

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et
de la recherche scientifique Université
Chadli Bendjedid
El Tarf



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الشاذلي بن جديد
الطارف

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des sciences Biologiques

جامعة الشاذلي بن جديد
UNIVERSITE CHADLI BENDJEDID

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم العلوم البيطرية



Mémoire de Fin d'Études

Présenté en vue de l'obtention d'un Diplôme :

«Docteur vétérinaire»

THÈME

LES TUMEURS MAMMAIRES CHEZ LA CHIENNE

Présenté Par :

RANIA HEMILA Née le : 17/05/1995 à Annaba

Encadrer Par :

Riad Bouzid

Année universitaire 2020 - 2021

Remerciements



En préambule à ce mémoire, je tiens tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant et miséricordieux, qui m'aide et qui m'a donné la force, le courage et la patience d'accomplir ce Modeste travail

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de mémoire, Mr Bouzid riad. Je le remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté de me rencontrer et de répondre à mes questions durant mes recherches.

Je remercie mes très chers parents, Hemila Badreddine et Bentounsi Nadia, qui ont toujours été là pour moi. Je remercie mes frères Abderaouf et Imededdine, pour leurs encouragements.

Enfin, je remercie mes amies zahra et chahrazed qui ont toujours été là pour moi. Leur soutien inconditionnel et leurs encouragements ont été d'une grande aide.

À tous ces intervenants, je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.

Merci...

LA TUMEUR MAMMAIRE CHEZ LA CHIENNE

Résumé

Les tumeurs mammaires sont les tumeurs les plus fréquentes de la chienne. Elles présentent de nombreuses similitudes avec les tumeurs du sein chez la femme aux niveaux moléculaire, histologique et anatomique. De nombreux marqueurs tumoraux sont décrits en médecine humaine. Ils sont utilisés pour aider au diagnostic de certains cancers, pour proposer un pronostic, pour mettre en place un plan thérapeutique adapté et pour apprécier la réponse au traitement effectué.

Notre étude bibliographique expose l'intérêt des marqueurs dans le diagnostic, le pronostic et la prise en charge thérapeutique de la tumeur mammaire chez la chienne.

Nous nous concentrons sur les principaux marqueurs du cancer du sein utilisés en médecine humaine, à savoir des récepteurs hormonaux : le récepteur aux œstrogènes (ER), le récepteur à la progestérone (PR) et le récepteur à activité tyrosine kinase HER2. Nous nous attardons plus particulièrement sur HER2, récemment identifié et utilisé pour établir une classification des tumeurs du sein selon différents profils immunohistochimiques. Ces marqueurs sont également utilisés dans la littérature scientifique vétérinaire sur la chienne. Les profils immunohistochimiques qu'ils définissent sont associés à des pronostics distincts chez la chienne, comme chez la femme.

Nous nous sommes demandés si l'utilisation des thérapies ciblées contre ces marqueurs est possible chez la chienne et si elles permettent d'améliorer la survie de l'animal. Certaines molécules utilisées en hormonothérapie et certains traitements anti-HER2, très efficaces chez la femme, semblent prometteurs chez la chienne.

Mots clés : TUMEUR MAMMAIRE - MARQUEUR - IMMUNOHISTOCHIMIE - PROTEINE - PRONOSTIC - DIAGNOSTIC - RECEPTEUR HORMONAL -HER2 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE - CARNIVORE DOMESTIQUE - CHIENNE

Présenté par

Hemila Rania

Devant le jury :

Président : Mr Bouzid riad

Examineur : Mr Attia kheireddine

Promoteur : Mr Rezig fetheddine

Mammary tumor in the female dog

Summary

Mammary tumors are the most frequent tumors diagnosed in bitches. Numerous similarities exist between human breast cancer and dog mammary tumors in terms of molecular biology, histology and anatomy. Many tumor markers are described and used in human medicine. They can assist with some cancers diagnosis, offer prognosis to the patient, help planning a suitable program for therapy and evaluate the response to therapy.

This bibliographic research studies the usefulness of markers in the diagnosis, prognosis and treatment of bitch mammary tumors.

It focuses on the main markers used in human medicine associated with breast cancer. One subgroup of these markers gather hormone receptors such as the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), as well as human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). This study concentrates particularly on the recently discovered HER2. Found both in women and bitches, HER2 has been used in a brand new classification of human breast cancers. This classification is based on different immunophenotypic profiles corresponding to different prognosis.

We finally wonder if the use of targeted therapies based on markers is suitable in bitches and if it can improve the prognosis. Some hormonotherapy and anti-HER2 therapies are very effective against human breast tumors and sound promising in dog mammary tumors.

**Keywords : MAMMARY TUMOR – MARKER – IMMUNOHISTOCHEMISTRY -
PROTEIN - PRONOSTIC – DIAGNOSTIC – HORMONAL RECEPTOR – HER2 –
BIBLIOGRAPHIC RESEARCH STUDY – SMALL ANIMAL - BITCH**

Presented by

Hemila Rania

Jury :

President : *Mr bouzid riad*

Examener : *Mr attia kheireddine*

Promoter : *Mr rezig fetheddine*

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	1
INTRODUCTION	5
PREMIÈRE PARTIE : DESCRIPTION DES TUMEURS MAMMAIRES CHEZ LA CHIENNE ..	7
1. Le développement, l'anatomie, l'histologie de la glande mammaire.....	7
Développement de la glande mammaire	7
Anatomie de la glande mammaire.....	7
2. Les tumeurs mammaires chez la chienne.....	9
Épidémiologie et facteurs de risque des tumeurs mammaires chez le Chien.....	9
Développement de la tumeur mammaire	10
DEUXIÈME PARTIE : LES DIFFÉRENTS MARQUEURS.....	13
1. Le concept de marqueur	13
2. Les différents marqueurs utilisés	13
Les récepteurs hormonaux ER/ER- α et PR.....	14
Structure des récepteurs hormonaux ER/ER- α et PR	14
Mécanisme d'action des récepteurs hormonaux ER/ER- α et PR	14
Les rôles physiologiques des récepteurs ER/ER- α et PR et leur rôle dans la tumorigenèse.....	17
Le récepteur à activité tyrosine kinase ERBB2/HER2/NEU	18
Structure de la protéine HER2 et capacité de dimérisation	18
L'activation des protéines HER	18
Le rôle de HER2 dans la tumorigenèse	19
Surexpression de HER2 et dérégulation des signaux induits par la famille HER	19
Surexpression de HER2 et dérégulation du cycle cellulaire.....	20
Surexpression de HER2 : arrêt de l'adhérence cellulaire, de l'organisation et de la polarité cellulaire, reprise de la prolifération cellulaire	21
La dépendance en HER2 de la tumeur	23

Surexpression de HER2 et amplification du gène <i>HER2</i> dans les tumeurs du sein humaines ?	24
Surexpression de HER2 et malignité	25
Le gène <i>HER2</i> dans les carcinomes mammaires canins	25
Localisation du gène <i>ERBB2/HER2NEU</i> dans le génome du Chien	25
Le potentiel de transformation de <i>HER2</i> chez le Chien.....	26
Surexpression et amplification du gène <i>ERBB2/HER2/NEU</i> chez le Chien ? ...	26
TROISIÈME PARTIE : L'UTILISATION DES MARQUEURS À DES FINS DIAGNOSTIQUES, PRONOSTIQUES ET THÉRAPEUTIQUES.....	28
1. Diagnostic tumoral clinique et stadification : un premier pas vers le pronostic.....	28
2. Diagnostic du sous-type histologique et classification.....	29
3. La mise en place de profils immunohistochimiques et l'utilisation des marqueurs tumoraux	31
3.1. L'immunohistochimie	31
La technique d'immunohistochimie	31
Vers une standardisation de l'immunohistochimie à des fins diagnostiques.....	32
Diagnostiquer une surexpression de HER2 en utilisant le <i>HercepTest</i>	33
Diagnostiquer l'expression des récepteurs hormonaux par immunohistochimie	35
Diagnostiquer la présence de cellules myoépithéliales par immunohistochimie	36
Confrontation des techniques de prélèvement : biopsie <i>versus</i> cytologie et sérum .	37
Vers la possibilité d'une classification des profils immunohistochimiques des tumeurs mammaires canines.....	37
Les tumeurs ER et PR positives chez la chienne.....	37
Les tumeurs HER2 positives chez la chienne	38
Les différents profils immunohistochimiques chez la chienne	40
La classification utilisée chez la femme peut-elle être adaptée à la chienne	? 40
Les profils triple-négatif et <i>basal-like</i> existent-ils réellement chez la chienne ?	44

4. Le traitement des tumeurs mammaires.....	46
Les traitements classiques chez le Chien : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie.....	46
La chirurgie	46
La radiothérapie.....	47
La chimiothérapie.....	48
Vers des traitements plus ciblés.....	48
L'hormonothérapie.....	48
En médecine vétérinaire	48
Traitement anti-ER : le tamoxifène.....	48
L'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH)	49
Traitement anti-récepteur PR : l'aglépristone.....	50
L'immunothérapie.....	51
L'immunothérapie passive : les anticorps anti-HER2	51
L'immunothérapie active : la vaccination anti-HER2	51
CONCLUSION.....	53
BIBLIOGRAPHIE.....	56
LISTE FIGURES.....	58
LISTE TABLEAUX	60

INTRODUCTION

Nombreux sont les scientifiques qui se battent chaque jour pour accomplir une mission impossible il y a encore quelques années : lutter contre le cancer. De multiples avancées médicales et technologiques ont considérablement rallongé l'espérance de vie de patients atteints de certains cancers. Le cancer du sein chez la femme et la tumeur mammaire chez la chienne sont les cancers les plus fréquemment diagnostiqués à ce jour. C'est la raison pour laquelle de nombreux travaux de recherche leur sont consacrés.

Les questions que se posent tous les médecins ou les vétérinaires sont simples et claires : comment diagnostiquer le cancer ? Comment le caractériser le plus précisément possible ? Quel pronostic pouvons-nous annoncer au patient ou au propriétaire ? Quel meilleur plan thérapeutique pouvons-nous proposer ? Ces quelques questions offrent une multitude de réponses possibles dont les inconnues sont nombreuses. Nous pouvons nous demander pourquoi tant de mystère et d'incompréhension autour du cancer, de son évolution et des divers échecs thérapeutiques. La réponse est qu'il n'existe malheureusement pas un cancer mais des cancers. Le nombre de mutations et de sous-types tumoraux connus augmentent chaque jour avec la recherche. Le nouvel objectif est alors de se pencher sur la recherche de marqueurs tumoraux spécifiques capables de nous aiguiller sur ces questions.

Les tumeurs mammaires spontanées de la chienne ressemblent en de nombreux points au niveau histologique et moléculaire aux tumeurs du sein chez la femme. La chienne a donc été utilisée comme modèle pour l'étude de la tumeur du sein chez la femme. Les données disponibles sur la tumeur du sein chez la femme ont également permis d'avancer dans la recherche de données diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques concernant les tumeurs mammaires canines.

Nous avons donc choisi de rechercher dans la littérature quel est l'intérêt des marqueurs tumoraux dans le diagnostic, le pronostic et la prise en charge thérapeutique de la tumeur mammaire chez la chienne.

