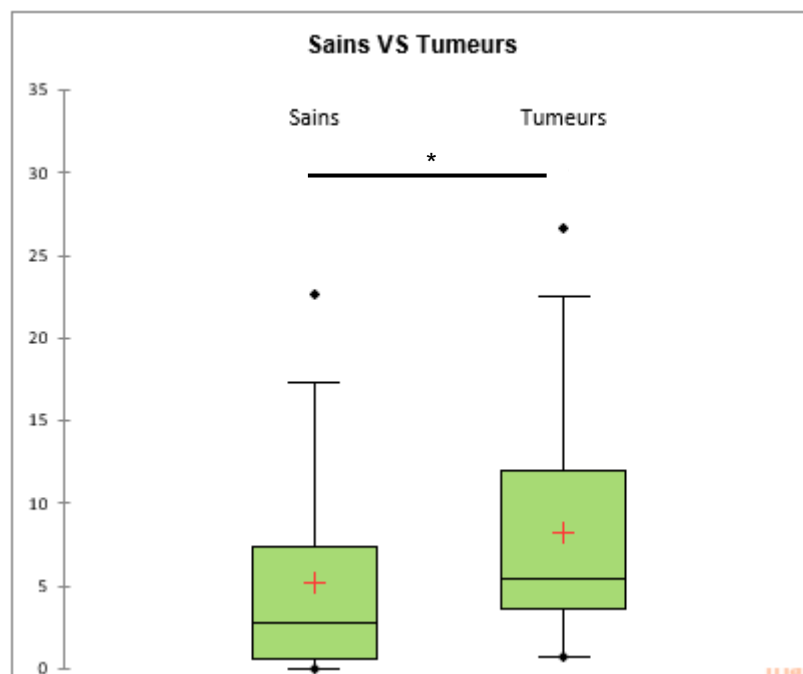
	Nombre d'individus	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	Médiane	1er Quartile	3e Quartile	Valeur p
Sans traitement	31	1,300	26,700	9,548	6,958	7,800	5,450	13,150	1,000
AIS	6	1,900	21,100	8,217	7,385	5,300	3,375	11,050	0,477
AINS	5	5,300	23,700	13,700	8,698	11,100	6,300	22,100	0,287

Ainsi, aucune différence significative n'a été constatée entre les %MDSCs des chiens sans traitement, et avec traitements anti-inflammatoires stéroïdiens ou non stéroïdiens.

B. Dosage des MDSCs chez les chiens sains et les chiens atteints de processus néoplasiques, processus néoplasiques avancés et peu avancés

Un total de 42 chiens présentant une atteinte néoplasique a été inclus dans cette étude. Les chiens atteints de processus néoplasiques ont montré une augmentation significative ($p = 0,015$) du taux de MDSCs (médiane = 5,45%, EIQ = [3,6 – 11,975] %) par rapport aux chiens sains (médiane = 2,8%, EIQ = [0,525 - 7,4] %), tel que présenté sur la figure 73.

Figure 71 : Diagramme en boîte montrant les valeurs de %MDSCs chez les chiens sains et les chiens atteints de processus néoplasiques.

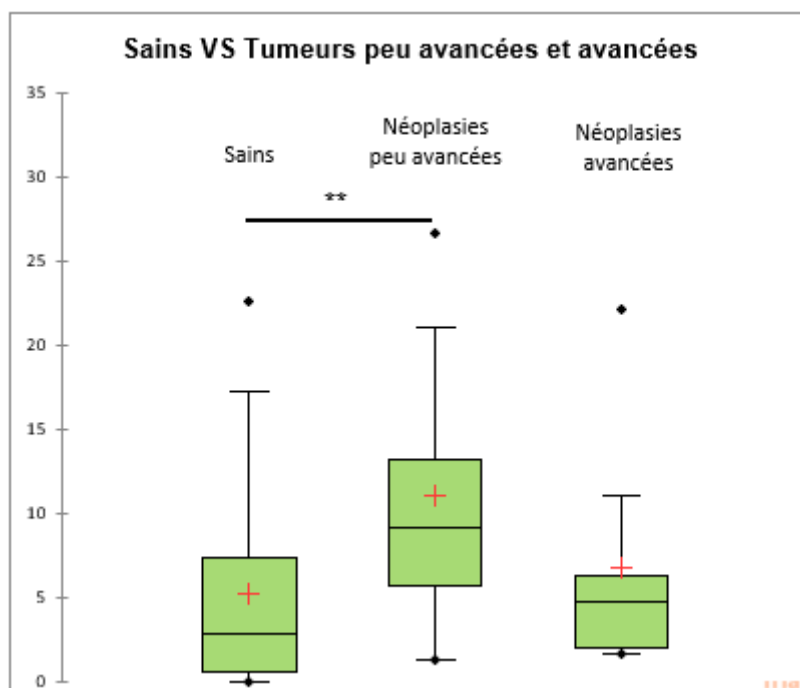


Les boîtes vertes indiquent le premier et le troisième quartile, la barre horizontale indique la valeur médiane, l'extrémité des barres verticales indique le premier et le neuvième décile, les points indiquent les valeurs aberrantes, et la croix rouge indique la valeur de la moyenne. * $p < 0,05$

	Nombre d'individus	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	1er Quartile	Médiane	3e Quartile	Valeur p
Sains	18	0,000	22,600	5,167	6,515	0,525	2,8	7,4	
Tumeurs	42	0,700	26,700	8,224	6,394	3,6	5,45	11,975	0,015

Parmi ces 42 chiens présentant une atteinte néoplasique, 36 ont pu être classés en fonction du degré d'avancement de la maladie. Ainsi, 23 ont été classés avec une maladie de stade peu avancé, et 13 avec une maladie de stade avancé. Comme le montre la figure 75, les chiens atteints de processus néoplasiques peu avancés ont montré une augmentation significative ($p = 0,001$) du %MDSCs (médiane = 9,10%, EIQ = [5,7 – 13,15] %) par rapport aux chiens sains (médiane = 2,8%, EIQ = [0,525 - 7,4] %). Les chiens atteints de processus néoplasiques avancés n'ont pas montré de différence significative du taux de MDSCs par rapport aux chiens sains (médiane = 4,8%, EIQ = [2,00 – 6,30] %, $p = 0,297$).

Figure 72 : Diagramme en boîte montrant les valeurs de %MDSCs chez les chiens sains, les chiens atteints de processus néoplasiques peu avancés (n = 23) et avancés (n = 13)

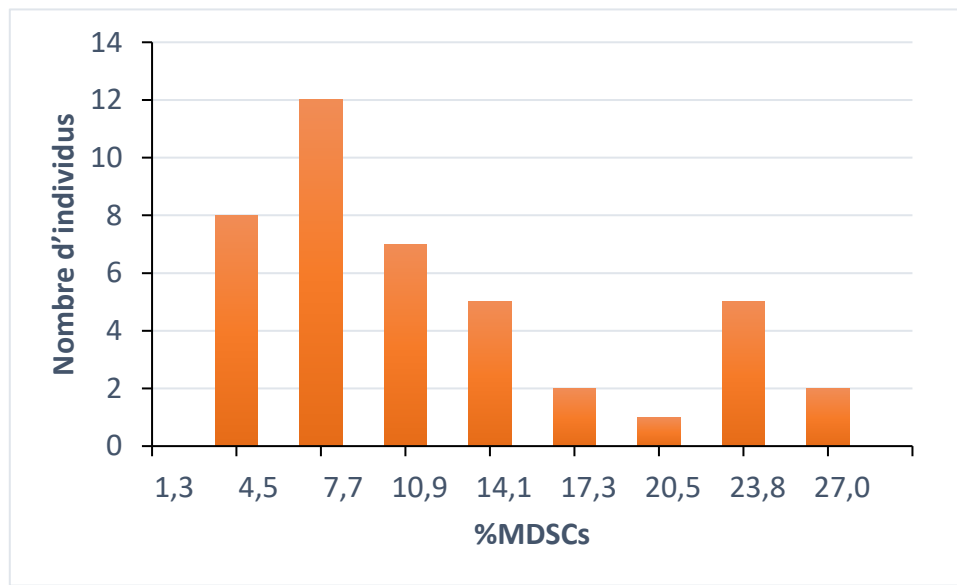


Les boîtes vertes indiquent le premier et le troisième quartile, la barre horizontale indique la valeur médiane, l'extrémité des barres verticales indique le premier et le neuvième décile, les points indiquent les valeurs aberrantes, et la croix rouge indique la valeur de la moyenne. ** $p \leq 0,001$

	Nombre d'individus	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	1er Quartile	Médiane	3e Quartile	Valeur p
Sains	18	0,000	22,600	5,167	6,515	0,525	2,8	7,4	
Néoplasies peu avancées	23	1,300	26,700	11,070	7,333	5,7	9,10	13,15	0,001
Néoplasies avancées	13	1,700	22,100	6,769	6,420	2,00	4,8	6,30	0,297

La distribution du %MDSCs au sein de la population de chiens atteints de processus néoplasiques a ensuite été étudiée (figure 76).

Figure 73 : Histogrammes montrant la distribution des valeurs du %MDSCs dans la population de chiens atteints de processus néoplasique (n = 42) .

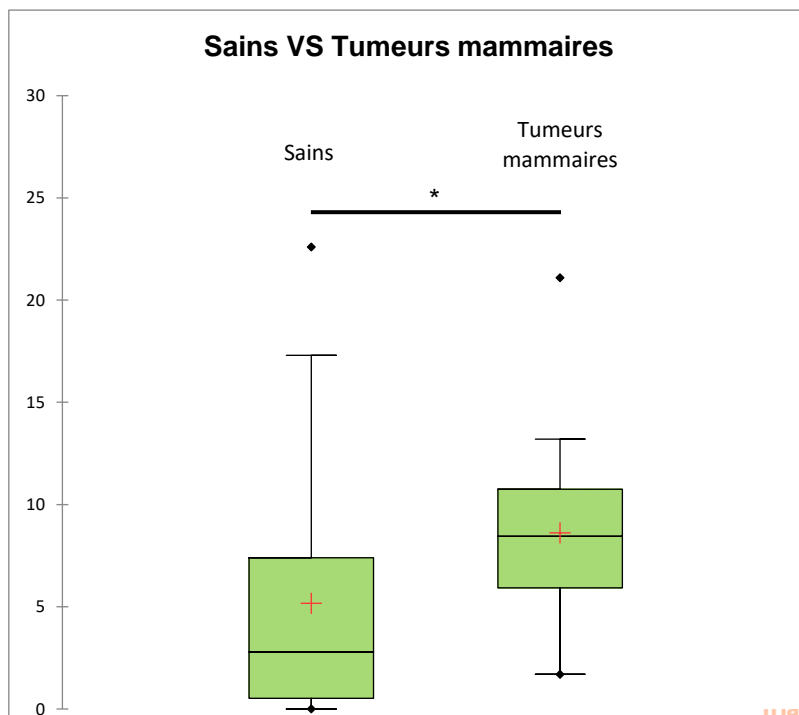


C. Comparaison entre les chiens sains et les chiens atteints de tumeurs mammaires, mastocytomes et lymphomes.

a. Comparaison entre chiens sains et chiennes atteintes de tumeurs mammaires

Le groupe de chiennes atteintes de tumeurs mammaires (TM, n = 14) a été comparé aux chiens du groupe sain puis divisé en sous-groupes de chiennes atteintes de tumeurs mammaires malignes (TMM, n = 3) et de tumeurs mammaires bénignes (TMB, n = 7) lorsque l'information était disponible.

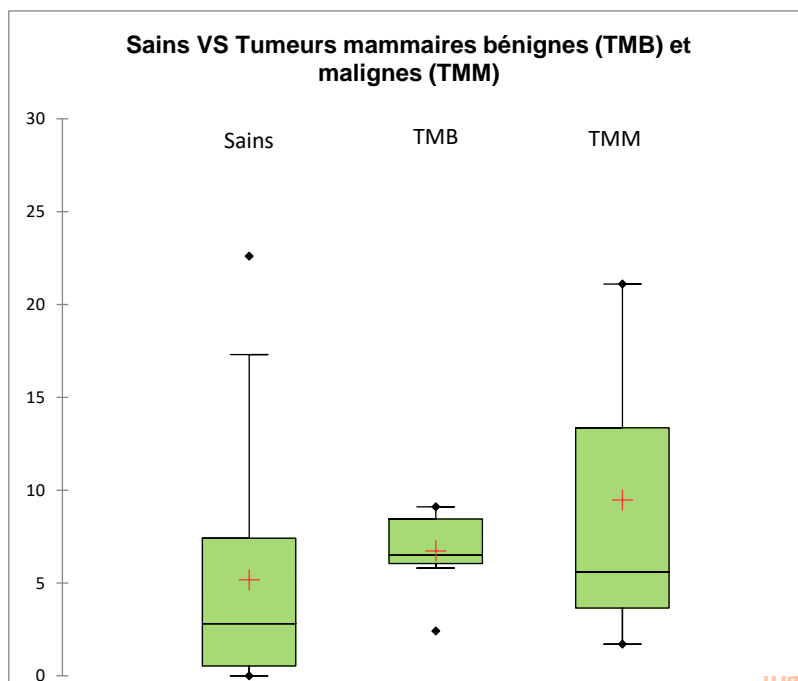
Figure 74 : Diagramme en boîte montrant les valeurs de %MDSCs chez les chiens sains et les chiens atteints de tumeurs mammaires (n = 14).



Les boîtes vertes indiquent le premier et le troisième quartile, la barre horizontale indique la valeur médiane, l'extrémité des barres verticales indique le premier et le neuvième décile, les points indiquent les valeurs aberrantes, et la croix rouge indique la valeur de la moyenne. * $p < 0,05$

	Nombre d'individus	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	1er Quartile	Médiane	3e Quartile	Valeur p
Sains	18	0,000	22,600	5,167	6,515	0,525	2,8	7,4	
Tumeurs mammaires	14	1,700	21,100	8,620	4,845	5,925	8,45	10,75	0,023

Figure 75 : Diagramme en boîte montrant les valeurs de %MDSCs chez les chiens sains et les chiens atteints de tumeurs mammaires bénignes (n = 7) et malignes (n = 3).



Les boîtes vertes indiquent le premier et le troisième quartile, la barre horizontale indique la valeur médiane, l'extrémité des barres verticales indique le premier et le neuvième décile, les points indiquent les valeurs aberrantes, et la croix rouge indique la valeur de la moyenne. * $p < 0,05$

	Nombres d'individus	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	1er Quartile	Médiane	3e Quartile	Valeur p
Sains	18	0,000	22,600	5,167	6,515	0,525	2,8	7,4	
TMB	7	2,40	9,10	6,71	2,32	6,05	6,50	8,45	0,103
TMM	3	1,70	21,10	9,47	10,26	3,65	5,60	13,35	0,383

Ainsi, comme le montrent les figures 77 et 78, les %MDSCs médians des groupes de chiens présentant une tumeur mammaire quelle que soit sa nature, une tumeur mammaire bénigne et une tumeur mammaire maligne sont plus élevés que celui des chiens sains. Toutefois, seul le groupe composé des chiennes atteintes de tumeurs mammaires sans distinction du statut bénin ou malin a montré une augmentation significative ($p < 0,05$) du %MDSCs. Aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes de chiennes atteintes de tumeurs mammaires.

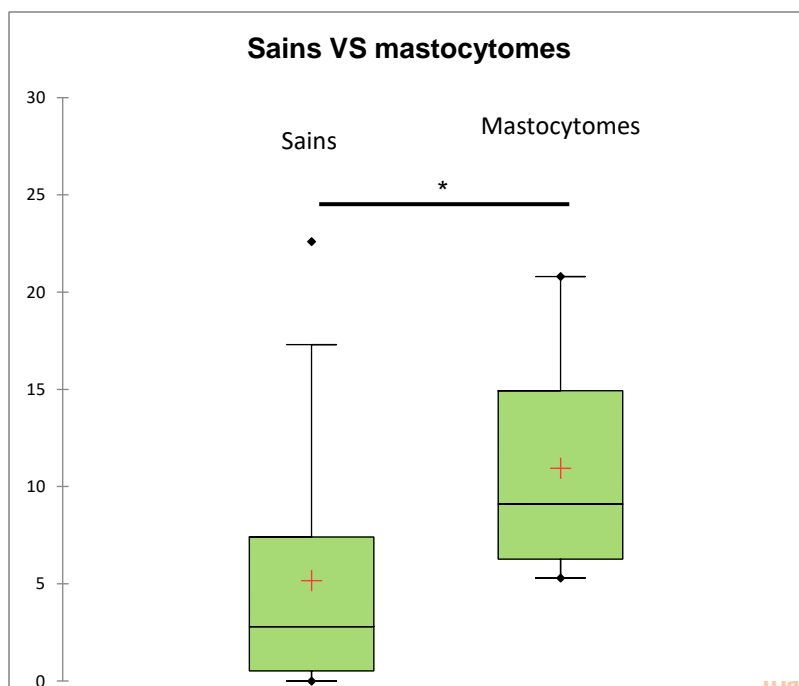
b. Comparaison entre chiens sains et chiens atteints de mastocytomes

Une comparaison entre les %MDSCs des chiens atteints de mastocytome (n = 7), dont les caractéristiques sont reportées dans le tableau 11 par rapport au groupe de chiens sains a été effectuée (figure 79).

Tableau 11 : Localisation, grade et stade des mastocytomes inclus dans cette étude

Chien	Localisation	Grade selon Kiupel	Stade
1	Cutané (péri-anal)	Haut	2
2	Cutané (face dorsale de la queue)	Haut	1 à 2 (cytoponction des nœuds lymphatiques non réalisable)
3	Cutané (4 masses en région abdominale ventrale)	Bas	Absence de bilan d'extension
4	Cutané (grasset gauche)	Bas	Absence de bilan d'extension
5	Cutané (pavillon auriculaire)	Haut	2
6	Cutané (pavillon auriculaire)	Bas	Absence de bilan d'extension
7	Cutané (fourreau)	Bas	Absence de bilan d'extension

Figure 76 : Diagramme en boîte montrant les valeurs de %MDSCs chez les chiens sains, les chiens atteints de mastocytomes.



Les boîtes vertes indiquent le premier et le troisième quartile, la barre horizontale indique la valeur médiane, l'extrémité des barres verticales indique le premier et le neuvième décile, les points indiquent les valeurs aberrantes, et la croix rouge indique la valeur de la moyenne. * $p < 0,05$

	Nombre d'individus	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	1er Quartile	Médiane	3e Quartile	Valeur p
Sains	18	0,000	22,600	5,167	6,515	0,525	2,8	7,4	
Mastocytomes	8	5,300	20,800	10,938	5,777	6,275	9,100	14,925	0,015

Ainsi, le groupe de chiens atteints de mastocytomes a montré dans cette étude une augmentation significative ($p = 0,015$) du %MDSCs par rapport aux chiens sains.

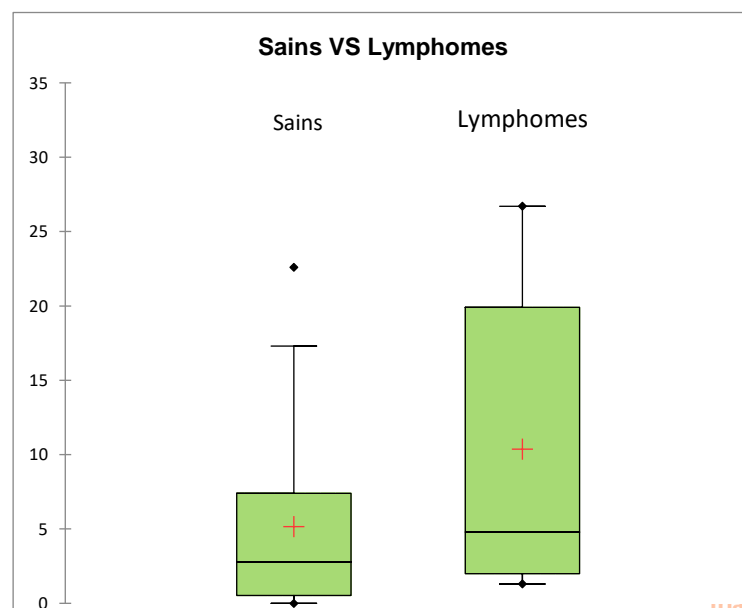
c. Comparaison entre chiens sains et chiens atteints de lymphomes

Une comparaison entre les %MDSCs des chiens atteints de lymphome ($n = 11$), dont les caractéristiques sont figurées dans le tableau 12 suivant, par rapport au groupe de chiens sains a été effectuée (figure 80).

Tableau 12 : Localisation, grade et stade des lymphomes inclus dans cette étude

Chiens	Type de lymphome	Phénotype	Grade	Stade
1	Multicentrique	B	Haut	4
2	Multicentrique	Non connu	Haut	Non connu
3	Multicentrique	Non connu	Haut	2
4	Multicentrique	B	Haut	4
5	Multicentrique	B	Haut	4
6	Multicentrique	T	Haut	3
7	Splénique	Non connu	Haut	5
8	Multicentrique	T	Haut	3
9	Nodal	T	Haut	3
10	Rectal	Non connu	Bas	2
11	Multicentrique	T	Haut	3

Figure 77 : Diagramme en boîtes montrant les valeurs de %MDSCs chez les chiens sains, et chez les chiens atteints de lymphomes (n = 11).



Les boîtes vertes indiquent le premier et le troisième quartile, la barre horizontale indique la valeur médiane, l'extrémité des barres verticales indique le premier et le neuvième décile, les points indiquent les valeurs aberrantes, et la croix rouge indique la valeur de la moyenne. * $p < 0,05$.

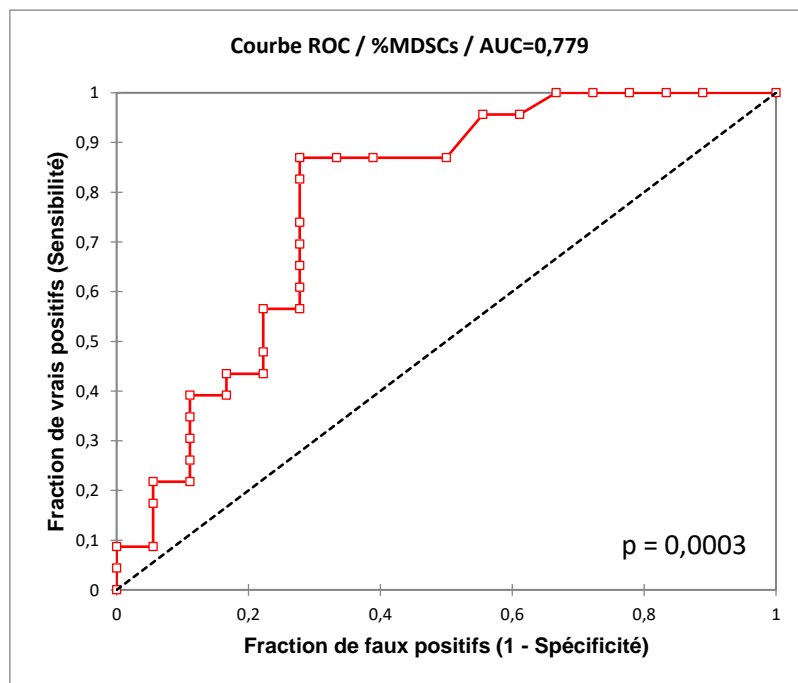
	Nb. d'observations	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	1er Quartile	Médiane	3e Quartile	Valeur p
Sains	18	0,000	22,600	5,167	6,515	0,525	2,800	7,400	1,000
Lymphomes	11	1,300	26,700	10,364	10,288	2,000	4,800	19,900	0,083

Ainsi, les chiens atteints de lymphomes présentent une augmentation non significative ($p = 0,083$) du %MDSCs par rapport aux chiens sains.

- *Performances diagnostiques*

Afin de déterminer les performances du %MDSCs en tant que biomarqueur diagnostique précoce d'une affection tumorale, une courbe ROC a été établie à partir des %MDSCs des chiens du groupe sain ($n = 18$) et ceux du groupe de chiens atteints de processus tumoral peu avancé ($n = 23$). Aucune valeur de coût différente de 1 n'a été affectée aux faux négatifs ni aux faux positifs ici.

Figure 78 : Courbe ROC évaluant les performances diagnostiques du %MDSCs pour la détection d'un processus néoplasique peu avancé.



Ainsi, l'aire sous la courbe ROC (ASC) a été calculée égale à 0,779 (IC95% = [0,627-0,931]), et est significativement différente de 0,5 ($p = 0,0003$). Ceci permet d'attester que le %MDSCs

présente une capacité à faire la différence entre les chiens sains et les chiens atteints de processus néoplasique peu avancé. La valeur seuil optimale de %MDSCs a été estimée à 5,30% pour la détection de processus néoplasique. Pour cette valeur seuil, la sensibilité a été estimée égale à 87,0%, et la spécificité à 72,2%. Un diagramme des fractions des vrais positifs, vrais négatifs, faux positifs et faux négatifs en fonction des valeurs seuils ainsi que la table des sensibilités et spécificités en fonction des différentes valeurs seuils possibles figurent en annexe 2.

D. Suivi du dosage de MDSCs chez deux chiens

a. Chien 1

Un suivi a pu être effectué chez deux chiens. Tout d'abord, un bouledogue français de 6 ans atteint d'un mastocytome cutané de haut grade selon Kiuppel (grade III selon Patnaik) sans métastase visible à l'échographie. Une exérèse chirurgicale a été effectuée sept jours après le diagnostic, considérée comme complète d'après l'analyse histologique. Huit prélèvements sanguins ont été réalisés entre J0 la date du diagnostic et J112 (figure 82). Ce chien a reçu un traitement à base de vinblastine (agent alkylant, poison du fuseau mitotique qui inhibe la polymérisation de la tubuline en microtubules empêchant la division cellulaire) à la dose 2mg/m² toutes les semaines pendant quatre semaines, puis toutes les deux semaines pendant huit semaines. Durant le suivi qu'il a été possible de réaliser, le taux de MDSCs initialement égal à 20,3% avant traitement a chuté et s'est maintenu entre 2,5 et 4,7% durant tout le suivi sous traitement. Un développement métastatique a été observé par échographie et cytoponctions 35 jours après la fin de la période d'observation (J112), avec une infiltration des nœuds lymphatiques lombo-aortique, iliaques et coliques, de la rate, et possiblement du foie. Un suivi de la numération des lignées sanguines rouge et blanche a été effectué à chaque visite avant traitement, le suivi de la numération leucocytaire est reporté figure 83.

Figure 79 : Suivi du taux de MDSCs chez un chien atteint de mastocytome cutané au cours du traitement, du 10/10/2018 au 30/01/2019

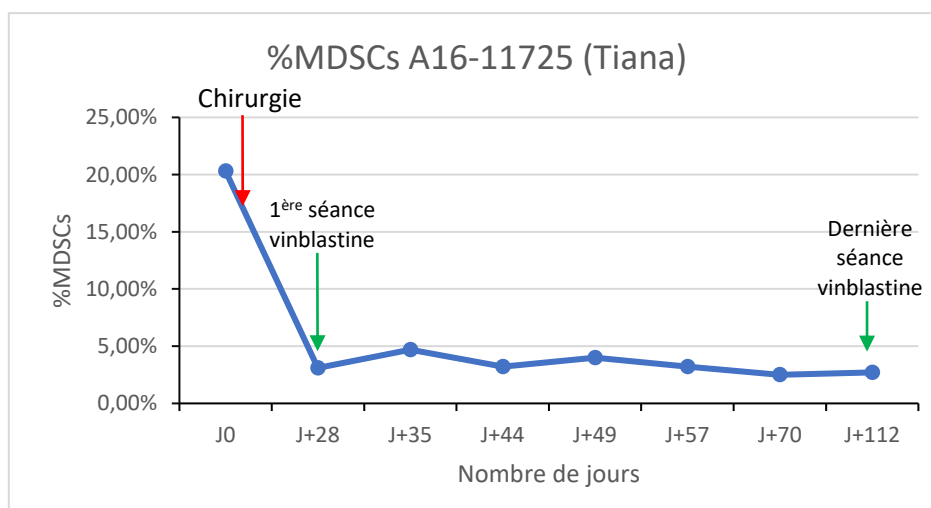
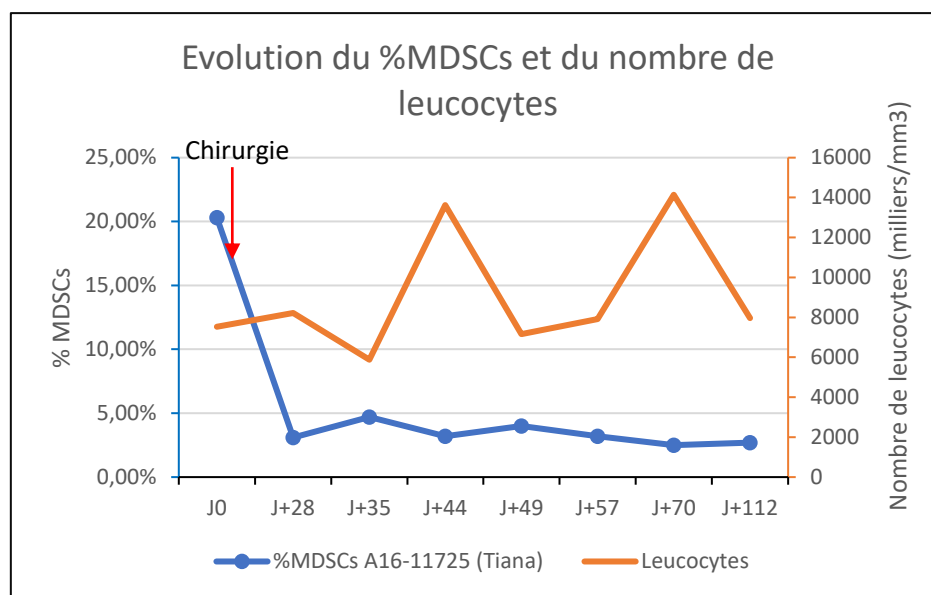


Figure 80 : Suivi du taux de MDSCs et des numérations leucocytaires chez un chien atteint de mastocytome cutané au cours du traitement, de J0 (diagnostic) à J112



b. Chien 2

Le second chien suivi est un chien Rottweiler de 7 ans, présenté pour dyschésie dont l'exploration diagnostique a révélé un lymphome rectal de type B de haut grade. Une discrète adénopathie iliaque a été identifiée initialement par examen tomодensitométrique, compatible principalement avec une adénopathie réactionnelle, sans analyse cytologique associée. Ce chien a reçu un traitement suivant un protocole CHOP à base de cyclophosphamide, vincristine et doxorubicine. Au total, 14 prélèvements sanguins ont été réalisés entre J0, date de l'induction, et J358, soit sur une période d'environ un an. Le taux initial de MDSC était de 24,9%, puis ce taux a connu des variations au cours du suivi, mesuré entre 1,8% et 19,1%. Une récurrence sous forme de multiples petits nodules rectaux d'environ 5 mm a été diagnostiquée au cours de la période d'observation, à J84, reportée sur le graphique de la figure 84. Cette récurrence fut contrôlée par un passage à un protocole L-CHOP (ajout de la L-asparaginase), et un dernier suivi effectué par coloscopie à J357 n'a pas révélé de récurrence. De la même manière, un suivi de la numération des lignées sanguines rouge et blanches a été effectué à chaque visite avant traitement, le suivi de la numération leucocytaire est reporté figure 85.

Figure 81 : Suivi du taux de MDSCs chez un chien atteint de lymphome rectal au cours du traitement, du 7/11/2018 au 30/10/2019

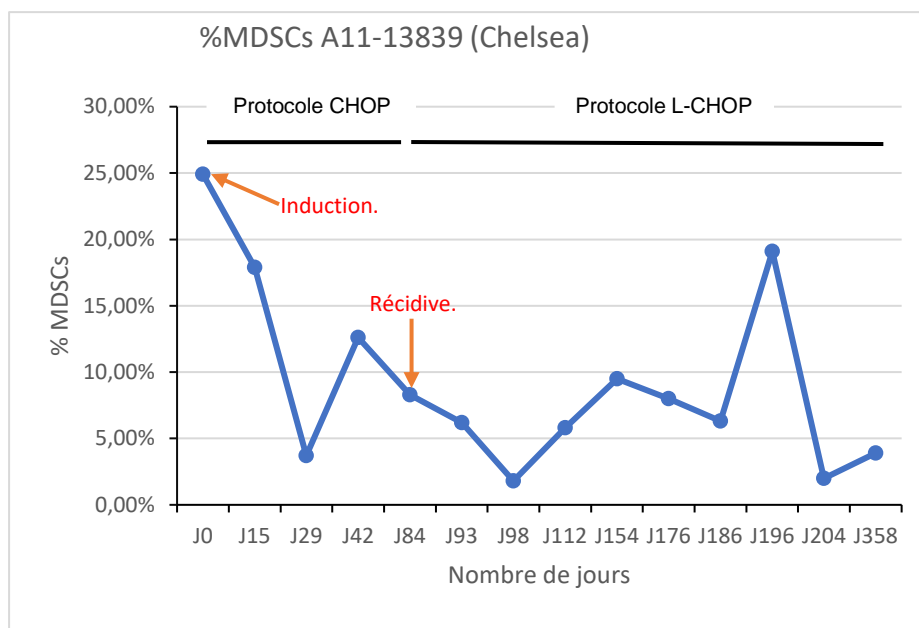
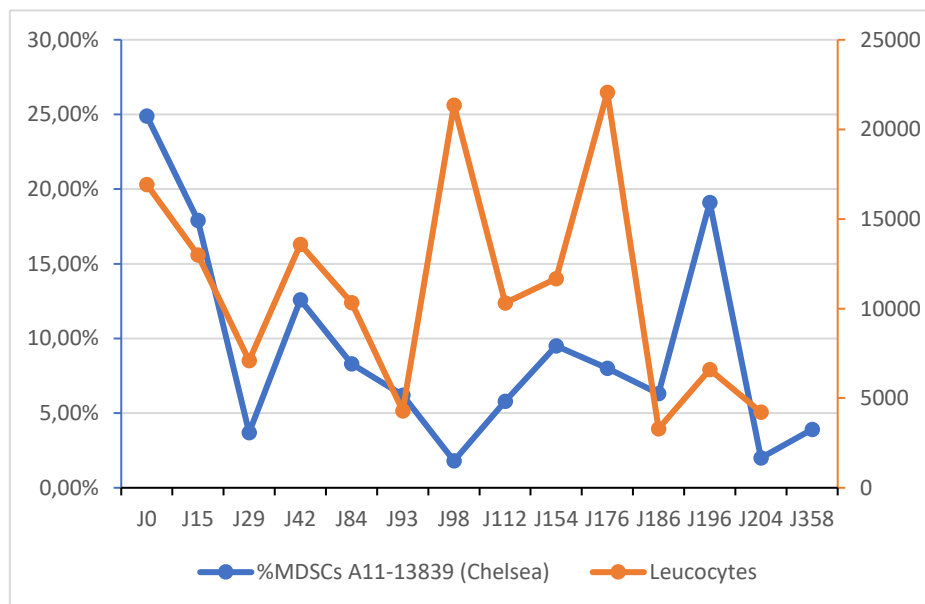


Figure 82 : Suivi du taux de MDSCs et de la numération leucocytaire chez un chien atteint de lymphome rectal au cours du traitement, du 7/11/2018 au 30/10/2019.



Ainsi, les %MDSCs chez ces deux chiens ont montré une évolution dynamique comprenant d'importantes variations au cours du traitement. L'évolution de la numération sanguine leucocytaire semblent ne montrer aucune corrélation avec l'évolution du %MDSCs chez le premier chien atteint de mastocytome cutané traité chirurgicalement puis par un traitement à base de vinblastine. Toutefois, il semblerait que cela ne soit pas vérifié chez le chien atteint de lymphome rectal traité par protocole de chimiothérapie CHOP ; les numérations leucocytaires et neutrophiliques semblent suivre l'évolution du %MDSCs au cours du temps. Lors du suivi de ce dernier, un premier pic du %MDSCs (12,60%) est noté 5 semaines après le début de la chimiothérapie, précédant de six semaines la détection d'une récurrence locale du lymphome rectal. Toutefois, un second pic (19,10%) à 6,5 mois de traitement est enregistré, et aucun signe de récurrence locale n'a été observé depuis.

4. Discussion

A. Valeurs des %MDSCs chez les différents groupes de chiens étudiés

La présente étude a eu pour objectif de mesurer le taux circulant de MDSCs (%MDSCs) chez des chiens sains et chez des chiens atteints de processus tumoraux. Nous avons pour cela appliqué le procédé et le marquage employés dans l'étude de Goulart *et al.* (2012). Ainsi, d'après cette étude, les cellules marquées CD11b⁺/CD14⁻/CMHII⁻ ont été considérées comme étant les MDSCs. D'après l'étude de Goulart *et al.* (2019), ce phénotype correspond au sous ensemble G-MDSCs, puisque le marqueur CD14 est présent sur les cellules de la lignée des monocytes et les M-MDSCs sont donc de phénotype CD11b⁺/CD14⁺/CMHII⁻. Le marqueur CADO48A est le marqueur spécifique des cellules polynucléaires neutrophiles. Son utilisation aurait ainsi permis de distinguer les G-MDSCs et les M-MDSCs de manière plus précise, toutefois cet anticorps n'étant pas disponible commercialement, nous n'avons pas pu y avoir recours dans cette étude.

Les valeurs médianes de %MDSCs circulants parmi les cellules mononucléées du sang périphérique myéloïdes CD11b⁺, ont été mesurées dans cette étude à 2,8% ; EIQ = [0,525 - 7,400] % chez les chiens sains ; 5,45% (EIQ = [3,6 - 11,975] %) chez les chiens atteints de tous processus néoplasiques confondus ; 9,10% (EIQ = [5,7 - 13,15] %) chez les chiens atteints de processus néoplasiques peu avancés, et 4,8% (EIQ = [2,00 - 6,30] %) chez les chiens atteints de processus néoplasiques avancés.