Après quelques rappels sur les tumeurs mammaires chez la chienne, nous présenterons les différents marqueurs utilisés en 2015 en médecine humaine, leur utilisation à des fins diagnostiques, pronostiques mais également thérapeutiques dans le cadre de la mise en place de thérapies ciblées. Nous chercherons dans la littérature si ces marqueurs peuvent être utilisés en médecine vétérinaire. Nous nous concentrerons sur les principaux marqueurs utilisés en médecine humaine dans le cadre de la tumeur du sein : les récepteurs hormonaux ER (récepteur aux œstrogènes) et PR (récepteur à la progestérone), et le récepteur à activité tyrosine kinase HER2. Nous nous attarderons plus particulièrement sur HER2, récemment identifié et utilisé pour l'établissement d'une classification des tumeurs du sein sur la base de ses différents profils immunohistochimiques.

PREMIÈRE PARTIE : DESCRIPTION DES TUMEURS MAMMAIRES CHEZ LA CHIENNE

1. Le développement, l'anatomie, l'histologie de la glande mammaire

La glande mammaire est une glande apocrine que l'on retrouve uniquement chez les mammifères. Il s'agit d'un réseau de canaux associé à un stroma riche en adipocytes et éléments fibrovasculaires dont la finalité est la production de lait (Sorenmo *et al.*, 2011).

Développement de la glande mammaire

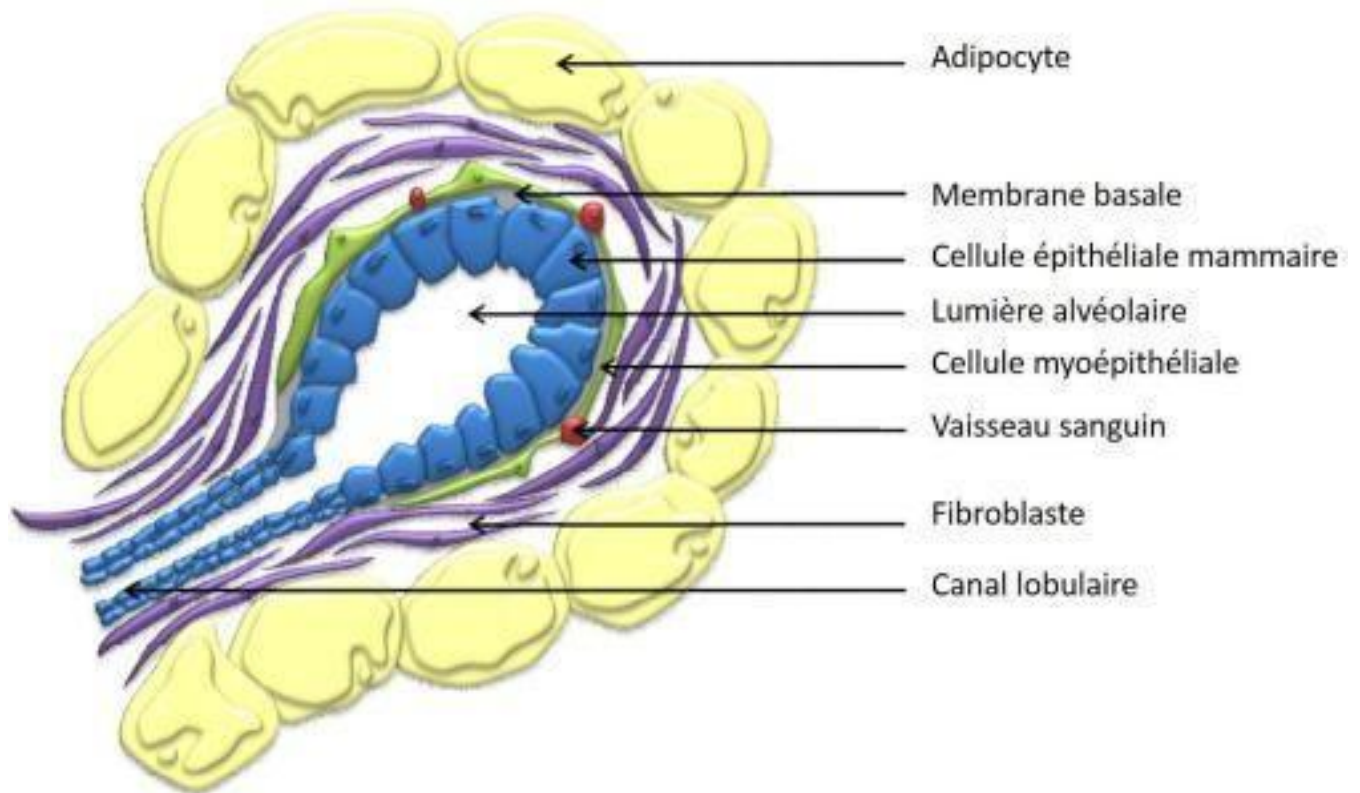
La plupart des chiens possèdent cinq paires de glandes mammaires : deux paires thoraciques (appelées M1 et M2), deux paires abdominales (M3 et M4), et une paire inguinale (M5). Chaque mamelle a entre 7 et 16 canaux. Les canaux formeront éventuellement des lobules lors de la puberté qui fonctionneront de façon indépendante au sein de la glande mammaire.

Les glandes mammaires se développent continuellement lors de la croissance du Chien mais la croissance des canaux est faible jusqu'à la puberté. Le développement de la glande mammaire est initié lors de la puberté par la libération d'œstrogènes par l'ovaire et lors de la gestation par la concentration sérique croissante en progestérone. Les canaux donnent alors naissance à des lobules desquels se développent les alvéoles ou acini dont le rôle est sécrétoire (Sorenmo *et al.*, 2011).

Anatomie de la glande mammaire

L'épithélium de la glande mammaire est constitué de cellules épithéliales (ou luminales) associées à une membrane basale continue et à des cellules myoépithéliales. Il se constitue d'un tissu mésenchymateux incluant du tissu conjonctif fibreux, des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des adipocytes et des nerfs (Figure 1). Le tissu conjonctif fibreux comprend des éléments intralobulaires comme des fibres fines de collagène et de la matrice extracellulaire en grande quantité, et des éléments interlobulaires entre les lobules comme des fibres larges de collagène et de la matrice extracellulaire en faible quantité. Le tissu mammaire est plus abondant sur les mamelles abdominales et inguinales que thoraciques chez le Chien.

Figure 1 : Schéma d'un *acinus* de glande mammaire (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014).



2. Les tumeurs mammaires chez la chienne

Épidémiologie et facteurs de risque des tumeurs mammaires chez le Chien

Les tumeurs mammaires sont les tumeurs les plus fréquentes chez la chienne. Elles représentent 50 à 70% des tumeurs de cette population avec une incidence de 205 cas pour 100 000 chiennes. Les mamelles les plus touchées sont les mamelles inguinales. Trois facteurs de risque principaux ont été identifiés : l'âge, le statut hormonal et la race (Sorenmo *et al.*, 2013).

Les tumeurs mammaires affectent principalement les chiennes d'âge moyen à élevé. Le risque d'apparition de tumeur mammaire croît avec l'âge. Il devient significatif à partir de 7-8 ans et augmente jusqu'à l'âge de 11 à 13 ans. Les chiennes ayant des tumeurs mammaires malignes sont significativement plus âgées que les chiennes ayant des tumeurs mammaires bénignes. En effet, l'âge moyen de diagnostic d'une tumeur mammaire maligne est de 9 à 11 ans, contre 7 à 9 ans pour le diagnostic d'une tumeur mammaire bénigne (Sorenmo *et al.*, 2013).

La stérilisation fournit un moyen de prévenir l'apparition de tumeurs mammaires. En effet, le risque de développer une tumeur mammaire n'est que de 0,5% pour les chiennes stérilisées avant leurs premières chaleurs. L'effet protecteur de cette stérilisation diminue avec les cycles ovariens. La plupart des études sont consensuelles sur ce sujet. Elles concluent que le bénéfice d'une stérilisation préventive est quasi nul à partir de l'âge de 4 ans. Ces résultats peuvent expliquer que les fortes variations hormonales (apparaissant après quelques cycles ovariens) telles que la pseudogestation ou la gestation ne sont pas des facteurs de risque des tumeurs mammaires. Il a cependant été montré que l'exposition à un traitement hormonal (œstrogènes, progestérone) augmente significativement le risque des tumeurs mammaires chez le Chien. Les chiennes traitées par la progestérone pour stérilisation chimique ont un risque 2,3 fois plus élevé de développer des tumeurs mammaires et à un âge plus jeune que les chiennes non traitées (Sorenmo *et al.*, 2013).

Les tumeurs mammaires ont tendance à être plus fréquentes chez les chiennes de petite taille des races suivantes : caniche, chihuahua, Yorkshire terrier, bichon maltais, teckel et cocker spaniel. Certaines races de taille moyenne ou grande ont également un risque plus élevé d'être atteintes comme le springer spaniel anglais, setter anglais, épagneul breton, berger allemand, pointer, doberman et boxer. Ces résultats indiquent que des facteurs génétiques favorisent le développement des tumeurs mammaires. Des mutations dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* (pour BReast CAncer 1 et 2) ont été retrouvées dans la lignée germinale des springers spaniels anglais. Des mutations dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont également observées dans la lignée germinale de l'Homme. Chez les femmes porteuses de mutations dans ces gènes, le risque de développer un cancer du sein avant l'âge de 70 ans est de 65 % à 85 % (Sorenmo *et al.*, 2013).

Développement de la tumeur mammaire

Les œstrogènes et la progestérone sont nécessaires au développement normal de la glande mammaire. La glande mammaire subit des changements au niveau clinique et histologique dépendants des phases du cycle ovarien et de la concentration sanguine en hormones sexuelles. Les œstrogènes et la progestérone ont un pouvoir mitogène sur l'épithélium de la glande mammaire. Ils induisent la prolifération de l'épithélium du canal intralobulaire et le développement du canal lobulaire et des alvéoles mammaires. Il en résulte une croissance de la glande mammaire (Sorenmo *et al.*, 2013, 2011).

Les tumeurs mammaires sont à 50% malignes chez le Chien. La voie lymphatique est la principale voie de dissémination des cellules cancéreuses mammaires. Les sites de métastases sont les nœuds lymphatiques, le foie, les poumons et les os. Le drainage lymphatique de la glande mammaire est complexe. En effet, le drainage lymphatique de mamelles saines a été bien étudié mais il a été montré que le drainage des mamelles présentant une tumeur peut être altéré (Sorenmo *et al.*, 2013, 2011). Patsikas *et al.* ont étudié le drainage lymphatique des glandes mammaires chez 41 chiennes saines et atteintes d'une tumeur mammaire par lymphographie indirecte. Des radiographies ont été prises 5, 10, 15, 30, 60, et 120 minutes après l'injection du produit de contraste, puis 1 et 3 jours après l'injection du produit de contraste (Patsikas *et al.*, 2006). Les résultats sont présentés Tableau 1 et Figure 2.