Ces valeurs sont différentes des valeurs citées dans l'étude de Goulart *et al.* (2012) concernant les chiens sains et les chiens atteints de processus néoplasiques avancés (sains : 10,24% ± 1,4212 ; cancers avancés : 36,04% ± 2,542), mais sont concordantes par rapport aux valeurs obtenues chez les chiens présentant un processus néoplasique peu avancé (cancers peu avancés : 9,40% ± 0,953 d'après Goulart *et al.*, 2012). Les valeurs avancées dans notre étude sont par ailleurs nettement supérieures à celles obtenues dans l'étude de Goulart *et al.* (2019) (sains : 0,78%, EIQ = [0,13 - 1,95] % ; cancers : 2,53%, EIQ = [0,93 - 4,94] %) et nettement inférieures à celles exposées par l'étude de Hutchison *et al.* (2019) (sains : médiane > 20% ; mélanomes : >70%,

valeurs non exactes obtenues par lecture graphique). Ces différences peuvent être imputées aux populations cellulaires servant de base au calcul des pourcentages des différentes sous-populations. En effet, il apparaît que les études de Goulart *et al.* calculent les %MDSCs à partir du nombre de PBMCs total, que l'étude de Hutchison *et al.* (2019) a calculé les %MDSCs à partir du nombre de cellules myéloïdes immatures marquées comme CD11b⁺/CMHII⁻, tandis que notre étude calcule les %MDSCs à partir du nombre de cellules myéloïdes présentes dans l'échantillon, soit les cellules CD11b⁺. Par ailleurs, les éventuelles différences de résultats peuvent être imputées aux différentes techniques utilisées ainsi qu'aux différents types de cancers étudiés : les deux études de Goulart *et al.* ont isolé les cellules mononucléées du sang total par gradient de densité à l'aide de deux solutions de Ficoll différentes avant dénombrement par cytométrie de flux, tandis que l'étude de Hutchinson *et al.* (2019) a réalisé le dénombrement des MDSCs par cytométrie de flux directement à partir des échantillons de sang total, et uniquement chez des chiens atteints de mélanomes. Il serait intéressant, dans un souci d'homogénéiser les résultats et de les rendre comparables, d'établir un consensus identifiant les populations cellulaires servant de base au calcul des %MDSCs, et de convenir de méthodes de référence pour doser les MDSCs.

B. Comparaison des valeurs de %MDSCs entre les différents groupes de chiens étudiés, et performance diagnostique.

De manière plus générale, l'étude présentée ici indique que les chiens atteints de processus tumoraux montrent une augmentation significative du %MDSCs par rapport aux chiens sains (5,45% (EIQ = [3,6 – 11,975] % *versus* 2,8%, EIQ = [0,525 - 7,400]%, $p = 0,015$). En considérant les chiens présentant une affection néoplasique de stade peu avancé, une augmentation significative du %MDSCs par rapport aux chiens sains est également notée (9,10% (EIQ = [5,7 – 13,15] % *versus* 2,8%, EIQ = [0,525 - 7,400] %, $p = 0,001$), contrairement aux chiens atteints de processus tumoraux de stade avancé. Ceci pourrait être expliqué par le fait que cette étude s'est particulièrement intéressée aux chiens atteints de processus néoplasiques en stade précoce, ayant constitué un lot relativement important et homogène de chiens dans cette situation ($n = 23$) alors que le nombre de chiens présentant une affection de stade avancé est relativement faible ($n = 13$). Il est toutefois à souligner que ces deux groupes présentent un taux de recouvrement important, et que le %MDSCs est proche et inférieur à 10% dans les 2 groupes. Ce travail doit être suivi d'une seconde étude, s'intéressant à un groupe plus important et homogène de chiens présentant une atteinte néoplasique de stade avancé. Ceci dans le but d'investiguer le potentiel du %MDSCs à identifier ces derniers individus par rapport aux individus présentant une atteinte de stade précoce, et ainsi adapter le pronostic et les décisions thérapeutiques.

Cette étude s'est intéressée à la performance du %MDSCs à identifier les chiens atteints de processus tumoral peu avancé, soit à la performance du %MDSCs en tant que biomarqueur diagnostique précoce d'une atteinte tumorale. C'est pourquoi une courbe ROC a été établie à partir des valeurs de %MDSCs des chiens sains et des chiens atteints de tumeur peu avancée. L'ASC a montré une valeur égale à 0,779, significativement différente de 0,5 ($p = 0,0003$). Ainsi, le %MDSCs montre une capacité diagnostique significative. Toutefois, pour une valeur seuil optimale estimée à 5,30%, la sensibilité est estimée à 87,0% et la spécificité à 72,2%. Ces valeurs semblent peu

adaptées à une démarche diagnostique, car impliquent un nombre de faux positifs et faux négatifs relativement élevé. Dans une démarche diagnostique en pratique clinique, une sensibilité maximale est privilégiée dans le but d'identifier tous les individus atteints d'une affection tumorale, au risque de s'exposer à un nombre plus important de faux positifs. Ainsi, d'après la courbe ROC obtenue (figure 81), pour une valeur seuil de %MDSCs égale à 1,30% la sensibilité est évaluée à 100%, toutefois la spécificité est évaluée à 33,3% (Annexe 2). C'est-à-dire que pour une valeur seuil présentant une sensibilité maximale, et permettant ainsi de détecter tous les chiens atteints de processus tumoral peu avancé, deux tiers des chiens sains présentaient un résultat positif, autrement dit un %MDSCs au-dessus de la valeur seuil.

Des valeurs de performance diagnostique du %MDSCs n'ont jusqu'à présent pas été rapportées dans la littérature chez le chien, et des études supplémentaires incluant un nombre plus important d'individus sont nécessaires pour confirmer ces résultats. Cette valeur d'ASC rejoint tout de même les valeurs avancées dans les études de Jin *et al.* (2017) et Bergenfelz *et al.* (2020) menées chez des femmes atteintes de cancer du sein, respectivement égales à 0,766 et 0,74. Le travail effectué par Jin *et al.* (2017) montre que pour une valeur seuil de 3,05%, la sensibilité du %MDSCs à détecter une tumeur mammaire est égale à 80,5%, et la spécificité égale à 61,3%, soit des valeurs relativement proches de celles obtenues dans la présente étude. Il est toutefois à noter que ces résultats en médecine humaine concernent l'étude des M-MDSCs et non des G-MDSCs pour lesquelles aucune valeur en termes de performance diagnostique n'a été publiée à notre connaissance.

En étudiant plus particulièrement les %MDSCs pour différents types d'affections néoplasiques, cette étude montre de façon intéressante que le groupe des chiennes atteintes de tumeurs mammaires a présenté une augmentation significative du %MDSCs par rapport aux chiens sains (figure 73). Ceci concorde avec les résultats du travail effectué par Mucha *et al.* (2016) et Mucha *et al.* (2014). Toutefois, contrairement à l'étude de Mucha *et al.* (2016) nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les chiens sains et les chiennes atteintes de tumeurs mammaires bénignes ou de tumeurs malignes indépendamment (figure 74), cela étant principalement imputable à un nombre trop restreint de cas dans chacun de ces groupes.

Une augmentation significative de %MDSCs a été notée chez les chiens atteints de mastocytomes par rapport aux chiens sains (9,10 %, EIQ = [6,275 – 14,925] *versus* 2,8%, EIQ = [0,525 - 7,400]%, $p = 0,015$), ce qui a également été noté concernant les chiens atteints de mastocytomes en stade avancé dans l'étude de Goulart *et al.* (2012). Toutefois, parmi les sept mastocytomes inclus dans cette étude, seul un chien présentait une atteinte de stade avancé (métastases au niveau du nœud lymphatique périphérique), avec un %MDSCs évalué à 5,30% inférieur à la médiane du groupe total, évaluée à 9,10%. Ainsi, les chiens atteints de mastocytomes de stade peu avancé ont présenté une augmentation significative de %MDSCs par rapport aux chiens sains, ce qui n'a pas été retrouvé dans l'étude effectuée par Goulart *et al.* (2012).

De manière intéressante, cette étude s'est intéressée au %MDSCs d'un groupe de chiens atteints exclusivement de lymphomes. Bien que non significative ($p = 0,08$), une augmentation du %MDSCs a été observée chez les chiens atteints de lymphomes (4,80%, EIQ = [2,00 - 19,90] %) par rapport aux chiens sains (2,8% ; EIQ = [0,525 - 7,400] %). Il est possible qu'un nombre plus important de chiens atteints de lymphomes permette d'obtenir un résultat significatif. Il serait

également intéressant d'inclure une population homogène de chiens atteints du même type de lymphome (multicentrique) et de les classer par stade afin d'établir si le %MDSCs peut aider à la stadification des chiens atteints de lymphome ou même constituer un facteur pronostic.

C. Evolution du %MDSCs chez deux chiens au cours de leur traitement

De plus, cette étude est, à la connaissance des auteurs, la première à avoir effectué un suivi de deux chiens nouvellement diagnostiqués atteints de processus néoplasiques (un mastocytome et un lymphome rectal) au cours d'un traitement de chimiothérapie. Une diminution importante du %MDSCs a été notée après exérèse chirurgicale complète du mastocytome, puis une stabilisation du %MDSCs dans des valeurs relativement basses (2,80-4,70%) au cours du traitement à base de vinblastine à raison de 2mg/m² sans signe de métastase. Ce chien a présenté une rechute mais malheureusement, le %MDSCs n'a pas été mesuré avant ou au moment de la rechute survenue 35 jours après le dernier dosage.

Concernant le chien atteint de lymphome et suivi au cours d'une période d'un an sous protocole CHOP, des variations importantes ont pu être observées (entre 2,00% et 24,90%). En particulier un pic du %MDSCs (12,60%) a été noté 5 semaines après le début de la chimiothérapie, précédant de six semaines la détection d'une récurrence locale. Il est ainsi possible qu'une élévation du %MDSCs précède la survenue de récurrence, et montre ainsi un intérêt notable en tant que biomarqueur de suivi des individus sous traitement de chimiothérapie pour la détection précoce de récurrences. Toutefois, l'étude d'un seul chien ayant montré une récurrence sous traitement de chimiothérapie ne permet pas d'établir de conclusion. Aussi, il est à noter qu'un second pic a été enregistré (19,60%) sans être associé à une récurrence objectivée. Dans ce cas, le suivi des MDSCs paraît aléatoire par rapport au suivi de ce chien et paraît non corrélé à l'évolution de la maladie. Le suivi des chiens atteints de lymphome traités par chimiothérapie serait particulièrement intéressant à inclure pour une future étude afin d'étudier l'évolution des MDSCs en fonction du statut : absence de rémission / rémission partielle / rémission totale / rechute.

Aussi, une comparaison de l'évolution de la numération leucocytaire et de l'évolution du %MDSCs a été effectuée. Chez le chien atteint de mastocytome, l'évolution de la numération leucocytaire et l'évolution du %MDSCs n'ont pas montré la même tendance au cours du traitement. Toutefois, les courbes d'évolution du %MDSCs et de la numération leucocytaire observées chez le chien atteint de lymphome rectal et traité par un protocole CHOP semblent avoir montré une évolution semblable. Cette donnée laisse supposer que le traitement a eu un impact direct sur le %MDSCs mesuré dans cette étude, qui ne refléterait alors pas l'évolution de la charge tumorale de l'animal. En effet, le cyclophosphamide, la vincristine ainsi que la doxorubicine qui composent le protocole CHOP induisent une inhibition de la division cellulaire, notamment par inhibition de réplication de l'ADN, à laquelle les cellules souches hématopoïétiques sont particulièrement sensibles. Ainsi une myélosuppression et une neutropénie peuvent être observées et concerner également la production des MDSCs (Czink *et al.*, 1992 ; Northrup *et al.*, 2002 ; S. L. Wang *et al.*, 2015 ; Wittenburg *et al.*, 2019). Toutefois, la vinblastine, utilisée dans le traitement du mastocytome, est un agent alkylant qui possède les mêmes effets secondaires de myélosuppression et ainsi de neutropénie (Robat *et al.*, 2012), et cette observation n'a pas été constatée pour le cas du premier chien. De manière surprenante, les rares études observant l'évolution du %MDSCs au cours d'un

traitement de chimiothérapie chez l'Homme semblent montrer que ce taux augmente de manière significative au cours du traitement de chimiothérapie à base de cyclophosphamide et de doxorubicine, et décroît en fin de traitement. De plus, une association significative entre une réponse pathologique complète et un taux plus faible de %MDSCs en fin de traitement a été observée, ce qui permet de supposer un apport bénéfique du suivi des %MDSCs lors de ce traitement pour évaluer et suivre la réponse tumorale (Diaz-Montero *et al.*, 2009 ; Montero *et al.*, 2012 ; Wesolowski *et al.*, 2017).

Une étude sur un nombre plus important de chiens sous traitements de chimiothérapie serait nécessaire pour évaluer l'impact de ces différents traitements sur le %MDSCs. Ainsi, sur la base de ces seules observations concernant seulement 2 cas, il est impossible de statuer sur une éventuelle utilité clinique du %MDSCs dans le suivi des chiens recevant une chimiothérapie.

D. Limites

Il est à noter que cette étude comporte plusieurs limites. Tout d'abord, le nombre limité de chiens inclus dans cette étude peut être à l'origine de l'absence de résultat significatif, notamment concernant les chiens atteints de processus néoplasiques avancés en comparaison avec les chiens présentant un processus néoplasique peu avancé. Aussi, six chiens (14,3%) recevaient au moment du prélèvement ou quelques jours avant un traitement à base d'anti-inflammatoires stéroïdien (AIS), et cinq autres chiens (11,9%) recevaient un traitement à base d'anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS). Sur la base du travail effectué par Goulart *et al.* (2012), rapportant que les animaux sous traitement ne présentaient pas de différence significative du %MDSCs par rapport aux chiens atteints de tumeurs ne recevant pas de traitement, nous avons décidé de ne pas les exclure de nos travaux. Toutefois, cette dernière étude n'indiquait pas les différents traitements inclus. Nous avons donc étudié l'impact de ces deux types de traitements différents sur le %MDSCs par rapport aux chiens non traités par des anti-inflammatoires au moment du diagnostic. Cette comparaison n'a montré aucune différence significative entre les chiens atteints non traités (7,80%, EIQ = [5,45 - 13,15]%, n = 31), les chiens atteints traités par AIS (5,30%, EIQ = [3,38 - 11,05]%, n = 6, p = 0,477) et les chiens atteints traités par AINS (11,10%, EIQ = [6,30 - 22,10]%, n = 5, p = 0,287). Cette donnée semble montrer que les traitements AIS et AINS n'impactent pas le %MDSCs chez les chiens atteints de processus néoplasiques, et les chiens sous traitements inclus dans notre étude n'ont donc pas influencé nos résultats. Toutefois, des études incluant un nombre plus important d'individus seraient intéressantes pour confirmer ce résultat.

Des biais de classement sont également possibles dans cette étude, puisque des erreurs de diagnostic, notamment concernant le statut métastasé ou non métastasé des chiens malades, sont possibles. En effet, le statut non métastasé de certains chiens a été conclu sur la base d'examens d'imagerie ne révélant ni masse ni adénopathie et ce, en l'absence d'analyse cytologique qui aurait pu, par exemple, mettre en évidence une infiltration tumorale au sein des nœuds lymphatiques sans adénomégalie. Un chien présentant une adénopathie discrète en faveur d'un processus réactionnel mais n'ayant pas bénéficié d'analyses cytologiques sur cytoponctions, ainsi qu'un chien atteint d'un carcinome pulmonaire n'ayant pas bénéficié d'un examen d'imagerie complet, ont dans ce sens été exclus de l'analyse des sous-groupes de chiens présentant une atteinte tumorale peu avancée ou avancée.

Enfin, concernant la technique de dosage des MDSC employée dans cette étude, il est à noter que les cellules mononucléées isolées des échantillons sanguins dans les 24 heures maximum suivant le prélèvement ont par la suite été stockées à très basse température (-80°C), et ce durant des périodes variables pouvant représenter jusqu'à plusieurs semaines. Or, il a été montré chez l'Homme que le procédé de congélation provoque une perte importante du nombre de G-MDSCs (Trellakis *et al.*, 2012). Il est donc possible que les résultats fournis dans notre étude soient sous-estimés par rapport aux fréquences réelles de %MDSCs des chiens prélevés. Cependant, l'étude de Goulart *et al.* (2012) avait montré que la congélation des cellules à -80°C n'impactait pas le %MDSCs chez les chiens étudiés.

E. Perspectives

Ce travail montre une différence significative entre le %MDSCs chez les chiens sains et celui chez les chiens atteints de processus tumoral peu avancé, et plus précisément une augmentation du %MDSCs chez ces derniers par rapport aux chiens sains. Bien qu'aucune différence significative n'ait été notée entre le %MDSCs des chiens atteints de tumeurs peu avancées et celui des chiens atteints de tumeurs avancées, les données issues de la littérature scientifique montrent une augmentation significative du %MDSCs chez les chiens atteints de tumeurs avancées par rapport à celui des chiens atteints de tumeurs peu avancées. Il paraît donc envisageable, à termes, d'utiliser le %MDSCs en tant que biomarqueur diagnostique, permettant de faire la différence entre une atteinte tumorale de stade peu avancé, et une atteinte tumorale de stade avancé, dans le but de guider le choix du clinicien dans la gestion des individus malades. Des études supplémentaires avec un nombre de chiens plus important, particulièrement dans le groupe des chiens atteints de processus tumoral avancé.

De plus, cette étude a pu montrer chez deux chiens qu'il existe une évolution du %MDSCs au cours du traitement de chimiothérapie. Il est alors possible d'envisager que l'évolution du %MDSCs des individus sous traitement de chimiothérapie soit informative quant à la réponse de la maladie au traitement. Des études supplémentaires sont nécessaires pour montrer l'utilité clinique du %MDSCs dans le suivi des patients.

Les données issues de ce travail serviront éventuellement à identifier le %MDSCs en tant que potentiel biomarqueur diagnostique, pronostique, ou encore pharmacodynamique. Cet outil serait d'autant plus performant que le dosage des MDSCs est réalisé par cytométrie de flux, technique très accessible dans le milieu vétérinaire, et permettant d'obtenir rapidement les résultats.

Conclusion

Les biomarqueurs font aujourd'hui partie intégrante de la prise en charge des patients, en médecine humaine comme en médecine vétérinaire. Il est à noter depuis plusieurs années un véritable essor quant à leur étude, particulièrement dans le domaine de l'oncologie. De nombreux rôles peuvent être attribués aux biomarqueurs, et notamment identifier les individus à risque de développer une atteinte néoplasique, émettre un diagnostic le plus précoce possible d'une atteinte tumorale, établir un pronostic précis, prédire l'efficacité des thérapies possibles ainsi que d'assurer le suivi personnalisé des patients sous traitement. Pour cela, un biomarqueur idéal en oncologie doit être spécifique de la présence d'une affection tumorale, permettre d'identifier avec précision l'origine du processus néoplasique, être corrélé à son évolution et renseigner sur ses différentes caractéristiques, notamment concernant les sensibilités aux différents traitements. Il doit de plus être facilement et objectivement mesurable, et sa mesure doit être répétable. C'est dans cet esprit que les biomarqueurs sanguins montrent un réel intérêt : leur mesure est non invasive, répétable aisément, le plus souvent rapide, et dont le coût est le plus souvent moins important que les examens couramment mis en place tels que les examens d'imageries ou les examens histologiques.

Nous avons pu voir dans la partie bibliographique de ce travail plusieurs biomarqueurs de différentes natures, étudiés en oncologie humaine et vétérinaire, et montrant un degré certain de spécificité et de sensibilité pour les atteintes tumorales. La majeure partie des biomarqueurs mis en évidence à ce jour sont de nature protéique, et notamment l'ACE, le CA15-3, l'AFP, l'AMH, et la TK1. Ils présentent tous des performances variables en termes de sensibilité et de spécificité vis-à-vis des processus néoplasiques, et chacun d'entre eux a pu montrer certaines preuves de leur potentiel en tant que biomarqueur diagnostique, pronostique, prédictif et de suivi. Toutefois, aucun d'entre eux ne présente une parfaite spécificité pour distinguer les individus atteints de processus tumoral des individus sains ou présentant une pathologie non néoplasique.

La prochaine génération de biomarqueurs semble particulièrement se dessiner parmi les éléments regroupés sous le terme de biopsie liquide, c'est-à-dire les miARN circulants, l'ADNcf, l'ADNct et les cellules tumorales circulantes. En effet, ce sont les biomarqueurs ayant pour l'heure montré les performances les plus élevées en termes de sensibilité et de spécificité pour identifier les individus présentant une affection tumorale. Il apparaît également qu'ils ont la capacité de décrire les caractéristiques tumorales, de suivre leur évolution, et permettent notamment de prédire avec précision les sensibilités des tumeurs étudiées aux différents protocoles de traitement. Ainsi, le développement de ces biomarqueurs, à l'heure actuelle encore au stade de recherche clinique, est sous-tendu par l'espoir d'une médecine de précision, et réellement personnalisée. Ils permettront à terme l'élaboration de tests diagnostiques précoces, et d'optimiser simultanément l'efficacité thérapeutique et la survie des malades, tout en limitant les toxicités évitables.

Aussi, comme en témoigne ce travail, le chien présente de grandes similitudes par rapport à l'Homme concernant les caractéristiques de la majorité des biomarqueurs étudiés. Ainsi, le chien semble être un bon modèle pour l'étude de ces derniers en oncologie. Il est par ailleurs notable que le nombre d'études est grandement restreint en médecine vétérinaire comparativement à la médecine humaine. Au vu des résultats avancés en médecine humaine concernant plusieurs biomarqueurs également identifiés chez le chien, il est possible d'espérer de grandes avancées

dans les prochaines années en médecine vétérinaire, possiblement dans un esprit collaboratif s'inscrivant dans le concept One Health.

C'est avec l'esprit d'intégrer les biomarqueurs sanguins dans la prise en charge des affections tumorales en oncologie vétérinaire que le travail expérimental de cette étude s'est intéressé aux cellules myéloïdes suppressives (MDSCs). Ces dernières constituent les précurseurs des cellules dendritiques, des macrophages et des granulocytes neutrophiles, dont le nombre se retrouve amplifié dans le sang lors de différentes situations pathologiques, et notamment lors d'affections tumorales. Leur capacité immunosuppressive, entre autres, favorise l'échappement tumoral en inhibant l'environnement inflammatoire péri-tumoral.

Nous avons pu mettre en évidence que le %MDSCs est significativement plus élevé chez les chiens présentant une atteinte tumorale en stade précoce de développement par rapport aux chiens sains (9,10% (EIQ = [5,7 – 13,15] % *versus* 2,8%, EIQ = [0,525 - 7,400] %, $p = 0,001$). Toutefois, ces %MDSCs restent relativement proches, inférieurs à 10%, de telle sorte que pour une valeur seuil optimale de détection estimée à 5,3%, l'ASC, la sensibilité et la spécificité à détecter une atteinte tumorale en stade précoce étaient respectivement égales à 0,779, 87,0% et 72,2%, soit des valeurs relativement faibles, impliquant un nombre non négligeable de résultats faussement positifs ou faussement négatifs. Une augmentation significative du %MDSCs a également été notée pour plusieurs types d'atteintes tumorales par rapport au %MDSCs des chiens sains. Il s'agit surtout des tumeurs mammaires et des mastocytomes (médianes respectivement égales à 8,45%, EIQ = [5,925-10,75] et 9,10 %, EIQ = [6,275 – 14,925]).

Le groupe de chiens atteints de processus néoplasiques en stade avancé inclus dans cette étude ayant été trop peu homogène, et constitué d'un nombre trop faible d'individus, il ne fut pas possible de mettre en évidence une augmentation significative du %MDSCs dans ce groupe par rapport au groupe composé de chiens atteints de cancer en stade précoce, contrairement à ce qu'a pu montrer la majorité des études menées jusqu'à présent. Un travail supplémentaire est à envisager sur un groupe plus important de chiens atteints de cancer avancé pour évaluer la capacité du %MDSCs à différencier une atteinte précoce d'une atteinte avancée, guidant le choix des cliniciens dans la prise en charge de ces derniers.

Par ailleurs, dans le but d'investiguer le potentiel du %MDSCs en tant que biomarqueur pharmacodynamique, deux chiens ont pu être suivis durant plusieurs mois au cours de traitement de chimiothérapie, l'un atteint de mastocytome, et l'autre atteint de lymphome rectal. Le premier a montré une chute puis une stabilisation du %MDSCs au cours d'un traitement à base de vinblastine, sans signe de rechute. Le deuxième a montré des variations importantes du %MDSC au cours du traitement suivant un protocole CHOP, durant lequel une récurrence a été objectivée. Ces variations se révélaient par ailleurs proches de celles observées concernant les leucocytes. Ces deux suivis montrant une évolution dynamique du %MDSCs au cours du traitement laissent envisager un potentiel de ce paramètre en tant que biomarqueur pharmacodynamique. Toutefois, un travail supplémentaire est également nécessaire pour le confirmer, à l'aide d'un groupe plus important de chiens suivis au cours d'un protocole de chimiothérapie.

La mise en évidence de la capacité du %MDSCs à différencier une atteinte tumorale précoce d'une atteinte avancée, et à effectuer un suivi des animaux sous traitement à l'aide de la cytométrie en flux serait un outil de choix pour les cliniciens. Il s'agit en effet d'un prélèvement sanguin peu

invasif, répétable, et d'une technique rapide et peu coûteuse. Les efforts pour établir le %MDSCs comme biomarqueur d'intérêt en oncologie vétérinaire doivent donc se poursuivre.

Liste des références bibliographiques

- ABBOSH C., BIRKBAK N.J., WILSON G.A., *et al.* (2017) Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature* 545(7655), 446-451
- ABELEV G.I., PEROVA S.D., KHRAMKOVA N.I., POSTNIKOVA Z.A., IRLIN I.S. (1963) Production of embryonal α -globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* 1(2), 174–180
- AL-AZAWI D., KELLY G., MYERS E., *et al.* (2006) CA 15-3 is predictive of response and disease recurrence following treatment in locally advanced breast cancer. *BMC Cancer* 6(1), 220
- ALIZADEH S., AZIMZADEH K. (2018) Evaluation of Ultrasonography and Mammography in Diagnosis of Mammary Gland Tumor in Bitches: Based on Tumor Markers. *Iran J Vet Surg* 13(1), 23-28
- ALLARD W.J. (2004) Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. *Clin Cancer Res* 10(20), 6897-6904
- ANDREE K.C., VAN DALUM G., TERSTAPPEN L.W.M.M. (2016) Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Mol Oncol* 10(3), 395-407
- ANO H., HIDAKA Y., KATAMOTO H. (2014) Evaluation of anti-Müllerian hormone in a dog with a Sertoli cell tumour. *Vet Dermatol* 25(2), 142-145
- ANTONARAKIS E.S., LU C., WANG H., *et al.* (2014) AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 371(11), 1028-1038
- ANTONATOS D., PATSILINAKOS S., SPANODIMOS S., KORKONIKITAS P., TSIGAS D. (2006) Cell-free DNA levels as a prognostic marker in acute myocardial infarction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1075, 278-281
- ARMSTRONG A.J., HALABI S., LUO J., *et al.* (2019) Prospective Multicenter Validation of Androgen Receptor Splice Variant 7 and Hormone Therapy Resistance in High-Risk Castration-Resistant Prostate Cancer: The PROPHECY Study. *J. Clin. Oncol.* 37(13), 1120-1129
- ARRIETA O., VILLARREAL-GARZA C., MARTÍNEZ-BARRERA L., *et al.* (2013) Usefulness of Serum Carcinoembryonic Antigen (CEA) in evaluating response to chemotherapy in patients with advanced non small-cell lung cancer: a prospective cohort study. *BMC Cancer* 13, 254
- BABA O.K., SOOD N.K., GUPTA K. (2019) Clinical Evaluation of Glycoproteins and Inflammatory Cytokines in the Serum of Dogs Affected with Canine Mammary Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 89(4), 1465-1469
- BAHARVAND M., MANIFAR S., AKKAFAN R., MORTAZAVI H., SABOUR S. (2014) Serum levels of ferritin, copper, and zinc in patients with oral cancer. *Biomed J* 37(5), 331-336
- BAI D.-S., ZHANG C., CHEN P., JIN S.-J., JIANG G.-Q. (2017) The prognostic correlation of AFP level at diagnosis with pathological grade, progression, and survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* 7(1), 12870
- BALL B.A., ALMEIDA J., CONLEY A.J. (2013) Determination of serum anti-Müllerian hormone concentrations for the diagnosis of granulosa-cell tumours in mares. *Equine Vet. J.* 45(2), 199-203
- BALTER V., NOGUEIRA DA COSTA A., BONDANESE V.P., *et al.* (2015) Natural variations of copper and sulfur stable isotopes in blood of hepatocellular carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(4), 982-985
- BARRY M.J., SIMMONS L.H. (2017) Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality. *Medical Clinics of North America* 101(4), 787-806
- BARUCH A., HARTMANN M., ZRIHAN-LICHT S., *et al.* (1997) Preferential expression of novel MUC1 tumor antigen isoforms in human epithelial tumors and their tumor-potentiating function. *Int. J. Cancer* 71(5), 741-749
- BASNET S., ZHANG Z., LIAO W., *et al.* (2016) The Prognostic Value of Circulating Cell-Free DNA in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *J. Cancer* 7(9), 1105-1113
- BECK J., HENNECKE S., BORNEMANN-KOLATZKI K., *et al.* (2013) Genome aberrations in canine mammary carcinomas and their detection in cell-free plasma DNA. *PLoS ONE* 8(9), e75485

- BEFFAGNA G., SAMMARCO A., BEDIN C., *et al.* (2017) Circulating Cell-Free DNA in Dogs with Mammary Tumors: Short and Long Fragments and Integrity Index. *PLoS ONE* 12(1), e0169454
- BELL F.W., KLAUSNER J.S., HAYDEN D.W., *et al.* (1995) Evaluation of serum and seminal plasma markers in the diagnosis of canine prostatic disorders. *J. Vet. Intern. Med.* 9(3), 149-153
- BENCHIMOL S., FUKS A., JOTHY S., *et al.* (1989) Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 57(2), 327-334
- BENSON A.B., ABRAMS T.A., BEN-JOSEF E., *et al.* (2009) Hepatobiliary Cancers. *J Natl Compr Canc Netw* 7(4), 350-391
- BERGENFELZ C., ROXÅ A., MEHMETI M., LEANDERSSON K., LARSSON A.-M. (2020) Clinical relevance of systemic monocytic-MDSCs in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 69(3), 435-448
- BERTOLI G., CAVA C., CASTIGLIONI I. (2015) MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics* 5(10), 1122-1143
- BETSCH A., RUTGEERTS O., FEVERY S., *et al.* (2018) Myeloid-derived suppressor cells in lymphoma: The good, the bad and the ugly. *Blood Reviews* 32(6), 490-498
- BETTEGOWDA C., SAUSEN M., LEARY R.J., *et al.* (2014) Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6(224), 224ra24
- BIANCHI F., NICASSIO F., MARZI M., *et al.* (2011) A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer. *EMBO Mol Med* 3(8), 495-503
- BIDARD F.-C., MICHIELS S., RIETHDORF S., *et al.* (2018) Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 110(6), 560-567
- BIDARD F.-C., JACOT W., DUREAU S., *et al.* (2019) Clinical utility of circulating tumor cell count as a tool to chose between first line hormone therapy and chemotherapy for ER+ HER2-metastatic breast cancer: Results of the phase III STIC CTC trial. *Cancer Res* 79(4 Supplement), GS3-07-GS3-07
- BIZYMI N., BJELICA S., KITTANG A.O., *et al.* (2019) Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hematologic Diseases: Promising Biomarkers and Treatment Targets. *Hemasphere* 3(1)
- BONO J.S. de, SCHER H.I., MONTGOMERY R.B., *et al.* (2008) Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 14(19), 6302-6309
- BOYÉ P., FLOCH F., SERRES F., *et al.* (2019) Evaluation of serum thymidine kinase 1 activity as a biomarker for treatment effectiveness and prediction of relapse in dogs with non-Hodgkin lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 33(4), 1728-1739
- BRADY D.C., CROWE M.S., TURSKI M.L., *et al.* (2014) Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis. *Nature* 509(7501), 492-496
- BREITBACH S., TUG S., SIMON P. (2012) Circulating cell-free DNA: an up-coming molecular marker in exercise physiology. *Sports Med* 42(7), 565-586
- BULKOWSKA M., RYBICKA A., SENSES K.M., *et al.* (2017) MicroRNA expression patterns in canine mammary cancer show significant differences between metastatic and non-metastatic tumours. *BMC Cancer* 17(1), 728
- BURNETT D.L., CAVE N.J., GEDYE K.R., BRIDGES J.P. (2016) Investigation of cell-free DNA in canine plasma and its relation to disease. *Vet Q* 36(3), 122-129
- CABEL L., PROUDHON C., GORTAIS H., *et al.* (2017) Circulating tumor cells: clinical validity and utility. *Int. J. Clin. Oncol.* 22(3), 421-430
- CALAPRE L., WARBURTON L., MILLWARD M., ZIMAN M., GRAY E.S. (2017) Circulating tumour DNA (ctDNA) as a liquid biopsy for melanoma. *Cancer Lett.* 404, 62-69
- CAMPELLO YURGEL V., IKUTA N., BRONDANI DA ROCHA A., *et al.* (2007) Role of plasma DNA as a predictive marker of fatal outcome following severe head injury in males. *J. Neurotrauma* 24(7), 1172-1181
- CAMPOS L.C., LAVALLE G.E., ESTRELA-LIMA A., *et al.* (2012) CA15.3, CEA and LDH in dogs with malignant mammary tumors. *J. Vet. Intern. Med.* 26(6), 1383-1388

- CARAMÉS C., CRISTOBAL I., MORENO V., *et al.* (2016) MicroRNA-31 Emerges as a Predictive Biomarker of Pathological Response and Outcome in Locally Advanced Rectal Cancer. *Int J Mol Sci* 17(6)
- CARTER L., ROTHWELL D.G., MESQUITA B., *et al.* (2017) Molecular analysis of circulating tumor cells identifies distinct copy-number profiles in patients with chemosensitive and chemorefractory small-cell lung cancer. *Nature Medicine* 23(1), 114-119
- CAULÍN C., SALVESEN G.S., OSHIMA R.G. (1997) Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J. Cell Biol.* 138(6), 1379-1394
- CHAMEL G., GOURLAN A.T., TÉLOUK P., *et al.* (2017) Retrospective evaluation of blood copper stable isotopes ratio $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ as a biomarker of cancer in dogs. *Vet Comp Oncol* 15(4), 1323-1332
- CHAN S.L., MO F.K.F., JOHNSON P.J., *et al.* (2009) New utility of an old marker: serial alpha-fetoprotein measurement in predicting radiologic response and survival of patients with hepatocellular carcinoma undergoing systemic chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 27(3), 446-452
- CHAN K.C.A., JIANG P., ZHENG Y.W.L., *et al.* (2013) Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. *Clin. Chem.* 59(1), 211-224
- CHAN M.Y., SHE W.H., DAI W.C., *et al.* (2019) Prognostic value of preoperative alpha-fetoprotein (AFP) level in patients receiving curative hepatectomy- an analysis of 1,182 patients in Hong Kong. *Transl Gastroenterol Hepatol* 4, 52
- CHEN J.-G., PARKIN D.M., CHEN Q.-G., *et al.* (2003) Screening for liver cancer: results of a randomised controlled trial in Qidong, China. *J Med Screen* 10(4), 204-209
- CHEN L.-T., LIU T.-W., CHAO Y., *et al.* (2005) alpha-fetoprotein response predicts survival benefits of thalidomide in advanced hepatocellular carcinoma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22(3), 217-226
- CHEN Z., ZHOU H., LI S., *et al.* (2008) Serological thymidine kinase 1 (STK1) indicates an elevated risk for the development of malignant tumours. *Anticancer Res.* 28(6B), 3897-3907
- CHEN Qun, SI Q., XIAO S., *et al.* (2013) Prognostic significance of serum miR-17-5p in lung cancer. *Med. Oncol.* 30(1), 353
- CHEN X., XU Y., LIAO X., *et al.* (2016) Plasma miRNAs in predicting radiosensitivity in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol.* 37(9), 11927-11936
- CHEN W.-C., LAI C.-H., CHUANG H.-C., LIN P.-Y., CHEN M.-F. (2017) Inflammation-induced myeloid-derived suppressor cells associated with squamous cell carcinoma of the head and neck: Myeloid-derived suppressor cells in HNSCC. *Head Neck* 39(2), 347-355
- CHEN F., WANG J., CHEN J., *et al.* (2019) Serum copper and zinc levels and the risk of oral cancer: A new insight based on large-scale case-control study. *Oral Dis* 25(1), 80-86
- CHOU W.-C., LEE C.-L., YANG T.-S., *et al.* (2018) Changes in serum α -fetoprotein level predicts treatment response and survival in hepatocellular carcinoma patients and literature review. *J. Formos. Med. Assoc.* 117(2), 153-163
- CLAVIEN P.-A., LESURTEL M., BOSSUYT P.M., *et al.* (2012) Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. *The Lancet Oncology* 13(1), e11-e22
- COHEN S.J., PUNT C.J.A., IANNOTTI N., *et al.* (2008) Relationship of Circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 26(19), 3213-3221
- COHEN J.D., LI L., WANG Y., *et al.* (2018) Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 359(6378), 926-930
- COLLI A., FRAQUELLI M., CASAZZA G., *et al.* (2006) Accuracy of Ultrasonography, Spiral CT, Magnetic Resonance, and Alpha-Fetoprotein in Diagnosing Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. *Am J Gastroenterol* 101(3), 513-523
- CRAIG K.K.L., WOOD G.A., KELLER S.M., MUTSAERS A.J., WOOD R.D. (2019) MicroRNA profiling in canine multicentric lymphoma. *PLoS One* 14(12)
- CRISTOFANILLI M., BUDD G.T., ELLIS M.J., *et al.* (2004) Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* 351(8), 781-791