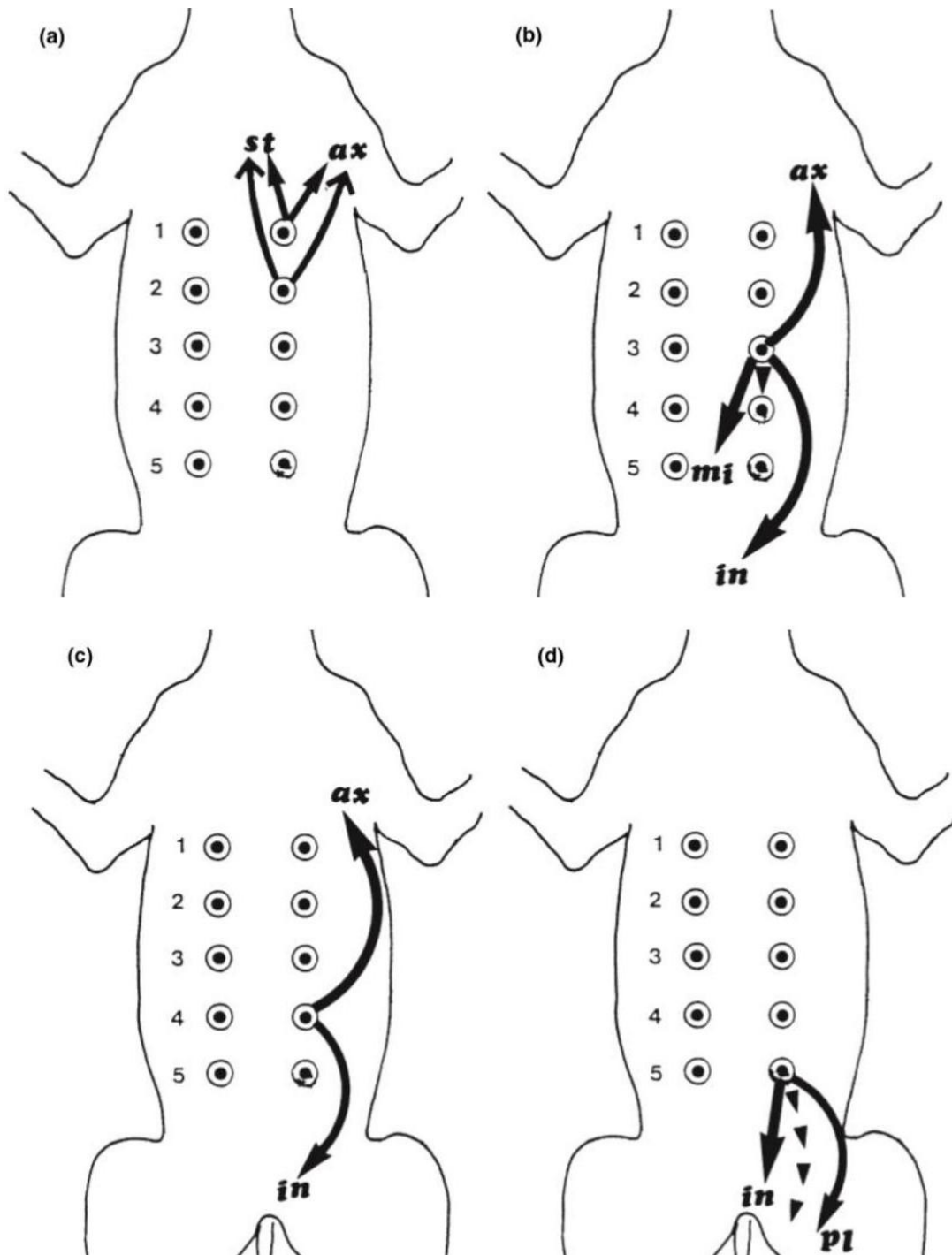
Tableau 1 : Drainage lymphatique de glandes mammaires saines et présentant une tumeur (d'après Patsikas *et al.*, 2006).

Abréviations : ax (nœud lymphatique axillaire), st (nœud lymphatique sternal), mi (nœud lymphatique iliaque médian), in (nœud lymphatique inguinal superficiel), pl (nœud lymphatique poplité).

<i>Glande Mammaire</i>	<i>Drainage lymphatique normal</i>	<i>Drainage lymphatique néoplasique</i>
<i>M1</i>	Ax	ax, st
<i>M2</i>	Ax	ax, st
<i>M3</i>	ax, in	ax, in, mi
<i>M4</i>	In	ax, in
<i>M5</i>	In	in, pl

Figure 2 : Schéma représentant le drainage lymphatique de chiennes atteintes de tumeurs mammaires sur M1 et M2 (a), M3 (b), M4 (c) et M5 (d) (Patsikas *et al.*, 2006).

Abréviations : ax (nœud lymphatique axillaire), st (nœud lymphatique sternal), mi (nœud lymphatique iliaque médian), in (nœud lymphatique inguinal superficiel), pl (nœud lymphatique poplité).



On note que chez les chiennes saines, le drainage lymphatique de la mamelle s'effectuait vers le nœud lymphatique ipsilatéral le plus proche uniquement. Il n'y avait pas de drainage vers des nœuds lymphatiques plus éloignés contrairement à certaines chiennes atteintes de tumeur mammaire.



Les résultats de cette étude indiquent que le drainage lymphatique des tumeurs mammaires est légèrement différent de celui des glandes mammaires saines. Considérant les variations anatomiques individuelles, les auteurs défendent l'hypothèse d'une lymphangiogenèse tumorale. En pratique, une lymphographie par radiographie, scanner ou IRM pourrait indiquer au chirurgien quels nœuds lymphatiques drainent la mamelle présentant une tumeur et qui doivent être retirés.

DEUXIÈME PARTIE : LES DIFFÉRENTS MARQUEURS

1. Le concept de marqueur

Les marqueurs tumoraux sont des molécules produites par des cellules cancéreuses ou par des cellules saines de l'organisme en réponse au cancer ou dans certaines conditions non-cancéreuses. La plupart des marqueurs tumoraux existent chez les individus sains mais ils sont produits en grande quantité chez les individus atteints d'un cancer. Les marqueurs tumoraux peuvent être détectés dans le sang, les urines, les selles ou le tissu tumoral. La plupart des marqueurs tumoraux sont des protéines (Doliger, 2003). De nombreux marqueurs tumoraux ont été décrits et sont utilisés en clinique. Ils peuvent être associés à un ou plusieurs types tumoraux. Il n'existe pas de marqueur universel capable de détecter la présence de n'importe quel cancer chez un individu. Les marqueurs tumoraux peuvent être utilisés pour aider au diagnostic de certains cancers, pour proposer un pronostic au patient, pour mettre en place un plan thérapeutique adapté et pour apprécier la réponse au traitement effectué.

Des guides de bonnes pratiques ont été publiés par des organisations internationales comme l'ASCO (Société Américaine d'Oncologie Clinique - *American Society of Clinical Oncology*) afin de standardiser l'interprétation d'une expression de certains marqueurs tumoraux incluant les marqueurs du cancer du sein, du côlon et des poumons.

2. Les différents marqueurs utilisés

Les marqueurs du cancer du sein chez la femme sont très étudiés. Nous retiendrons ici trois marqueurs qui sont actuellement utilisés en médecine humaine pour établir un diagnostic de sous-type, formuler un pronostic et proposer un plan thérapeutique ciblé.

Nous traiterons du gène *ERBB2* aussi appelé *NEU/NGL/HER2/TKR1/CD340/HER-2/MLN 19/HER2/neu* chez l'Homme, et *HER2/c-erbB-2/p185erbB2* chez le Chien, du gène *PGR* (*récepteur de la progestérone*) aussi appelé *PR/NR3C3* chez l'Homme et *PR* chez le Chien, du gène *ESR1* (*récepteur 1 aux œstrogènes*) aussi appelé *ER/ESR/ER- α /ESRA/ESTRR/NR3A1* chez l'Homme, et *ER- α* chez le Chien. Ces trois gènes codent les protéines ERBB2/HER2/NEU, PR et ER/ER- α , respectivement.

Dans cette étude, nous appellerons ces gènes et protéines par le nom le plus couramment utilisé dans les publications soit *HER2* codant HER2, *ESR1* codant ER, et *PR* codant PR pour les deux espèces. Nous détaillerons plus précisément le marqueur HER2. Il s'agit du marqueur le plus récemment découvert. HER2 est utilisé comme marqueur pronostique et il est à l'origine de nouvelles thérapies ciblées.

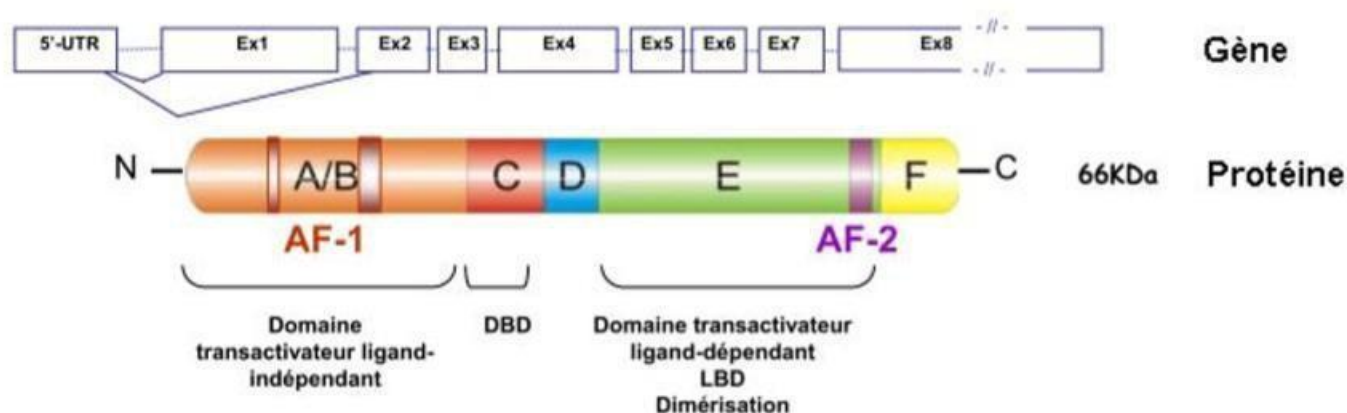
Les récepteurs hormonaux ER/ER- α et PR

Structure des récepteurs hormonaux ER/ER- α et PR

Le gène *ESR1* s'étend sur 140 kb et code la protéine ER composée de 595 acides aminés. ER comporte 6 domaines : A, B, C, D, E et F. Le domaine A/B est responsable des interactions entre protéines et initie l'action de fixation du récepteur avec son ligand. Le domaine C permet la dimérisation du récepteur et sa fixation à l'ADN. Le domaine D initie un signal de localisation nucléaire et a un rôle post-traductionnel. Le domaine E est le domaine de fixation du ligand, et le domaine F rend possible la reconnaissance ligand/récepteur. La protéine ER est représentée sur la Figure 3 (Billon-Galés *et al.*, 2009)

Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation du gène *ER* et de la protéine ER (adapté de Billon-Galés *et al.*, 2009).

Abréviations : DBD (domaine de liaison à l'ADN), LDB (domaine de liaison du ligand).



Le récepteur PR est composé de 933 acides aminés et agit sous la forme d'un dimère. Il existe deux isoformes codés par le même gène : PRA et PRB qui diffèrent en taille et poids moléculaire. Elles comprennent un domaine de liaison au ligand en C-terminal et un domaine de régulation de l'activité en N-terminal.

Les récepteurs ER, PRA et PRB possèdent deux domaines d'activation de la transcription appelés AF1 et AF2. PRB possède un domaine supplémentaire nommé AF3.

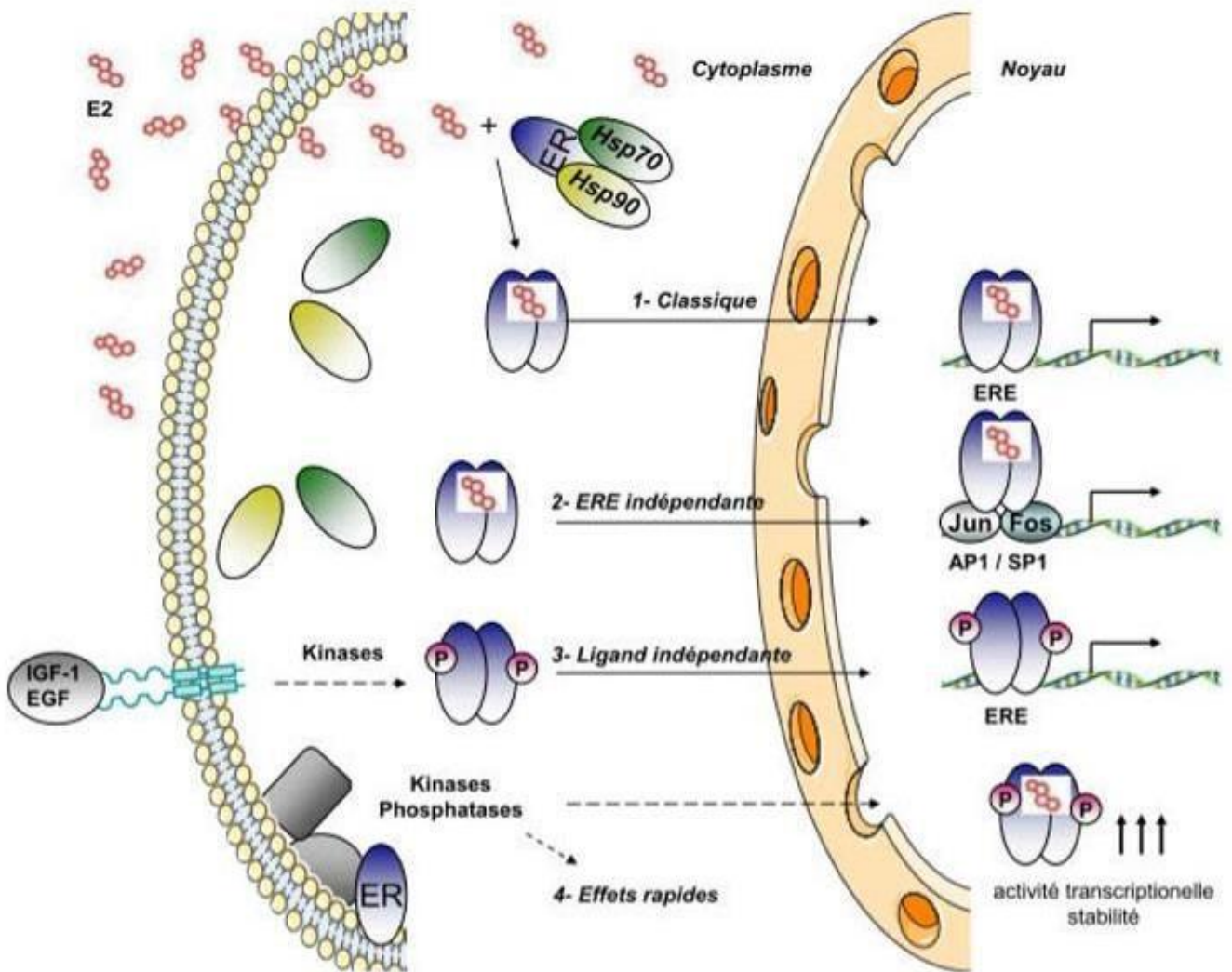
Mécanisme d'action des récepteurs hormonaux ER/ER- α et PR

Les modes d'action des récepteurs hormonaux ER et PR sont très similaires. Lorsqu'il n'est pas lié aux oestrogènes, le récepteur ER est localisé dans le cytoplasme ou dans le noyau des cellules sous la forme d'un monomère associé à des protéines chaperonnes. De la même façon, lorsqu'il n'est pas lié à la progestérone, le récepteur PR est dans le cytoplasme où il est associé à des protéines de choc thermique ou HSP (*Heat Shock Proteins*). Ainsi, en l'absence de ligand, les récepteurs PR et ER sont sous des formes inactives. Le ligand, après avoir diffusé à travers la membrane plasmique des cellules, se lie à son récepteur. Il en résulte une dissociation des protéines chaperonnes et HSP, et une modification de la structure du récepteur qui permet sa dimérisation (ER/ER et PR/PR). Une fois sous la forme d'un dimère, le récepteur migre dans le noyau cellulaire. Il peut alors se fixer à des segments d'ADN contenant des motifs spécifiques appelés éléments de réponse ERE (*Estrogen Responsive Element*) pour ce qui concerne ER, ou PRE (*Progesterone Responsive Element*) pour ce qui concerne PR. Les récepteurs ER et PR induisent alors la transcription des gènes cibles (Guiochon-Mantel *et al.*, 1989).

Il existe trois autres mécanismes d'action du récepteur aux estrogènes (ER). Après activation et dimérisation, ER peut se fixer à l'ADN via un facteur de transcription et amplifie ou diminue la transcription du gène concerné. ER a également une localisation membranaire avec un mécanisme d'action rapide. Il peut agir sur le métabolisme du calcium et sur la voie PI3K/AKT. Enfin, des facteurs de croissance comme le facteur de croissance épidermique (EGF) peuvent activer des kinases qui phosphorylent le récepteur ER alors que le récepteur n'est pas lié à son ligand. Ce dernier se fixe à l'ADN au niveau des motifs spécifiques ERE. Ces mécanismes sont résumés sur la Figure 4.

Figure 4 : Mécanisme d'action du récepteur aux œstrogènes (Modifié d'après Heldring *et al.*, 2007; Reid *et al.*, 2002).

- 1- Mécanisme d'action classique (direct) : après activation par le ligand, les dimères de récepteurs se lient à l'ADN au niveau de séquences spécifiques (ERE).
- 2- Mécanisme d'action ERE-indépendant (indirect) : les dimères de récepteurs se lient à l'ADN via des interactions protéiques.
- 3- Mécanisme d'action ligand-indépendant : des facteurs de croissance activent des kinases qui phosphorylent le récepteur qui se fixe à l'ADN au niveau des motifs spécifiques ERE.
- 4- Mécanisme d'action non-génomique : les récepteurs localisés à la membrane activent des kinases, conduisant à des modifications rapides de protéines cytoplasmiques ou bien à des régulations transcriptionnelles.



Les rôles physiologiques des récepteurs ER/ER- α et PR et leur rôle dans la tumorigenèse

Historiquement, il a été montré que l'effet tumorigène des œstrogènes sur la glande mammaire est dû à l'activation du récepteur aux œstrogènes. Ce dernier augmente la production de facteurs de croissance, induisant une prolifération cellulaire. Les œstrogènes ont également un rôle dans la division cellulaire. Ils régulent directement le cycle cellulaire en augmentant l'expression des cyclines D1 et en diminuant l'inhibition des kinases cycline-dépendantes (Locker, 1998). De plus, des recherches récentes montrent que les œstrogènes et leurs métabolites ont un effet génotoxique. Ils augmentent le nombre de mutations et induisent une aneuploïdie indépendante des récepteurs aux œstrogènes (Sorenmo *et al.*, 2013).

La production de l'hormone de croissance (*growth hormone*, ou GH) et de son récepteur (*growth hormone receptor*, ou GHR) par la glande mammaire augmente avec la concentration en progestérone. La GH stimule la croissance de glande mammaire directement et indirectement via la production d'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1* ou somatomédine C). L'IGF-1 induit la prolifération et la survie des cellules épithéliales mammaires. Elle régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans le développement tumoral. Une dérégulation complexe des hormones et des facteurs de croissance cités précédemment contrôle la tumorigenèse de la glande mammaire. Les tumeurs mammaires malignes ont une plus forte concentration en GH et IGF-1 que les tumeurs mammaires bénignes (Sorenmo *et al.*, 2013, 2011).

Le récepteur à la progestérone PR est essentiel au développement normal des alvéoles mammaires et des nombreux conduits. La concentration sérique en progestérone augmente naturellement après chaque ovulation grâce à la présence du corps jaune (phase lutéale) et continue d'augmenter lors de la gestation. Le gène *PR* est également une cible du récepteur aux œstrogènes ER. Les deux récepteurs sont souvent co-exprimés au sein des mêmes cellules. Le récepteur PR régule la prolifération cellulaire en interagissant avec la cycline D1. Le récepteur à la progestérone PR augmente la quantité d'ARN messager codant la protéine RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) par un mécanisme post-transcriptionnel qui permet de stabiliser l'ARNm. La protéine RANKL est détectée uniquement dans les cellules positives pour le récepteur PR ; elle a des fonctions mitogènes, anti-inhibitrices de signaux de croissance cellulaire, et complexes via de nombreux autres signaux intracellulaires qui favorisent l'activation des cellules souches mammaires (Briskin *et al.*, 2015).

L'expression des récepteurs ER et PR est plus élevée dans les tumeurs mammaires bénignes que dans les tumeurs malignes. Les récepteurs hormonaux sont également présents en plus grande quantité chez les chiennes entières, jeunes et en œstrus que chez les chiennes castrées, âgées ou en anœstrus (De Las Mulas *et al.*, 2005; Donnay *et al.*, 1996).