- CRISTOFANILLI M., PIERGA J.-Y., REUBEN J., *et al.* (2019) The clinical use of circulating tumor cells (CTCs) enumeration for staging of metastatic breast cancer (MBC): International expert consensus paper. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 134, 39-45
- CROWLEY E., DI NICOLANTONIO F., LOUPAKIS F., BARDELLI A. (2013) Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 10(8), 472-484
- CUI E., LI H., HUA F., *et al.* (2013) Serum microRNA 125b as a diagnostic or prognostic biomarker for advanced NSCLC patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Acta Pharmacologica Sinica* 34(2), 309-313
- CUNZHI H., JIEXIAN J., XIANWEN Z., *et al.* (2003) Serum and tissue levels of six trace elements and copper/zinc ratio in patients with cervical cancer and uterine myoma. *Biol Trace Elem Res* 94(2), 113-122
- CZINK I., KONCZ Á., MOLNÁR S., HERNÁDI S., HERNÁDI F. (1992) Neutropenia induced by cyclophosphamide. Mouse model. *Pharmacological Research, 3rd Joint Meeting of Hungarian, Italian and Polish Pharmacological Societies* 25, 296-297
- DA COSTA A., OLIVEIRA J.T., GÄRTNER F., *et al.* (2011) Potential markers for detection of circulating canine mammary tumor cells in the peripheral blood. *Vet. J.* 190(1), 165-168
- DA COSTA A., LENZE D., HUMMEL M., *et al.* (2012) 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* 146(2), 143-151
- DA COSTA A., KOHN B., GRUBER A.D., KLOPFLEISCH R. (2013) Multiple RT-PCR markers for the detection of circulating tumour cells of metastatic canine mammary tumours. *Vet. J.* 196(1), 34-39
- DAS V., KALITA J., PAL M. (2017) Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomed. Pharmacother.* 87, 8-19
- DAWSON S.-J., TSUI D.W.Y., MURTAZA M., *et al.* (2013) Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 368(13), 1199-1209
- DE MATTOS-ARRUDA L., WEIGELT B., CORTES J., *et al.* (2014) Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann. Oncol.* 25(9), 1729-1735
- DECKER B., PARKER H.G., DHAWAN D., *et al.* (2015) Homologous Mutation to Human BRAF V600E Is Common in Naturally Occurring Canine Bladder Cancer—Evidence for a Relevant Model System and Urine-Based Diagnostic Test. *Mol Cancer Res* 13(6), 993-1002
- DELACOUR H., SERVONNET A., PERROT A., VIGEZZI J.F., RAMIREZ J.M. (2005) [ROC (receiver operating characteristics) curve: principles and application in biology]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 63(2), 145-154
- DEMIRAY M., ULUKAYA E.E., ARSLAN M., *et al.* (2006) Response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer could be predictable by measuring a novel serum apoptosis product, caspase-cleaved cytokeratin 18: a prospective pilot study. *Cancer Invest.* 24(7), 669-676
- DEUTSCH H.F. (1991) Chemistry and Biology of α -Fetoprotein. *In Advances in Cancer Research.* Academic Press, pp 253-312
- DIAZ-MONTERO C.M., SALEM M.L., NISHIMURA M.I., *et al.* (2009) Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 58(1), 49-59
- DIEHL F., LI M., DRESSMAN D., *et al.* (2005) Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(45), 16368-16373
- DIEHL F., SCHMIDT K., CHOTI M.A., *et al.* (2008) Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med.* 14(9), 985-990
- DOLSCHEID-POMMERICH R.C., MANEKELLER S., WALGENBACH-BRÜNAGEL G., *et al.* (2017) Clinical Performance of CEA, CA19-9, CA15-3, CA125 and AFP in Gastrointestinal Cancer Using LOCI™-based Assays. *Anticancer Res* 37(1), 353-359
- DONG H., LEI J., DING L., *et al.* (2013) MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis. *Chem. Rev.* 113(8), 6207-6233

- DOUVILLE C., SPRINGER S., KINDE I., *et al.* (2018) Detection of aneuploidy in patients with cancer through amplification of long interspersed nucleotide elements (LINEs). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115(8), 1871-1876
- DUDICH E., SEMENKOVA L., GORBATOVA E., *et al.* (1998) Growth-regulative activity of human alpha-fetoprotein for different types of tumor and normal cells. *Tumour Biol.* 19(1), 30-40
- DUFFY M.J., DUGGAN C., KEANE R., *et al.* (2004) High preoperative CA 15-3 concentrations predict adverse outcome in node-negative and node-positive breast cancer: study of 600 patients with histologically confirmed breast cancer. *Clin. Chem.* 50(3), 559-563
- DWIVEDI D.J., TOLTL L.J., SWYSTUN L.L., *et al.* (2012) Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Crit Care* 16(4), R151
- EL MESSAOUDI S., MOULIERE F., DU MANOIR S., *et al.* (2016) Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clin. Cancer Res.* 22(12), 3067-3077
- ELLIOTT J.W., CRIPPS P., BLACKWOOD L. (2013) Thymidine kinase assay in canine lymphoma. *Vet Comp Oncol* 11(1), 1-13
- EL-SHEIKH ALI H., KITAHARA G., NIBE K., *et al.* (2013) Plasma anti-Müllerian hormone as a biomarker for bovine granulosa-theca cell tumors: comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations. *Theriogenology* 80(8), 940-949
- ENELUND L., NIELSEN L.N., CIRERA S. (2017) Evaluation of microRNA Stability in Plasma and Serum from Healthy Dogs. *Microna* 6(1), 42-52
- EULER H. von, EINARSSON R., OLSSON U., LAGERSTEDT A.-S., ERIKSSON S. (2004) Serum Thymidine Kinase Activity in Dogs with Malignant Lymphoma: A Potent Marker for Prognosis and Monitoring the Disease. *J Vet Intern Med* 18(5), 696-702
- EUN-JUNG J., L S., J K., *et al.* (2012) Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *In Cancer Cancer.* [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22370716/>] (consulté le 30/07/2020).
- FABRIS L., CEDER Y., CHINNAIYAN A.M., *et al.* (2016) The Potential of MicroRNAs as Prostate Cancer Biomarkers. *Eur. Urol.* 70(2), 312-322
- FAN G., ZHANG K., YANG X., *et al.* (2017) Prognostic value of circulating tumor DNA in patients with colon cancer: Systematic review. *PLoS ONE* 12(2), e0171991
- FANG A., CHEN P., WANG X., *et al.* (2019) Serum copper and zinc levels at diagnosis and hepatocellular carcinoma survival in the Guangdong Liver Cancer Cohort. *Int. J. Cancer* 144(11), 2823-2832
- FÄRKKILÄ A., KOSKELA S., BRYK S., *et al.* (2015) The clinical utility of serum anti-Müllerian hormone in the follow-up of ovarian adult-type granulosa cell tumors-A comparative study with inhibin B: Use of AMH as a marker of ovarian AGCTs. *Int. J. Cancer* 137(7), 1661-1671
- FDA-NIH Biomarker Working Group (2016) BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD), Food and Drug Administration (US)
- FEHM T., MÜLLER V., AKTAS B., *et al.* (2010) HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. *Breast Cancer Res. Treat.* 124(2), 403-412
- FISH E.J., IRIZARRY K.J., DEINNOCENTES P., *et al.* (2018) Malignant canine mammary epithelial cells shed exosomes containing differentially expressed microRNA that regulate oncogenic networks. *BMC Cancer* 18(1), 832
- FISH E.J., MARTINEZ-ROMERO E.G., DEINNOCENTES P., *et al.* (2020) Circulating microRNA as biomarkers of canine mammary carcinoma in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 34(3), 1282-1290
- FORNER A., LLOVET J.M., BRUIX J. (2012) Hepatocellular carcinoma. *The Lancet* 379(9822), 1245-1255
- FU Y., LI H. (2016) Assessing Clinical Significance of Serum CA15-3 and Carcinoembryonic Antigen (CEA) Levels in Breast Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit* 22, 3154-3162
- FUJITA N., NAKAYAMA T., YAMAMOTO N., *et al.* (2012) Methylated DNA and total DNA in serum detected by one-step methylation-specific PCR is predictive of poor prognosis for breast cancer patients. *Oncology* 83(5), 273-282

- FUJITA N., KAGARA N., YAMAMOTO N., *et al.* (2014) Methylated DNA and high total DNA levels in the serum of patients with breast cancer following neoadjuvant chemotherapy are predictive of a poor prognosis. *Oncol Lett* 8(1), 397-403
- GABRILOVICH D.I. (2017) Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Res* 5(1), 3-8
- GABRILOVICH D.I., NAGARAJ S. (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology* 9(3), 162-174
- GAO W., LU X., LIU L., *et al.* (2012) MiRNA-21: a biomarker predictive for platinum-based adjuvant chemotherapy response in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Biol. Ther.* 13(5), 330-340
- GARCIA-MURILLAS I., SCHIAVON G., WEIGELT B., *et al.* (2015) Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci. Transl. Med.* 7(302), 302ra133-302ra133
- GARLAN F., LAURENT-PUIG P., SEFRIQUI D., *et al.* (2017) Early Evaluation of Circulating Tumor DNA as Marker of Therapeutic Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer Patients (PLACOL Study). *Clin. Cancer Res.* 23(18), 5416-5425
- GEERTS I., VERGOTE I., NEVEN P., BILLEN J. (2009) The Role of Inhibins B and Antimüllerian Hormone for Diagnosis and Follow-up of Granulosa Cell Tumors: *Int J Gynecol Cancer* 19(5), 847-855
- GELALETI G.B., GRANZOTTO A., LEONEL C., *et al.* (2014) Short interspersed CAN SINE elements as prognostic markers in canine mammary neoplasia. *Oncol. Rep.* 31(1), 435-441
- GERLINGER M., ROWAN A.J., HORSWELL S., *et al.* (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* 366(10), 883-892
- GHOSH I., BHATTACHARJEE D., DAS A.K., *et al.* (2013) Diagnostic Role of Tumour Markers CEA, CA15-3, CA19-9 and CA125 in Lung Cancer. *Indian J Clin Biochem* 28(1), 24-29
- GILSON P. (2020) Enrichment and Analysis of ctDNA. *Recent Results Cancer Res.* 215, 181-211
- GIVAN A.L. (2001) Chapter 2 Principles of flow cytometry: An overview. *In Methods in Cell Biology.* Elsevier, pp 19-50
- GOEDEGEBUURE P., MITCHEM J., POREMBKA M., *et al.* (2011) Myeloid-Derived Suppressor Cells: General Characteristics and Relevance to Clinical Management of Pancreatic Cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 11(6), 734-751
- GOLD P., FREEDMAN S.O. (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 122(3), 467-481
- GOLDKORN A., ELY B., QUINN D.I., *et al.* (2014) Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: a phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 32(11), 1136-1142
- GOULART M.R., PLUHAR G.E., OHLFEST J.R. (2012) Identification of myeloid derived suppressor cells in dogs with naturally occurring cancer. *PLoS ONE* 7(3), e33274
- GOULART M.R., HLA VATY S.I., CHANG Y.-M., *et al.* (2019) Phenotypic and transcriptomic characterization of canine myeloid-derived suppressor cells. *Sci Rep* 9
- GRUNNET M., SORENSEN J.B. (2012) Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. *Lung Cancer* 76(2), 138-143
- GUADAGNI F., FERRONI P., CARLINI S., *et al.* (2001) A re-evaluation of carcinoembryonic antigen (CEA) as a serum marker for breast cancer: a prospective longitudinal study. *Clin. Cancer Res.* 7(8), 2357-2362
- HAHN K.A., RICHARDSON R.C. (1995) Detection of serum alpha-fetoprotein in dogs with naturally occurring malignant neoplasia. *Vet Clin Pathol* 24(1), 18-21
- HAIDER B.A., BARAS A.S., MCCALL M.N., *et al.* (2014) A critical evaluation of microRNA biomarkers in non-neoplastic disease. *PLoS ONE* 9(2), e89565
- HAMAM R., HAMAM D., ALSALEH K.A., *et al.* (2017) Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Cell Death Dis* 8(9), e3045-e3045
- HAO X., LUO H., KRAWCZYK M., *et al.* (2017) DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of common cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114(28), 7414-7419
- HAO C., ZHANG G., ZHANG L. (2019) Chapter Eleven - Serum CEA levels in 49 different types of cancer and noncancer diseases. *In Progress in Molecular Biology and Translational Science,*

- HARLE A., GAVOILLE C., BOUCHE O., *et al.* (2019) cfDNA for accurate determination of RAS and BRAF mutations using OncoBEAM liquid biopsy in metastatic colorectal cancer patients: Results of the real-world multicentric ColoBEAM study. *J Clin Oncol* 37(15_suppl), 3542-3542
- HARRIS L., FRITSCHKE H., MENNEL R., *et al.* (2007) American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 25(33), 5287-5312
- HE B., ZHANG H.-Q., XIONG S.-P., *et al.* (2015) Changing patterns of Serum CEA and CA199 for Evaluating the Response to First-line Chemotherapy in Patients with Advanced Gastric Adenocarcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 16(8), 3111-3116
- HE C., PENG W., LIU X., *et al.* (2019) Post-treatment alpha-fetoprotein response predicts prognosis of patients with hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 98(31), e16557
- HEAPS L.A., SCUDDER C.J., LIPSCOMB V.J., *et al.* (2017) Serum anti-Müllerian hormone concentrations before and after treatment of an ovarian granulosa cell tumour in a cat. *J Feline Med Surg Open Reports* 3(2), 205511691772270
- HEISHIMA K., MORI T., ICHIKAWA Y., *et al.* (2015) MicroRNA-214 and MicroRNA-126 Are Potential Biomarkers for Malignant Endothelial Proliferative Diseases. *Int J Mol Sci* 16(10), 25377-25391
- HEISHIMA K., ICHIKAWA Y., YOSHIDA K., *et al.* (2017) Circulating microRNA-214 and -126 as potential biomarkers for canine neoplastic disease. *Sci Rep* 7(1), 2301
- HEISHIMA K., MEUTEN T., YOSHIDA K., MORI T., THAMM D.H. (2019) Prognostic significance of circulating microRNA-214 and -126 in dogs with appendicular osteosarcoma receiving amputation and chemotherapy. *BMC Vet. Res.* 15(1), 39
- HELLER G., MCCORMACK R., KHEOH T., *et al.* (2018) Circulating Tumor Cell Number as a Response Measure of Prolonged Survival for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Comparison With Prostate-Specific Antigen Across Five Randomized Phase III Clinical Trials. *J. Clin. Oncol.* 36(6), 572-580
- HENEGHAN H.M., MILLER N., KELLY R., NEWELL J., KERIN M.J. (2010) Systemic miRNA-195 Differentiates Breast Cancer from Other Malignancies and Is a Potential Biomarker for Detecting Noninvasive and Early Stage Disease. *The Oncologist* 15(7), 673-682
- HIRANO K., WATANABE Y., ADACHI T., ITO Y., SUGIURA M. (1985) Drug-binding properties of human alpha-fetoprotein. *Biochem J* 231(1), 189-191
- HOLST B.S., DREIMANIS U. (2015) Anti-Müllerian hormone: a potentially useful biomarker for the diagnosis of canine Sertoli cell tumours. *BMC Vet Res* 11(1), 166
- HOU J., ZOU K., YANG C., LENG X., XU Y. (2018) Clinicopathological and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with esophageal cancer: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 11, 8053-8061
- HU H., HUANG J., LAN P., *et al.* (2018) CEA clearance pattern as a predictor of tumor response to neoadjuvant treatment in rectal cancer: a post-hoc analysis of FOWARC trial. *BMC Cancer* 18(1), 1145
- HUBER V., VALLACCHI V., FLEMING V., *et al.* (2018) Tumor-derived microRNAs induce myeloid suppressor cells and predict immunotherapy resistance in melanoma. *J. Clin. Invest.* 128(12), 5505-5516
- HUR K., CEJAS P., FELIU J., *et al.* (2014) Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis. *Gut* 63(4), 635-646
- HUTCHISON S., SAHAY B., DE MELLO S.C., *et al.* (2019) Characterization of myeloid-derived suppressor cells and cytokines GM-CSF, IL-10 and MCP-1 in dogs with malignant melanoma receiving a GD3-based immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 216, 109912
- ILIE M., HOFMAN V., LONG-MIRA E., *et al.* (2014) "Sentinel" Circulating Tumor Cells Allow Early Diagnosis of Lung Cancer in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS One* 9(10), e111597

- IMAMURA M., MORIMOTO T., NOMURA T., *et al.* (2018) Independent prognostic impact of preoperative serum carcinoembryonic antigen and cancer antigen 15-3 levels for early breast cancer subtypes. *World J Surg Oncol* 16(1), 26
- ISSELL B.F., MACFADYEN B.V., GUM E.T., *et al.* (1981) Serum zinc levels in lung cancer patients. *Cancer* 47(7), 1845-1848
- JAAFARI- ASHKAVANDI Z., KHADEMI B., MALEKZADEH M., SHAHMORADI Z. (2019) Serum Levels of Zinc, Copper and Ferritin in Patients with Salivary Gland Tumors. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 20(2), 545-548
- JAGARLAMUDI K.K., SHAW M. (2018) Thymidine kinase 1 as a tumor biomarker: technical advances offer new potential to an old biomarker. *Biomark Med* 12(9), 1035-1048
- JIANG P., LO Y.M.D. (2016) The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet.* 32(6), 360-371
- JIN P., KANG Q., WANG X., *et al.* (2015) Performance of a second-generation methylated SEPT9 test in detecting colorectal neoplasm. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 30(5), 830-833
- JIN G., ZHANG Yingchao, CHANG X., *et al.* (2017) Increased Percentage of mo-MDSCs in Human Peripheral Blood May Be a Potential Indicator in the Diagnosis of Breast Cancer. *Oncol Res Treat* 40(10), 603-608
- KAHRAMAN M., RÖSKE A., LAUFER T., *et al.* (2018) MicroRNA in diagnosis and therapy monitoring of early-stage triple-negative breast cancer. *Sci Rep* 8(1), 11584
- KANG H.-R., GJORGJIEVA M., SMITH S.N., *et al.* (2019) Pathogenesis of Hepatic Tumors following Gene Therapy in Murine and Canine Models of Glycogen Storage Disease. *Mol Ther Methods Clin Dev* 15, 383-391
- KARGINOVA O., WEEKLEY C.M., RAOUL A., *et al.* (2019) Inhibition of Copper Transport Induces Apoptosis in Triple-Negative Breast Cancer Cells and Suppresses Tumor Angiogenesis. *Mol. Cancer Ther.* 18(5), 873-885
- KAWARAI S., HASHIZAKI K., KITAO S., *et al.* (2006) Establishment and characterization of primary canine hepatocellular carcinoma cell lines producing alpha-fetoprotein. *Vet Immunol Immunopathol* 113(1), 30-36
- KAZMIERSKI K.J., OGILVIE G.K., FETTMAN M.J., *et al.* (2001) Serum zinc, chromium, and iron concentrations in dogs with lymphoma and osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 15(6), 585-588
- KHALIGHFARD S., ALIZADEH A.M., IRANI S., OMRANIPOUR R. (2018) Plasma miR-21, miR-155, miR-10b, and Let-7a as the potential biomarkers for the monitoring of breast cancer patients. *Sci Rep* 8(1), 17981
- KIRAN KUMAR J., SHARIF H., WESTBERG S., VON EULER H., ERIKSSON S. (2013) High levels of inactive thymidine kinase 1 polypeptide detected in sera from dogs with solid tumours by immunoaffinity methods: Implications for in vitro diagnostics. *Vet J* 197(3), 854-860
- KIRAN KUMAR J., WESTBERG S., RÖNNBERG H., ERIKSSON S. (2014) Properties of cellular and serum forms of thymidine kinase 1 (TK1) in dogs with acute lymphocytic leukemia (ALL) and canine mammary tumors (CMTs): implications for TK1 as a proliferation biomarker. *BMC Vet Res* 10
- KIRAN KUMAR J., MOREAU L., WESTBERG S., RÖNNBERG H., ERIKSSON S. (2015) A New Sandwich ELISA for Quantification of Thymidine Kinase 1 Protein Levels in Sera from Dogs with Different Malignancies Can Aid in Disease Management. *PLoS One* 10(9), e0137871
- KITAO S., YAMADA T., ISHIKAWA T., *et al.* (2006) Alpha-Fetoprotein in Serum and Tumor Tissues in Dogs with Hepatocellular Carcinoma. *J VET Diagn Invest* 18(3), 291-295
- KLEIVI SAHLBERG K., BOTTAI G., NAUME B., *et al.* (2015) A serum microRNA signature predicts tumor relapse and survival in triple-negative breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 21(5), 1207-1214
- KOKKO R., HOLLI K., HAKAMA M. (2002) Ca 15-3 in the follow-up of localised breast cancer. *Eur J Cancer* 38(9), 1189-1193
- KÖSTLIN N., OSTERMEIR A.-L., SPRING B., *et al.* (2017) HLA-G promotes myeloid-derived suppressor cell accumulation and suppressive activity during human pregnancy through engagement of the receptor ILT4. *Eur. J. Immunol.* 47(2), 374-384