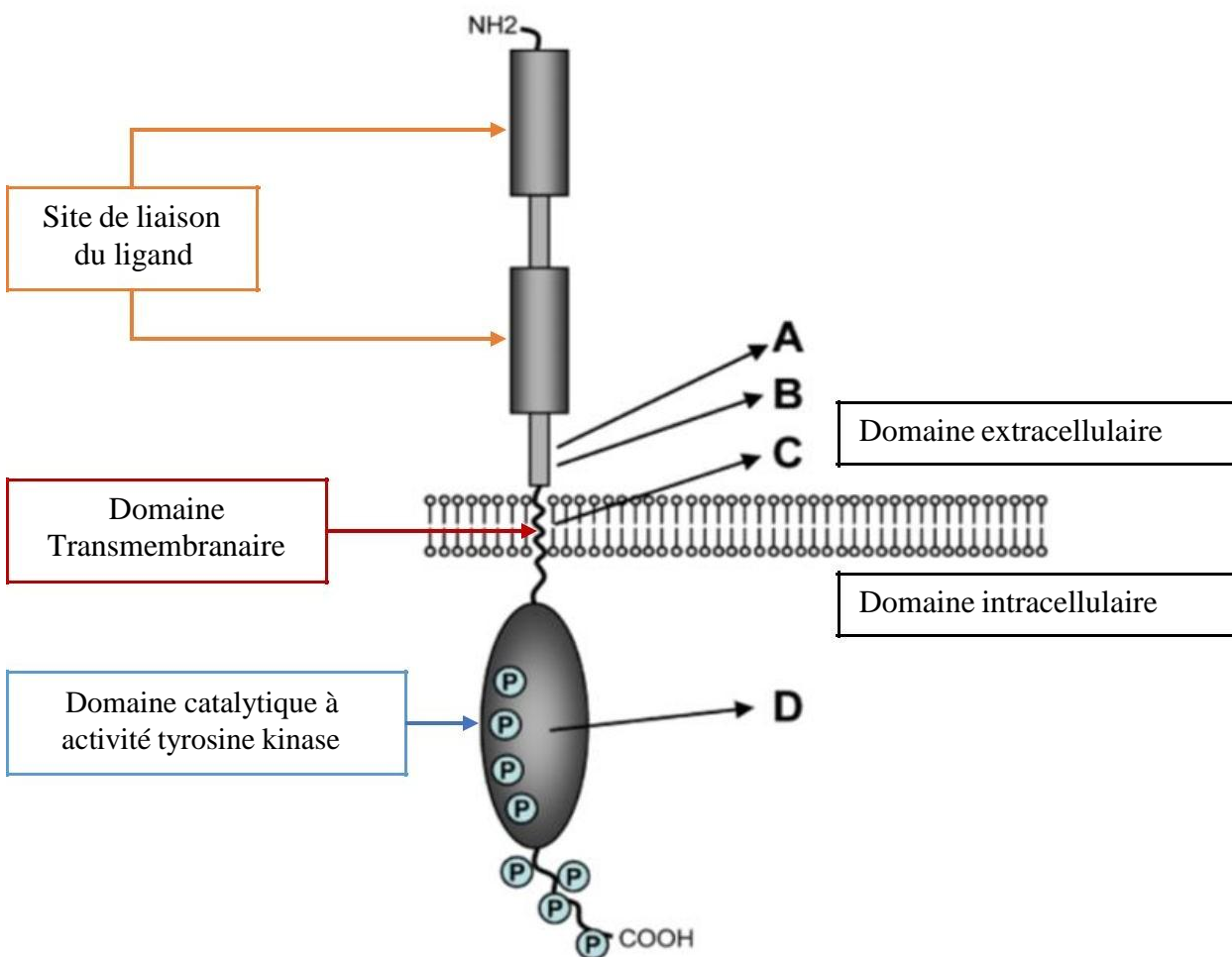
Le récepteur à activité tyrosine kinase ERBB2/HER2/NEU

Structure de la protéine HER2 et capacité de dimérisation

L'activation des protéines HER

Selon Moasser (2007), les protéines HER sont des récepteurs transmembranaires de facteurs de croissance dont la fonction est d'activer un signal intracellulaire en réponse à une activation extracellulaire. Quatre récepteurs, HER1 ou EGFR, HER2, HER3 et HER4, ont été identifiés. Ces récepteurs sont constitués d'un domaine extracellulaire sur lequel se fixe un ligand, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire comprenant un site d'autophosphorylation riche en résidus tyrosine dont dépend l'activité tyrosine kinase. Le récepteur HER2 est représenté Figure 5.

Figure 5 : Schéma représentant HER2, récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase. Les lettres représentent les localisations des mutations les plus fréquentes de HER2 (Moasser, 2007).



Une fois le domaine extracellulaire activé par la fixation du ligand, les protéines HER changent de conformation et passent d'une forme inactive à une forme active. Ce changement de conformation promeut la dimérisation des récepteurs. Suite à la dimérisation, une transphosphorylation du domaine intracellulaire a lieu. Elle induit l'activation de messagers intracellulaires.

Ces derniers activent de nombreux seconds messagers, eux-mêmes pouvant interagir avec d'autres signaux transmembranaires. Ces processus conduisent à divers effets biologiques, parmi lesquels une augmentation de la prolifération et un accroissement de la survie cellulaire.

Contrairement aux autres protéines HER, HER2 se présente toujours sous une forme active. La fixation du ligand sur le récepteur HER2 n'induit pas l'activation de messagers intracellulaires. L'induction de la transphosphorylation du domaine intracellulaire est permise par l'hétérodimérisation de HER2 avec une autre protéine HER activée. HER2 semble avoir une forte activité catalytique. Lorsque la protéine HER2 forme des hétérodimères avec d'autres membres de la même famille, l'activité en est encore plus importante.

De nombreuses expériences ont été résumées dans la méta-analyse effectuée par Moasser (2007), dont les principaux résultats sont présentés ci-dessous.

Le rôle de HER2 dans la tumorigenèse

Surexpression de HER2 et dérégulation des signaux induits par la famille HER

La surexpression de HER2 accroît le nombre d'hétérodimères HER2/HER3 et HER2/EGFR (Moasser, 2007).

Lors d'une hétérodimérisation HER2/EGFR, la régulation de l'endocytose de l'EGFR est perturbée. L'EGFR est en effet le seul récepteur de la famille HER qui est dégradé par endocytose après la fixation du ligand et la dimérisation du récepteur. Les autres récepteurs HER ne sont pas dégradés par endocytose, mais recyclés. L'hétérodimère HER2/EGFR échappe donc à la dégradation et les récepteurs sont recyclés après endocytose. Ce phénomène accroît l'intensité et la durée du signal intracellulaire. La surexpression de HER2 accroît ainsi par extension l'activité et l'expression membranaire du récepteur EGFR. L'hétérodimérisation expérimentale de HER2/EGFR promeut un phénotype invasif via les voies de signalisation RAS (non-développée ici) et phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K).

En cas de surexpression de HER2, l'hétérodimérisation HER2/HER3 est associée à une augmentation de la phosphorylation de HER3 et à une activation de la voie PI3K/AKT.

Un commentaire sur la voie PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) /AKT :

L'activation de la kinase PI3K lors de la dimérisation de HER2 induit la phosphorylation du PIP₂ (phosphatidylinositol-biphosphate) en PIP₃ (phosphatidylinositol-triphosphate) (Dalenc, 2015). Le PIP₃ recrute la kinase AKT qui est phosphorylée par des protéines kinases. La présence d'une protéine AKT activée entraîne la phosphorylation de plusieurs protéines en aval à l'origine de multiples signaux de transduction qui régulent des fonctions cellulaires de grande importance dans le mécanisme de tumorigenèse. Parmi ces fonctions se trouvent la prolifération cellulaire et la survie cellulaire, la taille de la cellule et sa réponse à des nutriments, la modification du métabolisme du glucose, l'invasion cellulaire, la transition épithélio-mésenchymateuse, la stabilité du génome et l'angiogénèse.

La phosphatase PTEN (pour *Phosphatase and TENsin homolog*) constitue un frein à ce processus car son action est de déphosphoryler le PIP₃ en PIP₂. La protéine PTEN est un inhibiteur de la cascade de transduction.

Un commentaire sur SRC :

La protéine kinase SRC est un important 2^{ème} messager de HER2. Son activation est observée dans de nombreux cancers du sein, associée ou non à une surexpression de HER2. Deux études ont utilisé des inhibiteurs spécifiques de SRC sur des lignées cellulaires de tumeurs du sein surexprimant HER2 afin de comprendre ses fonctions. L'inhibition de la kinase SRC a induit plusieurs phénotypes en particulier une inhibition sélective de l'invasion cellulaire et de l'état pro-métastatique au niveau de la membrane basale, un arrêt complet de la croissance cellulaire et une activation de l'apoptose (Belsches-Jablonski *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2005). La protéine SRC a donc un rôle dans la transformation et de la tumorigenèse des cellules de la glande mammaire surexprimant HER2.

SRC phosphoryle le domaine SH2 de HER2. Il augmente la stabilité et l'activité tyrosine kinase de HER2. SRC facilite également la formation de dimères HER2/HER3, accroît la transphosphorylation de ces récepteurs et augmente le signal qu'ils transmettent (Moasser, 2007).



HER2 forme des dimères avec EGFR et HER3, et active de nombreuses voies intracellulaires favorisant la formation de tumeurs. La formation de ces hétérodimères intensifie et prolonge la durée du signal intracellulaire transmis par ce récepteur.

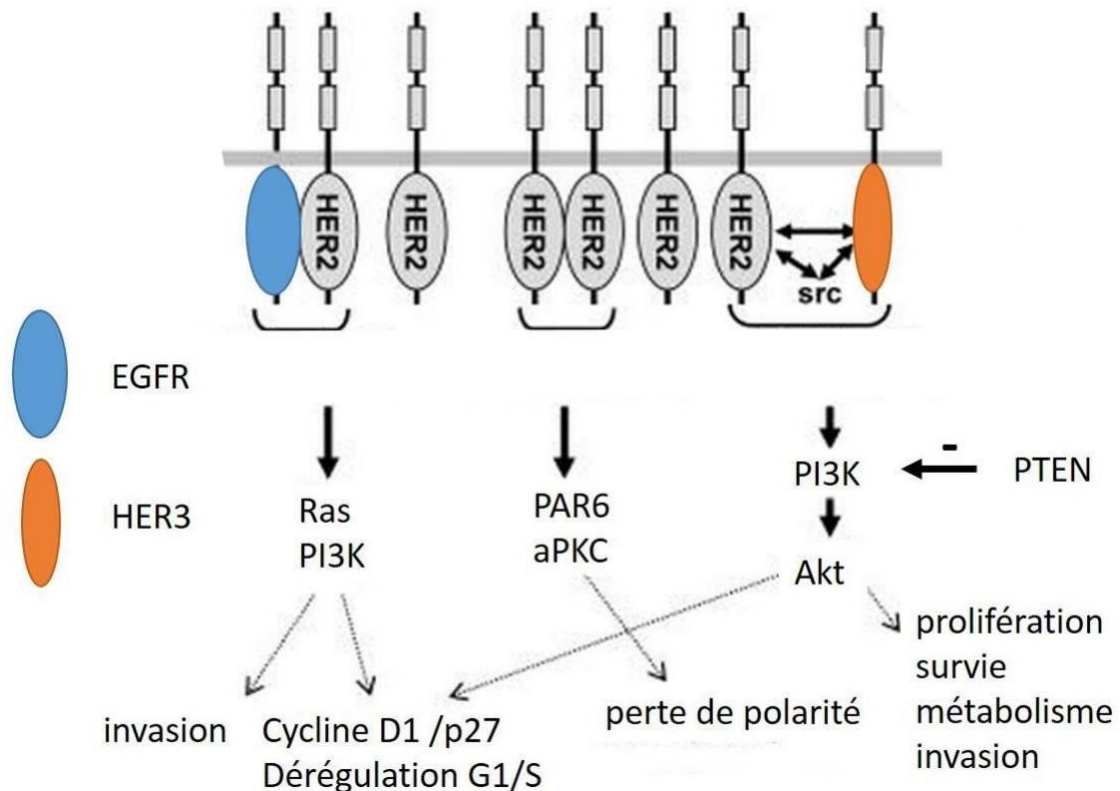
Surexpression de HER2 et dérégulation du cycle cellulaire

Le récepteur HER2 a pour gènes cibles deux régulateurs du cycle cellulaire : la cycline D1 et la protéine p27, également connue sous le nom de protéine 1 inhibitrice des kinases (KIP1). La cycline D1 est un promoteur de l'entrée de la cellule en phase S, alors que p27 entrave la prolifération cellulaire (Dalenc, 2015). Grâce à de nombreux mécanismes non-développés ici, HER2 régule p27. Brièvement, HER2 active la voie AKT. La protéine AKT activée phosphoryle p27 et inhibe sa fonction en l'excluant du noyau. L'expression de la cycline D1 dans les tumeurs du sein qui surexpriment HER2 n'est pas plus élevée que dans les tumeurs du sein qui ne surexpriment pas HER2. Le rôle du récepteur HER2 dans la régulation de la cycline D1 n'est donc pas clairement établi.

L'homodimérisation et l'activation expérimentale de HER2 induit une disjonction des jonctions serrées, la perte de la polarité cellulaire et une croissance anarchique des cellules de l'acinus du tissu mammaire (étude de Muthuswamy *et al.*, 2001 développée partie 2.2.4.3). Cette perte de polarité est possible via les voies aPKC et PAR6 non-développées ici (Moasser, 2007).

L'ensemble des voies impliquées sont présentées Figure 6.

Figure 6 : Voies de signalisation intracellulaire résultant d'une surexpression du récepteur HER2 (adapté de Moasser, 2007).

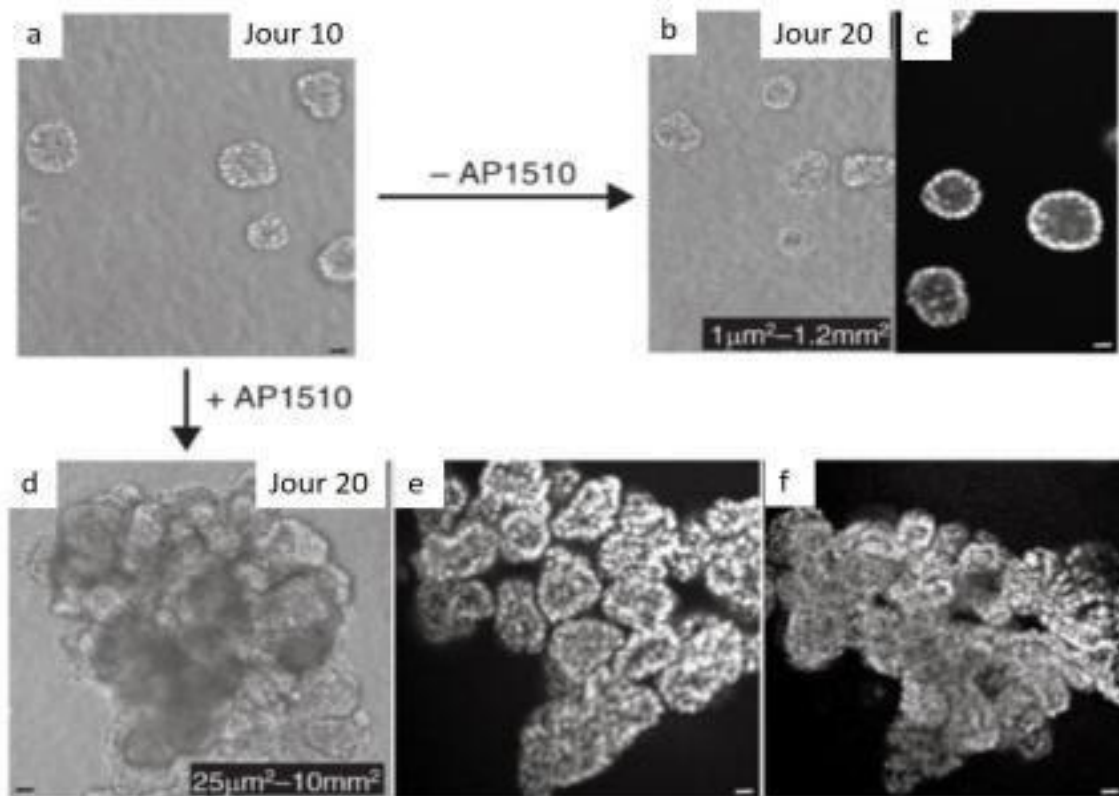


Surexpression de HER2 : arrêt de l'adhérence cellulaire, de l'organisation et de la polarité cellulaire, reprise de la prolifération cellulaire.

Afin d'examiner les effets d'une activation des récepteurs EGFR et HER2 dans un contexte qui mime des cellules épithéliales polarisées *in vivo*, Muthuswamy et ses collaborateurs (2001) ont induit une homodimérisation de EGFR et HER2. Ils ont utilisé des cellules humaines non transformées d'acini mammaires, en arrêt de croissance, cultivées sur une membrane gélifiée en trois dimensions, en présence d'un ligand synthétique, AP1510, qui induit leur homodimérisation. Les récepteurs EGFR et HER2 utilisés étaient des protéines chimères, nommées respectivement p75.B1 et p75.B2, capables de fixer le ligand synthétique. Les récepteurs synthétiques p75.B1 et p75.B2 ne sont pas capables d'interagir avec les récepteurs endogènes EGFR et HER2. Les récepteurs synthétiques étaient correctement localisés sur la face basolatérale des cellules polarisées. Enfin, chaque acinus ne dérivait que d'une seule cellule.

Aucun effet biologique n'a été observé à la suite de l'homodimérisation du récepteur EGFR. L'activation de HER2, quant à elle, a induit une réinitialisation de la prolifération cellulaire et a altéré les propriétés structurales des acini. Ces altérations de structure comprenaient une disparition du lumen, la disjonction des jonctions serrées et une perte de la polarité dans 70% des acini dont 35% formaient une structure en acini multiples désorganisés. Ces nouvelles structures étaient de 10 à 100 fois plus larges que les acini normaux. Chacune d'entre elles dérivait d'un seul acinus (Figure 7).

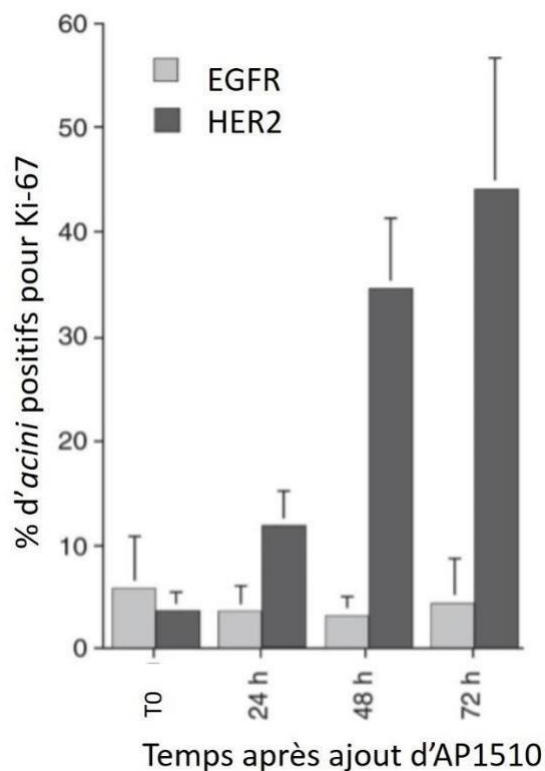
Figure 7 : Cellules exprimant le récepteur chimère p75.B2 en l'absence du ligand synthétique AP1510 pendant 10 jours (a), 20 jours (b, c), et en présence du ligand AP1510 du 10^{ème} au 20^{ème} jour (d, e, f) (Muthuswamy *et al.*, 2001).



Dans cette étude, le nombre des nouveaux acini désorganisés augmentait avec la concentration en HER2 synthétique. Les acini désorganisés reprenaient une structure normale lorsqu'ils étaient placés dans un milieu sans ligand synthétique, indiquant que la désorganisation des acini faisant suite à une surexpression de HER2 est réversible.

L'activité du marqueur de la prolifération cellulaire Ki-67 a ensuite été mesurée afin de savoir si une homodimérisation de HER2 induit une reprise de la prolifération des cellules précédemment bloquées dans leur cycle cellulaire. L'activation de HER2 a induit l'expression de Ki-67 dans 30 à 50% des acini. En contraste, aucune expression significative de Ki-67 n'a été observée après une homodimérisation de EGFR (Figure 8).

Figure 8 : Graphique représentant le pourcentage d'acini exprimant le marqueur de la prolifération cellulaire Ki-67 en fonction de la durée d'une stimulation par le ligand synthétique AP1510 (Muthuswamy *et al.*, 2001).



Ces résultats indiquent que le récepteur HER2 est capable de réinitialiser la prolifération cellulaire de cellules polarisées en arrêt de croissance, sur une matrice en trois dimensions. Le récepteur EGFR ne partage pas cette capacité avec HER2.



Une homodimérisation de HER2 transforme les acini mammaires humains en structures désorganisées avec une perte de la polarité et des jonctions cellulaires. Les nouvelles structures ressemblent à celles de carcinomes *in situ* observés *in vivo*.



Une homodimérisation de HER2 provoque une réinitialisation de la prolifération cellulaire sur ces cellules préalablement en arrêt de croissance.

La dépendance en HER2 de la tumeur

Une tumeur mammaire qui surexprime le récepteur HER2 est-elle dépendante ou non de HER2 pour sa survie et sa progression ? La réponse à cette question permettra de savoir si HER2 est une cible thérapeutique potentielle. Une étude a tiré parti de systèmes *knock-down* visant à diminuer l'expression du récepteur HER2 à l'aide de petits ARN interférents (siARN, *small interfering ARN*) (Faltus *et al.*, 2004). L'objectif de cette étude était d'observer l'impact de la diminution de l'expression du récepteur HER2 sur quatre lignées cellulaires de tumeurs du sein qui surexprimaient HER2. Quatre siARN ont été utilisés afin de cibler différentes portions de l'ARNm de *HER2*.

Les cellules tumorales ont été mises en contact avec les différents siARN et avec un siARN témoin, ne ciblant pas *HER2*. Après 48 heures de contact avec les quatre siARN, la quantité d'ARNm avait diminué de 7 à 60% par rapport aux expériences témoins selon les lignées cellulaires et les siARN utilisés. Le niveau d'expression du récepteur HER2, mesuré par immunohistochimie, était fortement diminué 96h après mise en contact des cellules avec les siARN. L'immunomarquage avait, en effet, complètement disparu dans deux lignées cellulaires. Après 96 heures de contact avec les siARN, ces deux lignées cellulaires présentaient une inhibition significative de la prolifération, entre 66 et 70% selon la lignée cellulaire et l'ARNi utilisés par rapport aux expériences témoins. Le nombre de cellules en cours d'apoptose, mesuré à l'aide de marqueurs classiques de l'apoptose (annexin V et pro-caspase 3), avait significativement augmenté dans ces deux lignées cellulaires. Ces expériences effectuées dans des lignées de cellules tumorales humaines ont montré que les cellules des tumeurs qui surexpriment HER2 dépendent de l'expression de HER2, et subissent, en l'absence de HER2, une inhibition de croissance, et une apoptose cellulaire. Cette étude confirme les résultats de précédentes études (Colomer *et al.*, 1994; Roh *et al.*, 2000).