- KRUMLAUF R., HAMMER R.E., TILGHMAN S.M., BRINSTER R.L. (1985) Developmental regulation of alpha-fetoprotein genes in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 5(7), 1639-1648
- KUMAR R., RAZAB S., PRABHU K., RAY S., PRAKASH B. (2017) Serum butyrylcholinesterase and zinc in breast cancer. *J Cancer Res Ther* 13(2), 367-370
- KUREBAYASHI J., NISHIMURA R., TANAKA K., *et al.* (2004) Significance of serum tumor markers in monitoring advanced breast cancer patients treated with systemic therapy: A prospective study. *Breast Cancer* 11(4), 389-395
- LAAN-PÜTSEP K., WIGZELL H., COTRAN P., GIDLUND M. (1991) Human alpha-fetoprotein (AFP) causes a selective down regulation of monocyte MHC class II molecules without altering other induced or noninduced monocyte markers or functions in monocytoïd cell lines. *Cell. Immunol.* 133(2), 506-518
- LANE A.H., LEE M.M., FULLER A.F., *et al.* (1999) Diagnostic Utility of Müllerian Inhibiting Substance Determination in Patients with Primary and Recurrent Granulosa Cell Tumors. *Gynecologic Oncology* 73(1), 51-55
- LAVASANIFAR A., SHARP C.N., KORTE E.A., *et al.* (2019) Long interspersed nuclear element-1 mobilization as a target in cancer diagnostics, prognostics and therapeutics. *Clin. Chim. Acta* 493, 52-62
- LEARY R.J., KINDE I., DIEHL F., *et al.* (2010) Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. *Sci Transl Med* 2(20), 20ra14
- LEARY R.J., SAUSEN M., KINDE I., *et al.* (2012) Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med* 4(162), 162ra154
- LEDECKY V., VALENCAKOVA-AGYAGOSOVA A., JAN L., *et al.* (2013) Determination of carcinoembryonic antigen and cancer antigen values with the radioimmunoassay method in healthy females dogs. *VetMed-Czech* 58, 277-283
- LEE K.-H., SHIN T.-J., KIM W.-H., CHO J.-Y. (2019) Methylation of LINE-1 in cell-free DNA serves as a liquid biopsy biomarker for human breast cancers and dog mammary tumors. *Sci Rep* 9(1), 175
- LEHMANN-WERMAN R., D N., H Zemmour, *et al.* (2016) Identification of Tissue-Specific Cell Death Using Methylation Patterns of Circulating DNA. *In Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Proc Natl Acad Sci U S A.* [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26976580/>] (consulté le 20/04/2020).
- LEIDINGER P., KELLER A., BACKES C., HUWER H., MEESE E. (2012) MicroRNA expression changes after lung cancer resection: A follow-up study. *RNA Biology* 9(6), 900-910
- LENER M.R., SCOTT R.J., WIECHOWSKA-KOZŁOWSKA A., *et al.* (2016) Serum Concentrations of Selenium and Copper in Patients Diagnosed with Pancreatic Cancer. *Cancer Res Treat* 48(3), 1056-1064
- LEON S.A., SHAPIRO B., SKLAROFF D.M., YAROS M.J. (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 37(3), 646-650
- LETENDRE J.-A., GOGGS R. (2017) Measurement of plasma cell-free DNA concentrations in dogs with sepsis, trauma, and neoplasia. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 27(3), 307-314
- LI Z.-H., ZHANG H., YANG Z.-G., *et al.* (2013) Prognostic significance of serum microRNA-210 levels in nonsmall-cell lung cancer. *J. Int. Med. Res.* 41(5), 1437-1444
- LI S.-X., YANG Y.-Q., JIN L.-J., CAI Z.-G., SUN Z. (2016) Detection of survivin, carcinoembryonic antigen and ErbB2 level in oral squamous cell carcinoma patients. *Cancer Biomark* 17(4), 377-382
- LI X., DAI D., CHEN B., *et al.* (2018) Clinicopathological and Prognostic Significance of Cancer Antigen 15-3 and Carcinoembryonic Antigen in Breast Cancer: A Meta-Analysis including 12,993 Patients. *In Disease Markers.* [<https://www.hindawi.com/journals/dm/2018/9863092/>] (consulté le 25/01/2020).
- LIANG O.D., KORFF T., ECKHARDT J., *et al.* (2004) Oncodevelopmental alpha-fetoprotein acts as a selective proangiogenic factor on endothelial cell from the fetomaternal unit. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(3), 1415-1422

- LIMAGNE E., EUVRARD R., THIBAUDIN M., *et al.* (2016) Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX–Bevacizumab Drug Treatment Regimen. *Cancer Res* 76(18), 5241-5252
- LIN Qunying, CHEN T., LIN Qingyu, *et al.* (2013) Serum miR-19a expression correlates with worse prognosis of patients with non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* 107(7), 767-771
- LIN Z., NEISWENDER J., FANG B., *et al.* (2017) Value of circulating cell-free DNA analysis as a diagnostic tool for breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 8(16), 26625-26636
- LIU G., WANG K., LI J., *et al.* (2015) Changes in serum alpha fetoprotein in patients with recurrent hepatocellular carcinoma following hepatectomy. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 30(9), 1405-1411
- LLOVET J., DUCREUX M., LENCIONI R., *et al.* (2012) EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 56(4), 908-943
- LOMAS A.L., GRAUER G.F. (2015) The renal effects of NSAIDs in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 51(3), 197-203
- LONNEUX M. (2000) The Place of Whole-Body PET FDG for the Diagnosis of Distant Recurrence of Breast Cancer. *Clinical Positron Imaging* 3(2), 45-49
- LOWES L.E., GOODALE D., XIA Y., *et al.* (2016) Epithelial-to-mesenchymal transition leads to disease-stage differences in circulating tumor cell detection and metastasis in pre-clinical models of prostate cancer. *Oncotarget* 7(46), 76125-76139
- LOWSETH L.A., GILLET N.A., CHANG I.Y., MUGGENBURG B.A., BOECKER B.B. (1991) Detection of serum alpha-fetoprotein in dogs with hepatic tumors. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199(6), 735-741
- LU C.Y., CHANGELIAN P.S., UNANUE E.R. (1984) Alpha-fetoprotein inhibits macrophage expression of Ia antigens. *The Journal of Immunology* 132(4), 1722-1727
- LUMACHI F., BRANDES A.A., BOCCAGNI P., *et al.* (1999) Long-term follow-up study in breast cancer patients using serum tumor markers CEA and CA 15-3. *Anticancer Res.* 19(5C), 4485-4489
- LUMACHI F., BASSO S.M.M., BRANDES A.A., PAGANO D., ERMANI M. (2004) Relationship Between Tumor Markers CEA and CA 15-3, TNM Staging, Estrogen Receptor Rate and MIB-1 Index in Patients with pT1-2 Breast Cancer. *Anticancer Res* 24(5B), 3221-3224
- MA X.-L., XIAO Z.-L., LIU L., *et al.* (2012) Meta-analysis of circulating tumor cells as a prognostic marker in lung cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 13(4), 1137-1144
- MA H., BANDOS A.I., GUR D. (2015) On the use of partial area under the ROC curve for comparison of two diagnostic tests: On the use of partial area under the ROC curve for comparison of two diagnostic tests. *Biom. J.* 57(2), 304-320
- MACDONALD G., NALVARTE I., SMIRNOVA T., *et al.* (2014) Memo is a copper-dependent redox protein with an essential role in migration and metastasis. *Sci Signal* 7(329), ra56
- MADSEN A.C., RIKKERS L.F., MOODY F.G., WU J.T. (1980) α -Fetoprotein as a marker for hepatic regeneration in the dog. *Journal of Surgical Research* 28(1), 71-76
- MADSEN A.C., RIKKERS L.F. (1984) α -Fetoprotein secretion by injured and regenerating hepatocytes in the dog. *Journal of Surgical Research* 37(5), 402-408
- MALY V., MALY O., KOLOSTOVA K., BOBEK V. (2019) Circulating Tumor Cells in Diagnosis and Treatment of Lung Cancer. *In Vivo* 33(4), 1027-1037
- MANDEL P., METAIS P. (1948) [Not Available]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 142(3-4), 241-243
- MANUALI E., DE GIUSEPPE A., FELIZIANI F., *et al.* (2012) CA 15–3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. *BMC Vet Res* 8(1), 86
- MAO S., HUANG S. (2013) Zinc and copper levels in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Biol Trace Elem Res* 153(1-3), 5-10
- MARCHESI M.C., CONTI M.B., PIERAMATI C., MANGILI V., FRUGANTI G. (2007) Assessment and behavior of alphafetoprotein (AFP), antigen cancer 15/3 (CA 15/3), carcinoembryonal antigen (CEA) in clinical oncology of the dog: preliminary study. *Vet. Res. Commun.* 31 Suppl 1, 301-304

- MARCHESI M.C., MANUALI E., PACIFICO E., *et al.* (2010) Cancer antigen 15/3: possible diagnostic use in veterinary clinical oncology. Preliminary study. *Vet. Res. Commun.* 34 Suppl 1, S103-106
- MARCONATO L., FACCHINETTI A., ZANARDELLO C., *et al.* (2019) Detection and Prognostic Relevance of Circulating and Disseminated Tumour Cell in Dogs with Metastatic Mammary Carcinoma: A Pilot Study. *Cancers (Basel)* 11(2)
- MARRERO J.A., FENG Z., WANG Y., *et al.* (2009) α -Fetoprotein, Des- γ Carboxyprothrombin, and Lectin-Bound α -Fetoprotein in Early Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 137(1), 110-118
- MARVEL D., GABRILOVICH D.I. (2015) Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest* 125(9), 3356-3364
- MCCLISH D.K. (1989) Analyzing a Portion of the ROC Curve. *Med Decis Making* 9(3), 190-195
- MCGUIRE A., BROWN J.A.L., KERIN M.J. (2015) Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. *Cancer Metastasis Rev.* 34(1), 145-155
- MCMAHON B.J., BULKOW L., HARPSTER A., *et al.* (2000) Screening for Hepatocellular Carcinoma in Alaska Natives Infected With Chronic Hepatitis B: A 16-Year Population-Based Study. *Hepatology* 32(4), 842-846
- MEHTA A., SINGAL A.G. (2015) Hepatocellular Carcinoma Surveillance: Does Alpha-Fetoprotein Have a Role? *Gastroenterology* 149(3), 816-817
- MEYERHARDT J.A., MANGU P.B., FLYNN P.J., *et al.* (2013) Follow-up care, surveillance protocol, and secondary prevention measures for survivors of colorectal cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline endorsement. *J. Clin. Oncol.* 31(35), 4465-4470
- MISALE S., YAEGER R., HOBOR S., *et al.* (2012) Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 486(7404), 532-536
- MIZEJEWSKI G.J., MACCOLL R. (2003) α -Fetoprotein growth inhibitory peptides: Potential leads for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 2(11), 1243-1255
- MOCHIZUKI H., KENNEDY K., SHAPIRO S.G., BREEN M. (2015) BRAF Mutations in Canine Cancers. *PLOS ONE* 10(6), e0129534
- MONTERO A.J., DIAZ-MONTERO C.M., DEUTSCH Y.E., *et al.* (2012) Phase 2 study of neoadjuvant treatment with NOV-002 in combination with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel in patients with HER-2 negative clinical stage II-IIIc breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 132(1), 215-223
- MOSTERT B., SLEIJFER S., FOEKENS J.A., GRATAMA J.W. (2009) Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 35(5), 463-474
- MOULIERE F., ROBERT B., PEYROTTE E.A., *et al.* (2011) High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA. *PLOS ONE* 6(9), e23418
- MOULIERE F., CHANDRANANDA D., PISKORZ A.M., *et al.* (2018) Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med* 10(466)
- MSAOUEL P., KOUTSILIERIS M. (2011) Diagnostic value of circulating tumor cell detection in bladder and urothelial cancer: systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 11, 336
- MUCHA J., MAJCHRZAK K., TACIAK B., HELLMÉN E., KRÓL M. (2014) MDSCs mediate angiogenesis and predispose canine mammary tumor cells for metastasis via IL-28/IL-28RA (IFN- λ) signaling. *PLoS ONE* 9(7), e103249
- MUCHA J., RYBICKA A., DOLKA I., *et al.* (2016) Immunosuppression in Dogs During Mammary Cancer Development. *Vet. Pathol.* 53(6), 1147-1153
- MÜLLER S., JANKE F., DIETZ S., SÜLTMANN H. (2020) Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers for Lung Cancer. *Recent Results Cancer Res.* 215, 299-318
- MURGITA R.A., GOIDL E.A., KONTIANEN S., WIGZELL H. (1977) alpha-Fetoprotein induces suppressor T cells in vitro. *Nature* 267(5608), 257-259
- MURGITA R.A., ANDERSSON L.C., SHERMAN M.S., BENNICH H., WIGZELL H. (1978) Effects of human alpha-fetoprotein on human B and T lymphocyte proliferation in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 33(2), 347-356
- MURGITA R.A., TOMASI T.B. (1975) Suppression of the immune response by alpha-fetoprotein on the primary and secondary antibody response. *J Exp Med* 141(2), 269-286

- MURTAZA M., DAWSON S.-J., TSUI D.W.Y., *et al.* (2013) Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 497(7447), 108-112
- MURTAZA M., DAWSON S.-J., POGREBNIAK K., *et al.* (2015) Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nat Commun* 6, 8760
- NADAL C., BÉGUIN J., BENCHEKROUN G., LE ROUX D. (2018) The myeloid derived suppressor cells: Who are they? Can they be used as a diagnostic tool to investigate metastasis in veterinary medicine? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 61, 5-8
- NADAL C. (2018) Les cellules myéloïdes suppressives : outil diagnostique des cancers canins. Thèse Méd. Vét., Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.
- NAGARAJ S., GABRILOVICH D.I. (2010) Myeloid-derived suppressor cells in human cancer. *Cancer J* 16(4), 348-353
- NAKAMURA N., MOMOI Y., WATARI T., *et al.* (1997) Plasma Thymidine Kinase Activity in Dogs with Lymphoma and Leukemia. *Journal of Veterinary Medical Science* 59(10), 957-960
- NAP M., MOLLGARD K., BURTIN P., FLEUREN G.J. (1988) Immunohistochemistry of Carcino-Embryonic Antigen in the Embryo, Fetus and Adult. *Tumor Biol* 9(2-3), 145-153
- NASSAR F.J., NASR R., TALHOUK R. (2017) MicroRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis, prognosis and therapy prediction. *Pharmacology & Therapeutics* 172, 34-49
- NICOLAZZO C., GRADILONE A., LORENI F., RAIMONDI C., GAZZANIGA P. (2019) EpCAMlow Circulating Tumor Cells: Gold in the Waste. *Dis. Markers* 2019, 1718920
- NICOLINI A., FERRARI P., DUFFY M.J., *et al.* (2010) Intensive risk-adjusted follow-up with the CEA, TPA, CA19.9, and CA72.4 tumor marker panel and abdominal ultrasonography to diagnose operable colorectal cancer recurrences: effect on survival. *Arch Surg* 145(12), 1177-1183
- NORTHRUP N.C., RASSNICK K.M., SNYDER L.A., *et al.* (2002) Neutropenia associated with vincristine and L-asparaginase induction chemotherapy for canine lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 16(5), 570-575
- OKAMURA K., TAKAYAMA K., IZUMI M., *et al.* (2013) Diagnostic value of CEA and CYFRA 21-1 tumor markers in primary lung cancer. *Lung Cancer* 80(1), 45-49
- OKŁA K., CZERWONKA A., WAWRUSZAK A., *et al.* (2019) Clinical Relevance and Immunosuppressive Pattern of Circulating and Infiltrating Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) in Epithelial Ovarian Cancer. *Front Immunol* 10, 691
- OLOFSSON M.H., UENO T., PAN Y., *et al.* (2007) Cytokeratin-18 is a useful serum biomarker for early determination of response of breast carcinomas to chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 13(11), 3198-3206
- OMATA M., LESMANA L.A., TATEISHI R., *et al.* (2010) Asian Pacific Association for the Study of the Liver consensus recommendations on hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int* 4(2), 439-474
- OOSTHUYZEN W., TEN BERG P.W.L., FRANCIS B., *et al.* (2018) Sensitivity and specificity of microRNA-122 for liver disease in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 32(5), 1637-1644
- OSMANI N., FOLLAIN G., GARCÍA LEÓN M.J., *et al.* (2019) Metastatic Tumor Cells Exploit Their Adhesion Repertoire to Counteract Shear Forces during Intravascular Arrest. *Cell Reports* 28(10), 2491-2500.e5
- PAN Q., KLEER C.G., VAN GOLEN K.L., *et al.* (2002) Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.* 62(17), 4854-4859
- PANTEL K., HILLE C., SCHER H.I. (2019) Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer: From Discovery to Clinical Utility. *Clin. Chem.* 65(1), 87-99
- PAOLETTI C., MUÑIZ M.C., THOMAS D.G., *et al.* (2015) Development of Circulating Tumor Cell-Endocrine Therapy Index in Patients with Hormone Receptor Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 21(11), 2487-2498
- PAOLETTI C., HAYES D.F. (2016) Circulating Tumor Cells. In *Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham, Springer International Publishing, pp 235-258