Les cellules des tumeurs de cancer du sein qui surexpriment le récepteur HER2 dépendent de l'expression de HER2 pour leur survie. HER2 apparaît comme une des nouvelles cibles anti-cancéreuses les plus prometteuses (cf. 4.2.2.1).

Surexpression de HER2 et amplification du gène *HER2* dans les tumeurs du sein humaines ?

Venter et collaborateurs ont cherché à savoir si l'amplification du gène *HER2* est associée à une surexpression de l'oncoprotéine HER2 dans le cancer du sein chez la femme. Ils ont observé une amplification du gène *HER2* sur 33% (12/36) des tumeurs du sein de l'étude. Dix-sept pour cent (6/36) des tumeurs portaient de 2 à 5 copies du gène, 11% (4/36) portaient 6 à 20 copies du gène, et 6% (2/36) portaient plus de 20 copies du gène. Le niveau d'expression de la protéine HER2, mesuré par immunohistochimie et par Western-Blot, était fortement augmenté dans 67% (8/12) des tumeurs où le gène *HER2* était amplifié (Venter *et al.*, 1987).



L'amplification du gène *HER2* et l'expression de la protéine HER2 sont plus élevées dans certaines tumeurs du sein de la femme.

Cette découverte a été confortée par de nombreuses études selon lesquelles 15 à 30% des carcinomes mammaires de la femme présentent une surexpression de la protéine HER2. Des expériences d'hybridation *in situ* ont confirmé que dans 85 à 90 % des cas de surexpression de HER2, une amplification du gène *HER2* peut être observée (De las Mulas *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2009).

Une étude de l'observatoire national des anatomopathologistes sur HER2, RO-RP et Ki-67 dans le cancer du sein (HERFrance) a montré que le pourcentage de tumeurs du sein HER2-positives en France est de $12,12 \pm 0,8\%$ (Penault-Llorca, 2015).

Surexpression de HER2 et malignité

Slamon et collaborateurs ont été les premiers à chercher à associer l'amplification du gène *HER2* et d'éventuels facteurs pronostiques (Slamon *et al.*, 1987). Leur travail a été effectué en deux étapes.

Lors de la première étape, ils ont analysé 103 tumeurs primitives du sein. Dix-huit pour cent (19/103) des tumeurs présentaient une amplification du gène *HER2*. Le nœud lymphatique n'était pas atteint dans 11% des tumeurs. Un à trois nœuds lymphatiques étaient atteints dans 10% des tumeurs. Plus de trois nœuds lymphatiques étaient atteints dans 32% des tumeurs. Une analyse des groupes « plus de trois nœuds lymphatiques atteints » et « moins de trois nœuds lymphatiques atteints » a révélé une association significative (positive) entre l'amplification du gène *HER2* et l'atteinte des nœuds lymphatiques.

Lors de la seconde étape, Slamon et collaborateurs ont travaillé sur 86 tumeurs primitives du sein ayant métastasé à des nœuds lymphatiques. Quarante pour cent (34/86) des tumeurs portaient une amplification du gène *HER2*. Une association significative positive a été observée entre le nombre de copies du gène *HER2* et la présence et le nombre de nœuds lymphatiques atteints, et la taille de la tumeur. Une association significative négative a également été observée entre le nombre de copies du gène *HER2* et la présence de récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone.



L'amplification du gène *HER2* semble être un facteur pronostique de la présence et du nombre de métastases dans les nœuds lymphatiques, et de la taille de la tumeur.

Le gène *HER2* dans les carcinomes mammaires canins

Localisation du gène *ERBB2/HER2NEU* dans le génome du Chien

En 2001, Murua Escobar et collaborateurs ont cartographié par la technique de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) le gène orthologue de *HER2* sur le chromosome 1 du Chien sur la bande cytogénétique q13.1 (Murua Escobar *et al.*, 2001). Ce chromosome ne présente pas de synténie conservée avec le chromosome 17 de l'Homme sur lequel est localisé le gène *HER2*. Il existe des synténies conservées entre le chromosome 17 humain et les chromosomes 5 et 6 canins, mais aucun signal correspondant à *HER2* n'a été trouvé par FISH sur ces chromosomes canins. La bande 1q13.1 est une des zones de réarrangement les plus fréquentes dans les tumeurs canines (Reimann *et al.*, 1999). Des translocations de cette région peuvent être à l'origine d'une activation du gène *HER2*. Une trisomie du chromosome 1 canin a également été décrite dans des cas de leucémie (Reimann *et al.*, 1998). Cette trisomie pourrait être responsable d'une surexpression de gènes du chromosome 1, parmi lesquels le gène *HER2*.

Le potentiel de transformation de *HER2* chez le Chien

Hsu et collaborateurs ont amplifié et séquencé l'ADN complémentaire (ADNc) des exons 14 à 18 du gène *HER2* exprimé dans 19 tumeurs mammaires canines caractérisées comme surexprimant la protéine HER2 sur la base d'un test immunohistochimique semi-quantitatif, le *HercepTest* (cf. 3.1.2.1). Les séquences obtenues ont été comparées avec celles de l'ADN génomique et d'ADNc des tissus normaux (GenBank). Aucune délétion de l'exon 16 n'a été observée, pas plus que de polymorphisme au codon 655, qui est observé dans des tumeurs de la femme (cf. 2.2.3.3). Une seule modification de la séquence nucléotidique a été observée. Seize pour cent (3/19) des tumeurs mammaires malignes présentaient un polymorphisme d'un seul nucléotide (T¹⁷²⁵C) dans l'exon 14. Il s'agit d'une mutation synonyme (silencieuse) car cette modification ne change pas l'acide aminé (une cystéine) (Hsu *et al.*, 2009).

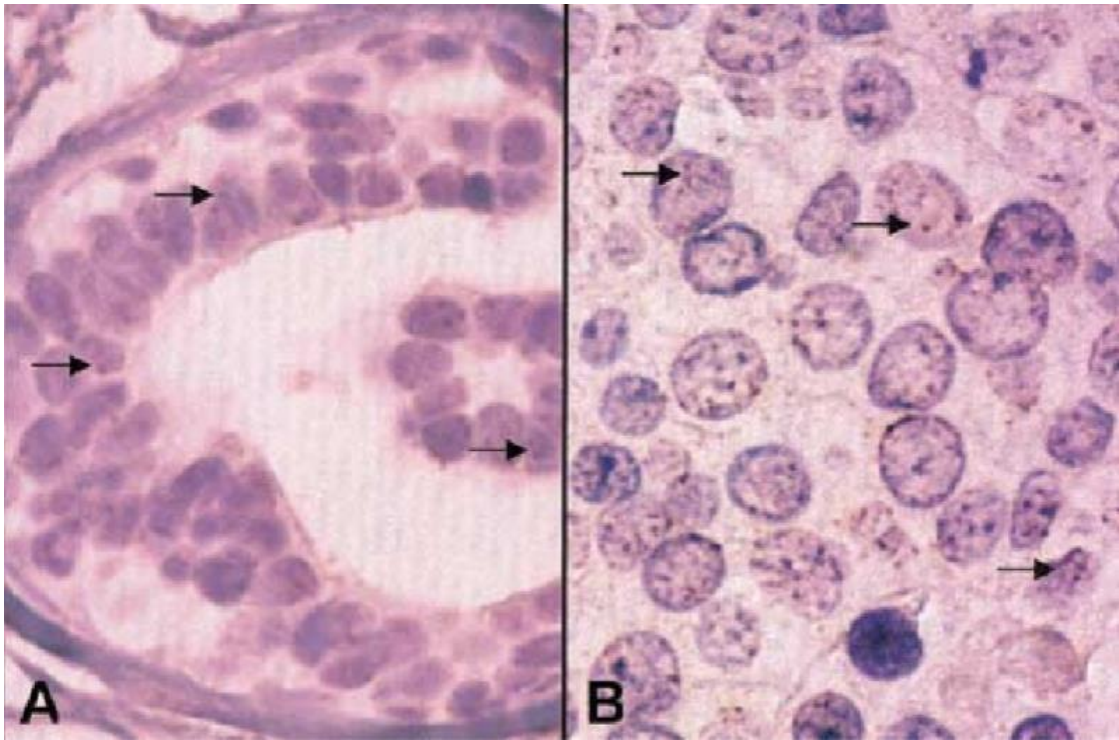
La surexpression de HER2 dans les tumeurs mammaires canines ne semble pas être due à une mutation nucléotidique dans la séquence codante du gène. Elle pourrait bien sûr être la conséquence d'autres mécanismes moléculaires tels que l'amplification du gène *HER2*, une augmentation de la transcription du gène ou de la traduction de l'ARN messager.

Surexpression et amplification du gène *ERBB2/HER2/NEU* chez le Chien ?

Des études indépendantes ont montré que les tumeurs mammaires canines présentent une amplification du gène *HER2* (Ahern *et al.*, 1996), et une surexpression de l'oncoprotéine HER2 (Rungsiapat *et al.*, 1999). Cependant, jusqu'en 2003, aucune étude n'avait analysé sur les mêmes lésions de la glande mammaire l'amplification du gène *HER2* (par CISH, *Chromogenic in situ hybridization*, une technique voisine de la FISH), et la surexpression de l'oncoprotéine HER2 (par immunohistochimie).

De las Mulas et collaborateurs ont analysé 23 prélèvements de glande mammaire canine, 17 carcinomes invasifs, 6 lésions bénignes et un fragment de tissu sain (De las Mulas *et al.*, 2003). La surexpression de l'oncoprotéine HER2 a été évaluée selon le *HercepTest* sur les 23 prélèvements (cf. partie 3.1.2.1. pour une explication du test) et caractérisée comme 2+ ou 3+. L'amplification du gène *HER2* sur les prélèvements a été évaluée par CISH sur 9 prélèvements : 3 carcinomes malins notés 3+ (d'après le *HercepTest*), 3 carcinomes malins notés 2+, 2 lésions bénignes, et le fragment de tissu sain. Le prélèvement était considéré comme positif pour l'amplification du gène *HER2* si plus de cinq copies du gène par noyau étaient présentes. Les résultats ont révélé une surexpression de l'oncoprotéine HER2 sur les prélèvements malins uniquement. Cette surexpression a été évaluée à 17%. Ce pourcentage est compris dans l'intervalle de 15 à 30% qui a été attribué à la surexpression de HER2 dans les carcinomes mammaires humains (cf. 2.2.5). L'analyse CISH a révélé entre un et quatre signaux par noyau soit une à quatre copies de *HER2* par cellule (Figure 9). Le nombre de copies du gène *HER2* était le même sur les tumeurs HER2 positives et négatives telles que caractérisées grâce au *HercepTest*. Aucun des prélèvements utilisés dans cette étude n'était considéré comme positif pour l'amplification du gène *HER2* contrairement aux 74% (17/23) des tumeurs mammaires malignes canines analysées par Ahern et collaborateurs (Ahern *et al.*, 1996). Cette discordance dans les résultats peut être expliquée par le fait que les deux études reposent sur des techniques différentes et n'utilisent pas les mêmes critères de positivité pour affirmer que le gène *HER2* est amplifié ou non. Ainsi, il existe des tumeurs mammaires canines qui surexpriment le récepteur HER2, sans que cette surexpression soit associée à une amplification du gène *HER2*. Ce phénomène est retrouvé dans 10 à 15% des carcinomes mammaires de la femme (cf. 2.2.5.).