- PASSARO A., MANCUSO P., GANDINI S., *et al.* (2020) Gr-MDSC-linked asset as a potential immune biomarker in pretreated NSCLC receiving nivolumab as second-line therapy. *Clin Transl Oncol* 22(4), 603-611
- PECK A.B., MURGITA R.A., WIGZELL H. (1982) Cellular and genetic restrictions in the immunoregulatory activity of alpha-fetoprotein. III. Role of the MLC-stimulating cell population in alpha-fetoprotein-induced suppression of T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 128(3), 1134-1140
- PECKING A.P., MECHELANY-CORONE C., BERTRAND-KERMORGANT F., *et al.* (2001) Detection of Occult Disease in Breast Cancer Using Fluorodeoxyglucose Camera-Based Positron Emission Tomography. *Clinical Breast Cancer* 2(3), 229-234
- PERDIGONES N., MURTAZA M. (2017) Capturing tumor heterogeneity and clonal evolution in solid cancers using circulating tumor DNA analysis. *Pharmacol. Ther.* 174, 22-26
- PERRIER A., BOELLE P.-Y., CHRÉTIEN Y., *et al.* (2020) An updated evaluation of serum sHER2, CA15.3, and CEA levels as biomarkers for the response of patients with metastatic breast cancer to trastuzumab-based therapies. *PLOS ONE* 15(1), e0227356
- PERSONENI N., BOZZARELLI S., PRESSIANI T., *et al.* (2012) Usefulness of alpha-fetoprotein response in patients treated with sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 57(1), 101-107
- PHALLEN J., SAUSEN M., ADLEFF V., *et al.* (2017) Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 9(403)
- PINHEIRO D., MACHADO J., VIEGAS C., *et al.* (2017) Evaluation of biomarker canine-prostate specific arginine esterase (CPSE) for the diagnosis of benign prostatic hyperplasia. *BMC Vet. Res.* 13(1), 76
- POSCHKE I., MOUGIAKAKOS D., HANSSON J., MASUCCI G.V., KIESSLING R. (2010) Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign. *Cancer Res.* 70(11), 4335-4345
- RAMAGE J.K., DONAGHY A., FARRANT J.M., IORNS R., WILLIAMS R. (1995) Serum tumor markers for the diagnosis of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 108(3), 865-869
- RAY A., CHAKRABORTY K., RAY P. (2013) Immunosuppressive MDSCs induced by TLR signaling during infection and role in resolution of inflammation. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 52
- REGIMBALD L.H., PILARSKI L.M., LONGENECKER B.M., *et al.* (1996) The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res.* 56(18), 4244-4249
- RESSNEROVA A., RAUDENSKA M., HOLUBOVA M., *et al.* (2016) Zinc and Copper Homeostasis in Head and Neck Cancer: Review and Meta-Analysis. *Curr. Med. Chem.* 23(13), 1304-1330
- REY R.A., LHOMMÉ C., MARCILLAC I., *et al.* (1996) Antimüllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of the ovary: Comparative study with serum α -inhibin and estradiol. *Am J Obstet Gynecol* 174(3), 958-965
- RIBEIRO S.M. de F., MOYA A.M.T.M., BRAGA C.B.M., *et al.* (2016) Copper-Zinc ratio and nutritional status in colorectal cancer patients during the perioperative period. *Acta Cir. Bras.* 31(suppl 1), 24-28
- RIVERA P., MELIN M., BIAGI T., *et al.* (2009) Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res* 69(22), 8770-8774
- ROBAT C., LONDON C., BUNTING L., *et al.* (2012) Safety Evaluation of Combination Vinblastine and Toceranib Phosphate (Palladia®) in Dogs: a Phase I dose-finding study. *Vet Comp Oncol* 10(3)
- ROBERTSON J.F.R., JAEGER W., SYZMENDERA J.J., *et al.* (1999) The objective measurement of remission and progression in metastatic breast cancer by use of serum tumour markers. *European Journal of Cancer* 35(1), 47-53
- ROBLES A.I., ARAI E., MATHÉ E.A., *et al.* (2015) An Integrated Prognostic Classifier for Stage I Lung Adenocarcinoma Based on mRNA, microRNA, and DNA Methylation Biomarkers. *J Thorac Oncol* 10(7), 1037-1048

- ROCKLIN M.S., SENAGORE A.J., TALBOTT T.M. (1991) Role of carcinoembryonic antigen and liver function tests in the detection of recurrent colorectal carcinoma. *Dis. Colon Rectum* 34(9), 794-797
- ROMANO A., PARRINELLO N., VETRO C., *et al.* (2010) Absolute Count of Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) Is Able to Predict the Response to Early-PET In Hodgkin Lymphoma. *Blood* 116(21), 3882-3882
- RUNGSAKULKIJ N., SURAGUL W., MINGPHRUEDHI S., *et al.* (2018) Prognostic role of alpha-fetoprotein response after hepatocellular carcinoma resection. *World J Clin Cases* 6(6), 110-120
- SADE-FELDMAN M., KANTERMAN J., KLIEGER Y., *et al.* (2016) Clinical Significance of Circulating CD33+CD11b+HLA-DR- Myeloid Cells in Patients with Stage IV Melanoma Treated with Ipilimumab. *Clin. Cancer Res.* 22(23), 5661-5672
- SAFARZADEH E., ORANGI M., MOHAMMADI H., BABAIE F., BARADARAN B. (2018) Myeloid-derived suppressor cells: Important contributors to tumor progression and metastasis. *J Cell Physiol* 233(4), 3024-3036
- SANFIORENZO C., ILIE M.I., BELAID A., *et al.* (2013) Two panels of plasma microRNAs as non-invasive biomarkers for prediction of recurrence in resectable NSCLC. *PLoS ONE* 8(1), e54596
- SATELLI A., BATTH I., BROWNLEE Z., *et al.* (2017) EMT circulating tumor cells detected by cell-surface vimentin are associated with prostate cancer progression. *Oncotarget* 8(30), 49329-49337
- SAUSEN M., PHALLEN J., ADLEFF V., *et al.* (2015) Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nat Commun* 6, 7686
- SCHAEFER D.M.W., FORMAN M.A., KISSEBERTH W.C., *et al.* (2007) Quantification of plasma DNA as a prognostic indicator in canine lymphoid neoplasia. *Vet Comp Oncol* 5(3), 145-155
- SCHER H.I., HELLER G., MOLINA A., *et al.* (2015) Circulating Tumor Cell Biomarker Panel As an Individual-Level Surrogate for Survival in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Clin Oncol* 33(12), 1348-1355
- SELTING K.A., SHARP C.R., RINGOLD R., KNOUSE J. (2015) Serum thymidine kinase 1 and C-reactive protein as biomarkers for screening clinically healthy dogs for occult disease. *Vet Comp Oncol* 13(4), 373-384
- SELTING K.A., RINGOLD R., HUSBANDS B., PITHUA P.O. (2016) Thymidine Kinase Type 1 and C-Reactive Protein Concentrations in Dogs with Spontaneously Occurring Cancer. *J Vet Intern Med* 30(4), 1159-1166
- SEMENIUK D.J., BOISMENU R., TAM J., WEISSENHOFER W., MURGITA R.A. (1995) Evidence that immunosuppression is an intrinsic property of the alpha-fetoprotein molecule. *Adv. Exp. Med. Biol.* 383, 255-269
- SENHORELLO I.L.S., TERRA E.M., SUEIRO F.A.R., *et al.* (2019) Clinical value of carcinoembryonic antigen in mammary neoplasms of bitches. *Vet Comp Oncol* 18(3), 315-323
- SHAO Y.-Y., LIN Z.-Z., HSU C., *et al.* (2010) Early alpha-fetoprotein response predicts treatment efficacy of antiangiogenic systemic therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 116(19), 4590-4596
- SHARIF H., VON EULER H., WESTBERG S., *et al.* (2012) A sensitive and kinetically defined radiochemical assay for canine and human serum thymidine kinase 1 (TK1) to monitor canine malignant lymphoma. *The Veterinary Journal* 194(1), 40-47
- SHEN J., LIU Z., TODD N.W., *et al.* (2011) Diagnosis of lung cancer in individuals with solitary pulmonary nodules by plasma microRNA biomarkers. *BMC Cancer* 11(1), 374
- SHEN Y., TANG D., YAO R., *et al.* (2013) microRNA expression profiles associated with survival, disease progression, and response to gefitinib in completely resected non-small-cell lung cancer with EGFR mutation. *Med Oncol* 30(4), 750-750
- SHENG I.Y., DIAZ-MONTERO C.M., RAYMAN P., *et al.* (2020) Blood Myeloid-Derived Suppressor Cells Correlate with Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Overall Survival in Metastatic Urothelial Carcinoma. *Target Oncol*

- SHERGER M., KISSEBERTH W., LONDON C., OLIVO-MARSTON S., PAPENFUSS T.L. (2012) Identification of myeloid derived suppressor cells in the peripheral blood of tumor bearing dogs. *BMC Vet Res* 8, 209
- SHIMOMURA A., SHIINO S., KAWAUCHI J., *et al.* (2016) Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Sci* 107(3), 326-334
- SIDRANSKY D., VON ESCHENBACH A., TSAI Y.C., *et al.* (1991) Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252(5006), 706-709
- SINGAL A.G., CONJEEVARAM H.S., VOLK M.L., *et al.* (2012) Effectiveness of Hepatocellular Carcinoma Surveillance in Patients with Cirrhosis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 21(5), 793-799
- SIRAVEGNA G., MUSSOLIN B., BUSCARINO M., *et al.* (2015) Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat. Med.* 21(7), 795-801
- SNYDER M., M K., AJ H., RM D., J S. (2016) Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint That Informs Its Tissues-Of-Origin. *In Cell Cell.* [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26771485/>] (consulté le 20/04/2020).
- SOCHOR M., BASOVA P., PEŠTA M., *et al.* (2014) Oncogenic MicroRNAs: MiR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum. *BMC cancer* 14, 448
- SPARKES A.H., CANEY S., CHALHOUB S., *et al.* (2016) ISFM Consensus Guidelines on the Diagnosis and Management of Feline Chronic Kidney Disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18(3), 219-239
- STEPIEN M., JENAB M., FREISLING H., *et al.* (2017) Pre-diagnostic copper and zinc biomarkers and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Carcinogenesis* 38(7), 699-707
- STROUN M., ANKER P., MAURICE P., *et al.* (1989) Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46(5), 318-322
- STRUEWING J.P., HARTGE P., WACHOLDER S., *et al.* (1997) The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N. Engl. J. Med.* 336(20), 1401-1408
- SUGARBAKER P.H., GIANOLA F.J., DWYER A., NEUMAN N.R. (1987) A simplified plan for follow-up of patients with colon and rectal cancer supported by prospective studies of laboratory and radiologic test results. *Surgery* 102(1), 79-87
- SUN K., JIANG P., CHAN K.C.A., *et al.* (2015) Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(40), E5503-5512
- SUN C., LIAO W., DENG Z., *et al.* (2017) The diagnostic value of assays for circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore)* 96(29)
- SUN Y., HAWKINS P.G., BI N., *et al.* (2018) Serum MicroRNA Signature Predicts Response to High-Dose Radiation Therapy in Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 100(1), 107-114
- SZEKANECZ E., SANDOR Z., ANTAL-SZALMAS P., *et al.* (2007) Increased Production of the Soluble Tumor-Associated Antigens CA19-9, CA125, and CA15-3 in Rheumatoid Arthritis: Potential Adhesion Molecules in Synovial Inflammation? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1108(1), 359-371
- TAGAWA M., SHIMBO G., INOKUMA H., MIYAHARA K. (2019) Quantification of plasma cell-free DNA levels in dogs with various tumors. *J. Vet. Diagn. Invest.* 31(6), 836-843
- TAGAWA M., TAMBO N., MAEZAWA M., *et al.* (2020) Quantitative analysis of the BRAF V595E mutation in plasma cell-free DNA from dogs with urothelial carcinoma. *PLoS ONE* 15(4), e0232365
- TAITT H.E. (2018) Global Trends and Prostate Cancer: A Review of Incidence, Detection, and Mortality as Influenced by Race, Ethnicity, and Geographic Location. *Am J Mens Health* 12(6), 1807-1823
- TAKAHASHI Y., OHTA T., MAI M. (2004) Angiogenesis of AFP producing gastric carcinoma: correlation with frequent liver metastasis and its inhibition by anti-AFP antibody. *Oncol. Rep.* 11(4), 809-813

- TAN Y., WU H. (2018) The significant prognostic value of circulating tumor cells in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Curr Probl Cancer* 42(1), 95-106
- TCYGANOV E., MASTIO J., CHEN E., GABRILOVICH D.I. (2018) Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Curr Opin Immunol* 51, 76-82
- TÉLOUK P., PUISIEUX A., FUJII T., *et al.* (2015) Copper isotope effect in serum of cancer patients. A pilot study. *Metallomics* 7(2), 299-308
- THAMM D.H., KAMSTOCK D.A., SHARP C.R., *et al.* (2012) Elevated serum thymidine kinase activity in canine splenic hemangiosarcoma*. *Veterinary and Comparative Oncology* 10(4), 292-302
- THIERRY A.R., EL MESSAOUDI S., GAHAN P.B., ANKER P., STROUN M. (2016) Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 35(3), 347-376
- THIRUNAVUKARASU P., SUKUMAR S., SATHAIAH M., *et al.* (2011) C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *J. Natl. Cancer Inst.* 103(8), 689-697
- TIE J., KINDE I., WANG Y., *et al.* (2015) Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 26(8), 1715-1722
- TIE J., WANG Y., TOMASETTI C., *et al.* (2016) Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 8(346), 346ra92
- TINDER T.L., SUBRAMANI D.B., BASU G.D., *et al.* (2008) MUC1 enhances tumor progression and contributes towards immunosuppression in a mouse model of spontaneous pancreatic adenocarcinoma. *J Immunol* 181(5), 3116-3125
- TIWARI R., DAVID C.M., MAHESH D.R., *et al.* (2016) Assessment of serum copper, iron and immune complexes in potentially malignant disorders and oral cancer. *Braz. oral res.* 30(1), e101
- TJANDRA J.J., CHAN M.K.Y. (2007) Follow-up after curative resection of colorectal cancer: a meta-analysis. *Dis. Colon Rectum* 50(11), 1783-1799
- TOH B., WANG X., KEEBLE J., *et al.* (2011) Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biol.* 9(9), e1001162
- TÖLLE A., BLOBEL C.C., JUNG K. (2018) Circulating miRNAs in blood and urine as diagnostic and prognostic biomarkers for bladder cancer: an update in 2017. *Biomark Med* 12(6), 667-676
- TRELLAKIS S., BRUDEREK K., HÜTTE J., *et al.* (2012) Granulocytic myeloid-derived suppressor cells are cryosensitive and their frequency does not correlate with serum concentrations of colony-stimulating factors in head and neck cancer: *Innate Immun* 19(3), 328-36
- TSIKITIS V.L., MALIREDDY K., GREEN E.A., *et al.* (2009) Postoperative surveillance recommendations for early stage colon cancer based on results from the clinical outcomes of surgical therapy trial. *J. Clin. Oncol.* 27(22), 3671-3676
- TÜNAY A., B. S., R. S., N. E., A. B. (2009) Changes in the oxidative status and serum trace element levels in dogs with mammary tumours. *Acta vet. (Beogr.)* 59(4), 405-411
- TURNER N., SWIFT C., KILBURN L., *et al.* (2019) Abstract PD2-04: Baseline circulating ESR1 mutation analysis in the randomised phase III EFECT study of fulvestrant versus exemestane in advanced hormone receptor positive breast cancer. *Cancer Res* 79(4 Supplement), PD2-04-PD2-04
- UGEL S., DELPOZZO F., DESANTIS G., *et al.* (2009) Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Curr Opin Pharmacol* 9(4), 470-481
- UM S.H., MULHALL C., ALISA A., *et al.* (2004) α -Fetoprotein Impairs APC Function and Induces Their Apoptosis. *J Immuno* 173(3), 1772-1778
- VALENCAKOVA-AGYAGOSOVA A., FRISCHOVA Z., SEVCIKOVA Z., *et al.* (2014) Determination of carcinoembryonic antigen and cancer antigen (CA 15-3) in bitches with tumours on mammary gland: preliminary report. *Vet Comp Oncol* 12(3), 205-214

- VAN CUTSEM E., CERVANTES A., NORDLINGER B., ARNOLD D., ESMO Guidelines Working Group (2014) Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 25 Suppl 3, iii1-9
- VICTORIA M., LABROSSE J., KRIEF F., *et al.* (2019) Anti Müllerian Hormone: More than a biomarker of female reproductive function. *J Gynecol Obst Hum* 48(1), 19-24
- VON BUBNOFF N. (2017) Liquid Biopsy: Approaches to Dynamic Genotyping in Cancer. *Oncol Res Treat* 40(7-8), 409-416
- VON EULER H.P., ÖHRVIK A.B., ERIKSSON S.K. (2006) A non-radiometric method for measuring serum thymidine kinase activity in malignant lymphoma in dogs. *Res. Vet. Sci.* 80(1), 17-24
- VON EULER H.P., RIVERA P., ARONSSON A.-C., *et al.* (2009) 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.* 34(2), 505-510
- WALTER B., COELFEN A., JÄGER K., *et al.* (2018) Anti-Muellerian hormone concentration in bitches with histopathologically diagnosed ovarian tumours and cysts. *Reprod Dom Anim* 53(3), 784-792
- WALTER B., FEULNER H., OTZDORFF C., *et al.* (2019) Changes in anti-Müllerian hormone concentrations in bitches throughout the oestrous cycle. *Theriogenology* 127, 114-119
- WAN H.-G., XU H., GU Y.-M., *et al.* (2014) Comparison osteopontin vs AFP for the diagnosis of HCC: A meta-analysis. *Clin ResHepatol Gastroenterol* 38(6), 706-714
- WANG Y., GU J., ROTH J.A., *et al.* (2013) Pathway-Based Serum microRNA Profiling and Survival in Patients with Advanced Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 73(15), 4801-4809
- WANG H., WU S., ZHAO L., *et al.* (2015) Clinical use of microRNAs as potential non-invasive biomarkers for detecting non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Respirology* 20
- WANG S.L., LEE J.J., LIAO A.T. (2015) Chemotherapy-induced neutropenia is associated with prolonged remission duration and survival time in canine lymphoma. *Vet J* 205(1), 69-73
- WANG W., CHEN X.-L., ZHAO S.-Y., *et al.* (2016) Prognostic significance of preoperative serum CA125, CA19-9 and CEA in gastric carcinoma. *Oncotarget* 7(23), 35423-35436
- WANG W., XU X., TIAN B., *et al.* (2017) The diagnostic value of serum tumor markers CEA, CA19-9, CA125, CA15-3, and TPS in metastatic breast cancer. *Clinica Chimica Acta* 470, 51-55
- WANG X., SHI X.-Q., ZENG P.-W., MO F.-M., CHEN Z.-H. (2018) Circulating cell free DNA as the diagnostic marker for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 9(36), 24514-24524
- WANG P.-F., SONG S.-Y., WANG T.-J., *et al.* (2018) Prognostic role of pretreatment circulating MDSCs in patients with solid malignancies: A meta-analysis of 40 studies. *Oncoimmunology* 7(10), e1494113
- WANG Ying, SUN Z., LI A., ZHANG Y. (2019) Association between serum zinc levels and lung cancer: a meta-analysis of observational studies. *World J Surg Oncol* 17(1), 78
- WANG Yang, YU X., HARTMANN D., ZHOU J. (2019) Circulating tumor cells in peripheral blood of pancreatic cancer patients and their prognostic role: a systematic review and meta-analysis. *HPB (Oxford)* 22(5), 660-669
- WESOLOWSKI R., DUGGAN M.C., STIFF A., *et al.* (2017) Circulating myeloid-derived suppressor cells increase in patients undergoing neo-adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 66(11), 1437-1447
- WITTENBURG L.A., WEISHAAR K., RAMIREZ D., GUSTAFSON D.L. (2019) Doxorubicin area under the curve is an important predictor of neutropenia in dogs with naturally occurring cancers. *Vet Comp Oncol* 17(2), 147-154
- WONG R.J., AHMED A., GISH R.G. (2015) Elevated Alpha-Fetoprotein. *Clin. Liver Dis.* 19(2), 309-323
- WRIGHT T., BRISSON B.A., WOOD G.A., *et al.* (2019) Flow Cytometric Detection of Circulating Osteosarcoma Cells in Dogs. *Cytometry A* 95(9), 997-1007
- WU X., TANG J., XIE M. (2015) Serum and hair zinc levels in breast cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* 5, 12249
- WU K., LI L., LI S. (2015) Circulating microRNA-21 as a biomarker for the detection of various carcinomas: an updated meta-analysis based on 36 studies. *Tumour Biol.* 36(3), 1973-1981

- WU X.-L., TU Q., FAURE G., *et al.* (2016) Diagnostic and Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 6, 20210
- WU Z.-X., LIU Z., JIANG H.-L., PAN H.-M., HAN W.-D. (2016) Circulating tumor cells predict survival benefit from chemotherapy in patients with lung cancer. *Oncotarget* 7(41), 67586-67596
- WU L., LIU H., GUO H., *et al.* (2018) Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in cervical carcinoma patients. *Oncol Lett* 15(6), 9507-9515
- XIE Y., TODD N.W., LIU Z., *et al.* (2010) Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 67(2), 170-176
- XIE Y., WANG J., ZHAO X., *et al.* (2018) Higher serum zinc levels may reduce the risk of cervical cancer in Asian women: A meta-analysis. *J. Int. Med. Res.* 46(12), 4898-4906
- XU C., YAN Z., ZHOU L., WANG Y. (2013) A comparison of glypican-3 with alpha-fetoprotein as a serum marker for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 139(8), 1417-1424
- YAMADA T., KAKINOKI M., TOTSUKA K., *et al.* (1995) Purification of canine alpha-fetoprotein and alpha-fetoprotein values in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol* 47(1), 25-33
- YAMADA T., FUJITA M., KITAO S., *et al.* (1999) Serum alpha-fetoprotein values in dogs with various hepatic diseases. *J. Vet. Med. Sci.* 61(6), 657-659
- YAMASHIKI N., SUGAWARA Y., TAMURA S., *et al.* (2010) Postoperative surveillance with monthly serum tumor markers after living-donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Res.* 40(4), 278-286
- YAMAUCHI Y., SAFI S., BLATTNER C., *et al.* (2018) Circulating and Tumor Myeloid-derived Suppressor Cells in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 198(6), 777-787
- YAN W.-T., CUI X., CHEN Q., *et al.* (2017) Circulating tumor cell status monitors the treatment responses in breast cancer patients: a meta-analysis. *Sci Rep* 7, 43464
- YANG B., ZHANG B., XU Y., *et al.* (1997) Prospective study of early detection for primary liver cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 123(6), 357-360
- YANG M., ANTOINE D.J., WEEMHOFF J.L., *et al.* (2014) Biomarkers distinguish apoptotic and necrotic cell death during hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Liver Transpl.* 20(11), 1372-1382
- YANG Y., ZHANG H., ZHANG M., *et al.* (2017) Elevation of serum CEA and CA15-3 levels during antitumor therapy predicts poor therapeutic response in advanced breast cancer patients. *Oncol Lett* 14(6), 7549-7556
- YANG G., SHEN W., ZHANG Y., *et al.* (2017) Accumulation of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) induced by low levels of IL-6 correlates with poor prognosis in bladder cancer. *Oncotarget* 8(24), 38378-38388
- YANG C., ZOU K., YUAN Z., GUO T., XIONG B. (2018) Prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch System in patients with gastric cancer: evidence from a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 11, 1013-1023
- YEDEMA C., MASSUGER L., HILGERS J., *et al.* (1988) Pre-operative discrimination between benign and malignant ovarian tumors using a combination of CA125 and CA15.3 serum assays. *Int. J. Cancer* 41(S3), 61-67
- YEGANEH-AMIRKANDE S., ASSMAR M., MANSOUR-GHANAIE F., MOZAFARI-NOOR A. (2015) The Frequency of CA15-3, CA125, CA19-9 in Patients With Hepatitis B and C. *Zahedan J. Res. Med. Sci.* 17(5), 1645-1651
- YU S.-L., CHEN H.-Y., CHANG G.-C., *et al.* (2008) MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell* 13(1), 48-57
- YÜCEL I., ARPACI F., OZET A., *et al.* (1994) Serum copper and zinc levels and copper/zinc ratio in patients with breast cancer. *Biol Trace Elem Res* 40(1), 31-38
- YUKI M., AOYAMA R., HIRANO T., *et al.* (2019) Investigation of serum cortisol concentration as a potential prognostic marker in hospitalized dogs: a prospective observational study in a primary care animal hospital. *BMC Vet. Res.* 15(1), 170

- ZAHARAN A.M., MOEEN S.M., THABET A.F., *et al.* (2020) Monocytic myeloid-derived suppressor cells in chronic lymphocytic leukemia patients: a single center experience. *Leuk. Lymphoma*, 1-8
- ZHANG B.-H., YANG B.-H., TANG Z.-Y. (2004) Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130(7), 417-422
- ZHANG S., MA X., ZHU C., *et al.* (2016) The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 11(10), e0164514
- ZHANG Yongchao, XIE J., HAN G., *et al.* (2017) [Detection and clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood of patients with rectal carcinoma]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 20(7), 798-802
- ZHANG X., FU X., LI T., YAN H. (2019) The prognostic value of myeloid derived suppressor cell level in hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 14(12), e0225327
- ZHANG Y.-H., JIN M., LI J., KONG X. (2020) Identifying circulating miRNA biomarkers for early diagnosis and monitoring of lung cancer. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis* 1866(10), 165847
- ZHENG Y., ZHANG C., WU J., *et al.* (2016) Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Castration Resistant Prostate Cancer: A Meta-analysis. *Urol J* 13(6), 2881-2888
- ZHOU Y., BIAN B., YUAN X., *et al.* (2015) Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 10(6), e0130873
- ZHOU Y., WANG C., ZHU H., *et al.* (2016) Diagnostic Accuracy of PIK3CA Mutation Detection by Circulating Free DNA in Breast Cancer: A Meta-Analysis of Diagnostic Test Accuracy. *PLoS ONE* 11(6), e0158143
- ZHOU Y., XU Y., GONG Y., *et al.* (2019) Clinical factors associated with circulating tumor DNA (ctDNA) in primary breast cancer. *Mol Oncol* 13(5), 1033-1046
- ZOWCZAK M., ISKRA M., TORLIŃSKI L., COFTA S. (2001) Analysis of serum copper and zinc concentrations in cancer patients. *Biol Trace Elem Res* 82(1), 1
- ZUO X., CHEN L., LIU L., *et al.* (2016) Identification of a panel of complex autoantigens (LGALS3, PHB2, MUC1, and GK2) in combination with CA15-3 for the diagnosis of early-stage breast cancer. *Tumor Biol.* 37(1), 1309-1317
-

Annexe 1 :

Trois animaux furent censurés, dont les caractéristiques sont les suivantes :

Chien	Caractéristiques	Affection	%MDSCs	Motif d'exclusion
1	American stafforshire terrier Femelle stérilisée 7 ans	Adénocarcinome tubulopapillaire de grade 2 (selon Meuten), mastocytome cutané bien différencié de bas grade	7,70%	Deux affections néoplasiques concomitantes
2	Bulldog Américain Femelle stérilisée 12 ans	Carcinome urothélial	9,60%	Péritonite et pancréatite concomitantes, adénopathie abdominale généralisée
3	Bouledogue Français Femelle stérilisée 8 ans	Lymphome multicentrique de type B, stade 3	6,50%	4 séances de chimiothérapie (protocole CHOP) auparavant

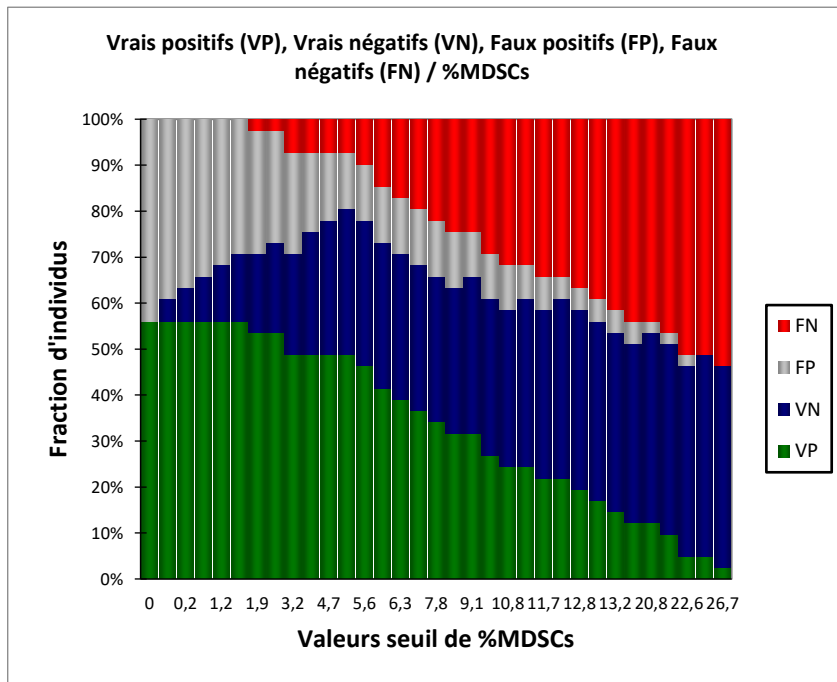
Annexe 2 :

Tableau 13 : Sensibilités, spécificités, valeurs prédictives positives et négatives en fonction des valeurs seuils de %MDSCs pour le diagnostic des chiens atteints de processus néoplasique en phase précoce de développement

Valeur seuil %MDSCs	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN
0,000	1,000	0,000	0,561	
0,100	1,000	0,111	0,590	1,000
0,200	1,000	0,167	0,605	1,000
0,300	1,000	0,222	0,622	1,000
1,200	1,000	0,278	0,639	1,000
1,300	1,000	0,333	0,657	1,000
1,900	0,957	0,389	0,667	0,875
2,400	0,957	0,444	0,688	0,889
3,200	0,870	0,500	0,690	0,750
3,800	0,870	0,611	0,741	0,786
4,700	0,870	0,667	0,769	0,800
5,300	0,870	0,722	0,800	0,813
5,600	0,826	0,722	0,792	0,765
5,800	0,739	0,722	0,773	0,684
6,300	0,696	0,722	0,762	0,650
6,500	0,652	0,722	0,750	0,619
7,800	0,609	0,722	0,737	0,591
8,300	0,565	0,722	0,722	0,565
9,100	0,565	0,778	0,765	0,583
10,000	0,478	0,778	0,733	0,538
10,800	0,435	0,778	0,714	0,519
11,100	0,435	0,833	0,769	0,536
11,700	0,391	0,833	0,750	0,517
12,300	0,391	0,889	0,818	0,533
12,800	0,348	0,889	0,800	0,516
13,100	0,304	0,889	0,778	0,500
13,200	0,261	0,889	0,750	0,485
17,300	0,217	0,889	0,714	0,471
20,800	0,217	0,944	0,833	0,486
21,100	0,174	0,944	0,800	0,472
22,600	0,087	0,944	0,667	0,447
25,200	0,087	1,000	1,000	0,462
26,700	0,043	1,000	1,000	0,450

Le test est positif si %MDSCs >= à la valeur seuil

Figure 83 : Diagramme des fractions de vrais positifs, vrais négatifs, faux positifs et faux négatifs en fonction des valeurs seuils de %MDSCs



LES BIOMARQUEURS SANGUINS EN ONCOLOGIE COMPARÉE - État ACTUEL DES CONNAISSANCES EN 2020 – APPLICATION AUX CELLULES MYELOÏDES SUPPRESSIVES CANINES.

AUTEUR : Philippe COLOMBE

RÉSUMÉ :

L'intérêt concernant les biomarqueurs sanguins tumoraux connaît un véritable essor en médecine humaine comme vétérinaire. Un biomarqueur tumoral idéal permettrait de diagnostiquer une affection tumorale de manière précoce, de l'identifier spécifiquement et avec précision, d'établir un pronostic, de prédire son comportement notamment vis-à-vis des différentes solutions thérapeutiques, permettrait également de suivre son évolution dans le temps, et ce de manière non invasive et peu coûteuse. Pour l'heure, aucun biomarqueur répondant à tous ces critères n'a été mis en évidence, notamment en raison d'un manque de spécificité des principaux biomarqueurs protéiques étudiés jusqu'à présent. Toutefois un grand espoir est actuellement placé dans les biomarqueurs regroupés sous l'appellation de biopsie liquide ; les miARN circulants, l'ADN circulant tumoral et les cellules tumorales circulantes, qui pourraient se révéler être des outils performants utilisés couramment en clinique dans un futur proche. Les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) sont des cellules intervenant dans la régulation de la réponse immunitaire, et jouent un rôle majeur dans l'expansion tumorale. Il a été montré que leur taux sanguin (%MDSCs) est augmenté lors de processus néoplasique, particulièrement en phase tardive de développement. Il serait donc envisageable que le %MDSCs puisse être un biomarqueur diagnostique et pronostique, permettant de distinguer une affection tumorale précoce d'une affection tumorale en phase tardive de développement, et ainsi permettre d'adapter la prise en charge thérapeutique des patients. Le travail effectué dans cette thèse visait à déterminer le %MDSCs chez des chiens présentant une atteinte tumorale précoce d'une part et avancée d'autre part, afin de déterminer la capacité de ce marqueur à distinguer ces deux groupes dans le but de guider le choix du clinicien dans la prise en charge de ces individus. Nous avons pu mettre en évidence que le %MDSCs des chiens atteints de cancer peu avancé était significativement supérieur à celui des chiens sains (9,10%, EIQ = [5,7 – 13,15] % *versus* 2,8%, EIQ = [0,525 - 7,400] %, $p = 0,001$), mais ces %MDSCs restent proches et inférieurs à 10%. Toutefois, le groupe de chiens atteints de cancers avancés n'a pas montré d'augmentation significative du %MDSCs. Un travail réalisé sur un groupe plus important de chiens atteints de cancers avancés que dans cette étude serait intéressant pour obtenir une comparaison plus fiable de ces deux groupes. D'autre part, le suivi du %MDSCs de deux chiens a permis de montrer une évolution dynamique de celui-ci au cours du traitement de chimiothérapie. Ceci encourage la réalisation d'études supplémentaires sur un nombre plus important de chiens pour déterminer le potentiel intérêt de ce biomarqueur dans le suivi de ces animaux.

MOTS CLÉS :

Cellules myéloïdes suppressives, biomarqueur, biomarqueur tumoral circulant, tumeur, cancer, oncologie, prise en charge, réponse immunitaire, biopsie liquide, carnivore domestique, chien

JURY :

Président : Pr Philippe GRIMBERT

1^{er} Assesseur : Dr Delphine LE ROUX

2nd Assesseur : Dr Ghita BENCHEKROUN

CIRCULATING BIOMARKERS IN COMPARATIVE ONCOLOGY – A CURRENT STATE OF KNOWLEDGE IN 2020 – APPLICATION TO CANINE SUPPRESSIVE MYELOID CELLS

AUTHOR: Philippe COLOMBE

SUMMARY:

Interest in circulating tumour biomarkers is increasing both in human and veterinary medicine. An ideal tumour biomarker would allow the early diagnosis of tumour disease, identify it specifically and accurately, establish a prognosis and predict its behaviour especially regarding different therapeutic solutions. It would also allow to monitor its evolution over time and all this in a non-invasive and inexpensive way. As of right now, no biomarkers meeting all of these criteria have been identified, particularly due to a lack of specificity of the main protein tumour biomarkers studied to date. However, a great hope is currently placed in biomarkers grouped under the name of liquid biopsy : circulating miRNAs, circulating tumour DNA and circulating tumour cells, which could prove to be effective tools commonly used in the clinic in the near future.

Suppressive myeloid cells (MDSCs) are cells involved in regulating the immune response, and play a major role in tumour expansion. It has been shown that their blood rate (%MDSCs) is increased during neoplastic processes, especially in the late stage of tumour development. It would thus be conceivable that the %MDSCs could be an interesting diagnostic and prognostic biomarker, allowing to differentiate an early tumour condition from a tumour condition in the late stages of development, and therefore to adapt the therapeutic management of patients. The work carried out in this thesis aimed to determine the %MDSCs in dogs with early tumour diagnosis on the one hand and advanced on the other hand, to determine the ability of this marker to distinguish these two groups, in order to guide the choice of the clinician in the management of these individuals. We were able to show that the %MDSCs of dogs with low-advanced cancer was significantly higher than that of healthy dogs (9.10% IR = [5.7 - 13.15]% to 2.8%, IR = [0.525 - 7,400]%, $p = 0.001$), although these %MDSCs remain close and below 10%. However, the dog group with advanced cancers did not show any significant increase in the %MDSCs. A work carried out with a larger group of dogs with advanced cancers than the one in this study, would be useful to obtain a more reliable comparison of these two groups. Moreover, the monitoring of the %MDSCs of two dogs was able to show its dynamic evolution throughout the chemotherapy treatment. This encourages the realisation of further studies over a larger number of dogs to determine the potential interest of this biomarker in those animal's care.

KEYWORDS:

Myeloid Derived Suppressive Cells, biomarkers, circulating tumor biomarkers, tumor, cancer, oncology, management, immune response, liquid biospy, domestic carnivore, dog

JURY:

Chairperson: Pr Philippe GRIMBERT

1st Assessor: Dr Delphine LE ROUX

2nd Assessor: Dr Ghita BENCHEKROUN