Figure 9 : Nombre de copies du gène *HER2* dans une glande mammaire canine. De un à quatre signaux par noyau sont présents dans une lésion épithéliale proliférative bénigne (A) (flèches indiquant le marquage CISH) et dans un carcinome mammaire (B) (De las Mulas et al., 2003).



La surexpression de la protéine HER2 dans les tumeurs mammaires canines ne semble pas être due à une mutation nucléotidique dans la séquence codante ni à une amplification du gène *HER2*. Des anomalies chromosomiques, une augmentation de la transcription du gène ou de la traduction de l'ARN messager pourraient expliquer cette surexpression. Nous avons vu précédemment (cf. 2.2.7.1) que la bande cytogénétique 1q13.1 où est localisé le gène *HER2* est souvent le lieu d'anomalies chromosomiques (Murua Escobar *et al.*, 2001). Des travaux complémentaires seront nécessaires pour comprendre l'origine de la surexpression de HER2.



On parle de « réaction croisée » lorsqu'un anticorps est capable de se lier à des antigènes différents mais portant des déterminants antigéniques très proches. Les résultats immunohistochimiques ont confirmé l'existence d'une réaction croisée entre l'anticorps anti-HER2 humain commercial utilisé dans l'étude de De las Mulas et collaborateurs, et les oncoprotéines HER2 humaine et canine. L'utilisation de cet anticorps commercial est donc possible en médecine vétérinaire.

TROISIÈME PARTIE : L'UTILISATION DES MARQUEURS À DES FINS DIAGNOSTIQUES, PRONOSTIQUES ET THÉRAPEUTIQUES

1. Diagnostic tumoral clinique et stadification : un premier pas vers le pronostic

Au vu du risque non négligeable de métastases associées à la présence d'une tumeur mammaire, il est préférable d'établir une stadification de la tumeur avant de débuter tout traitement. Une stadification minimale, en médecine vétérinaire, comprend une prise de sang (analyses hématologique et biochimique), des radiographies thoraciques (trois vues), et une ponction cytologique si possible de la tumeur. Au moindre doute quant à la malignité d'une tumeur, une échographie abdominale et/ou un scanner thoracique peuvent être indiqués pour compléter le bilan d'extension avant tout traitement (Sorenmo *et al.*, 2013).

La stadification des tumeurs mammaires chez le Chien est déterminée selon le système TNM (Tumeur/Nœuds lymphatiques/Métastases) (Owen, 1980). Le stade est attribué à la tumeur mammaire selon la taille de la tumeur, la présence de nœuds lymphatiques atteints et la présence de métastases à distance. Une version modifiée du système d'Owens a été publiée et est actuellement utilisée par la majorité des vétérinaires. Le stade traduit l'avancement tumoral et sa dissémination. Plus le stade TNN est élevé, moins le pronostic est bon. Le Tableau 2 présente les différents stades de cette classification.

Tableau 2 : Classification TNM (Tumeur/Nœuds lymphatiques/Métastases) du stade des tumeurs mammaires chez la chienne (selon Owen, 1980, version modifiée).

Stade	Taille de la tumeur	Statut des nœuds lymphatiques	Présence de Métastases
Stade 1	T1 (< 3 cm)	N0 (non atteints)	M0 (non)
Stade 2	T2 (3-5 cm)	N0	M0
Stade 3	T3 (> 5 cm)	N0	M0
Stade 4	T1 T2 ou T3	N1 (au moins un atteint)	M0
Stade 5	T1, T2, ou T3	N0 ou N1	M1 (oui)

Deux définitions distinctes du terme de « survie » sont utilisées dans la littérature :

- La survie globale (*overall survival*) : période écoulée entre la chirurgie d'exérèse tumorale ou le diagnostic tumoral et la mort de l'individu (naturelle ou induite en médecine vétérinaire), due à la tumeur.

La survie sans récurrence (*disease-free survival*) : période écoulée entre la chirurgie d'exérèse tumorale et la résurgence de la tumeur (récurrence de la tumeur primaire ou métastases).

Chez la femme, le cancer du sein métastatique a un sombre pronostic avec une survie à 5 ans inférieure à 20% et une médiane de 24 à 30 mois après le diagnostic des métastases (Frenel *et al.*, 2015). Les taux de survie chez le Chien sont détaillés ci-après.

2. Diagnostic du sous-type histologique et classification

Une révision du système de classification histologique des tumeurs mammaires canines a été publiée en 2011 (Goldschmidt *et al.*, 2011). Une tumeur mammaire de type histologique dit « simple » est une tumeur composée d'un seul type cellulaire (cellules épithéliales ou myoépithéliales). Une tumeur mammaire de type histologique dit « complexe » est une tumeur composée de deux types cellulaires (cellules épithéliales et myoépithéliales). Il est nécessaire de faire une distinction entre les lésions dysplasiques, les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes.

Plusieurs lésions d'hyperplasie et de dysplasie de la glande mammaire sont considérées comme précurseurs du développement de tumeur mammaire. Elles incluent l'ectasie canalaire, l'hyperplasie alvéolaire (avec ou sans activité sécrétoire), l'hyperplasie alvéolaire avec fibrose, la prolifération épithéliale, le développement de papillomes et la fibrose. Il existe plusieurs types de tumeurs mammaires bénignes chez le Chien. Elles incluent les adénomes, les adénomes tubulaires, les adénomes papillaires, les fibroadénomes, les myoépithéliomes, les adénomes complexes et les tumeurs bénignes mixtes (tumeurs complexes bénignes avec une composante mésenchymateuse supplémentaire).

Il existe deux grands types de tumeurs mammaires malignes canines : les carcinomes et les sarcomes. Les carcinomes sont des tumeurs des cellules épithéliales mammaires. Ils peuvent être simples ou complexes. Les carcinomes complexes sont de meilleur pronostic que les carcinomes simples. Parmi les carcinomes simples, il existe une malignité croissante des carcinomes tubulopapillaires, aux carcinomes solides, puis aux carcinomes de sous-types anaplasiques. Les tumeurs mixtes sont associées à un meilleur pronostic chez l'Homme et le Chien. Une exception existe concernant le myoépithéliome malin, tumeur mixte ayant un mauvais pronostic chez l'Homme. Il serait intéressant d'étudier davantage le rôle, encore méconnu, des cellules myoépithéliales dans la carcinogénèse des tumeurs mammaires chez le Chien (Pena *et al.*, 2014). La particularité du carcinome *in situ* est que la prolifération cellulaire épithéliale de la tumeur est confinée à l'intérieur de la membrane basale qui reste intègre. Au contraire, lors de carcinomes dits invasifs, l'infiltration cellulaire a lieu au-delà de la membrane basale qui n'est plus intègre. Dans ce cas, les cellules tumorales s'infiltrèrent dans les tissus environnants et disséminent dans l'organisme. Elles sont à l'origine d'une infiltration lymphatique et de métastases à distance. Les sarcomes mammaires canins sont en général de moins bon pronostic que les carcinomes et incluent les ostéosarcomes, les chondrosarcomes, les fibrosarcomes, les hémangiosarcomes et les carcinosarcomes. Les ostéosarcomes sont les sarcomes mammaires les plus fréquents. Ils sont souvent associés à des tumeurs existantes depuis un certain temps et à croissance soudaine très rapide. Des figures de mitoses y sont très fréquentes. La tumeur dissémine par la voie hématogène et métastase principalement aux poumons (Goldschmidt *et al.*, 2011; Pena *et al.*, 2014; Sorenmo *et al.*, 2013).

Le taux de survie globale à 2 ans est de 13,2% pour les sarcomes, 31,3% pour les adénocarcinomes et de 52 à 65% pour les carcinomes trabéculaires chez le Chien (Doliger, 2003).

Il est possible de classer les tumeurs épithéliales selon des critères anatomopathologiques. De nombreuses classifications existent chez le Chien mais elles sont, pour la majorité, basées sur la classification d'Elston et Ellis utilisée en médecine humaine. Cette classification établit un grade tumoral basé sur trois critères histologiques : le degré de différenciation architecturale, l'importance du pléomorphisme nucléaire et le nombre de mitoses par champs (Sorenmo *et al.*, 2013, Elston et Ellis, 2002). À chaque critère est attribuée une note de 1 à 3 selon les définitions suivantes :

- ➔ Degré de différenciation architecturale, formations tubulaires occupant : Plus de 75% de l'échantillon : 1
Entre 10 et 75 % de l'échantillon : 2
Moins de 10% de l'échantillon : 3
- ➔ Nombre de mitoses par champ (mesuré au grossissement x400) :
Zéro à 9 mitoses pour 10 champs : 1
10 à 19 mitoses pour 10 champ : 2
Plus de 20 mitoses pour 10 champs : 3
- ➔ Importance du pléomorphisme nucléaire :
Noyaux petits et réguliers, nucléoles rarement visibles : 1
Variation de taille et forme entre les noyaux modérée, nucléoles visibles, noyaux hyperchromatiques : 2
Variation marquée de la taille des noyaux, noyaux hyperchromatiques avec le plus souvent un ou plusieurs nucléoles proéminents : 3

Le grade histologique est déterminé par la somme des trois notes données (Tableau 3).

Tableau 3 : Grade en fonction du score total selon Elston et Ellis, 2002, pour les tumeurs mammaires chez la chienne

<i>Grade Score total</i>	<i>Degré de différenciation</i>	<i>Degré de malignité</i>
I	Bon	Faible
II	Moyen	Intermédiaire
III	Faible	Haut

Le taux de survie globale à 2 ans est de 86% pour le grade I, 43% pour le grade II et de 17% pour le grade III chez le Chien (Doliger, 2003).

Remarque : L'évaluation du pléomorphisme nucléaire implique une évaluation cytologique des structures des noyaux des cellules tumorales. Le pléomorphisme nucléaire est indépendant du modèle de croissance tumorale. La classification est donc applicable à tous les types de carcinomes mammaires (Elston et Ellis, 2002).

- ➔ La détermination d'un stade et d'un grade joue un rôle important dans l'établissement du diagnostic du sous-type tumoral et du pronostic avant de prendre toute décision lors de l'élaboration du plan thérapeutique.
- ➔ De nombreux facteurs peuvent ainsi être associés à un faible pronostic en cas de tumeur mammaire chez le Chien comme la taille de la tumeur (>5cm), la classification histologique (carcinome simple, sarcome), le grade histologique élevé, l'index mitotique au-dessus de la moyenne et la présence d'invasion lymphatique (Ressel *et al.*, 2013, Hsu *et al.*, 2009, De Las Mulas *et al.*, 2005).

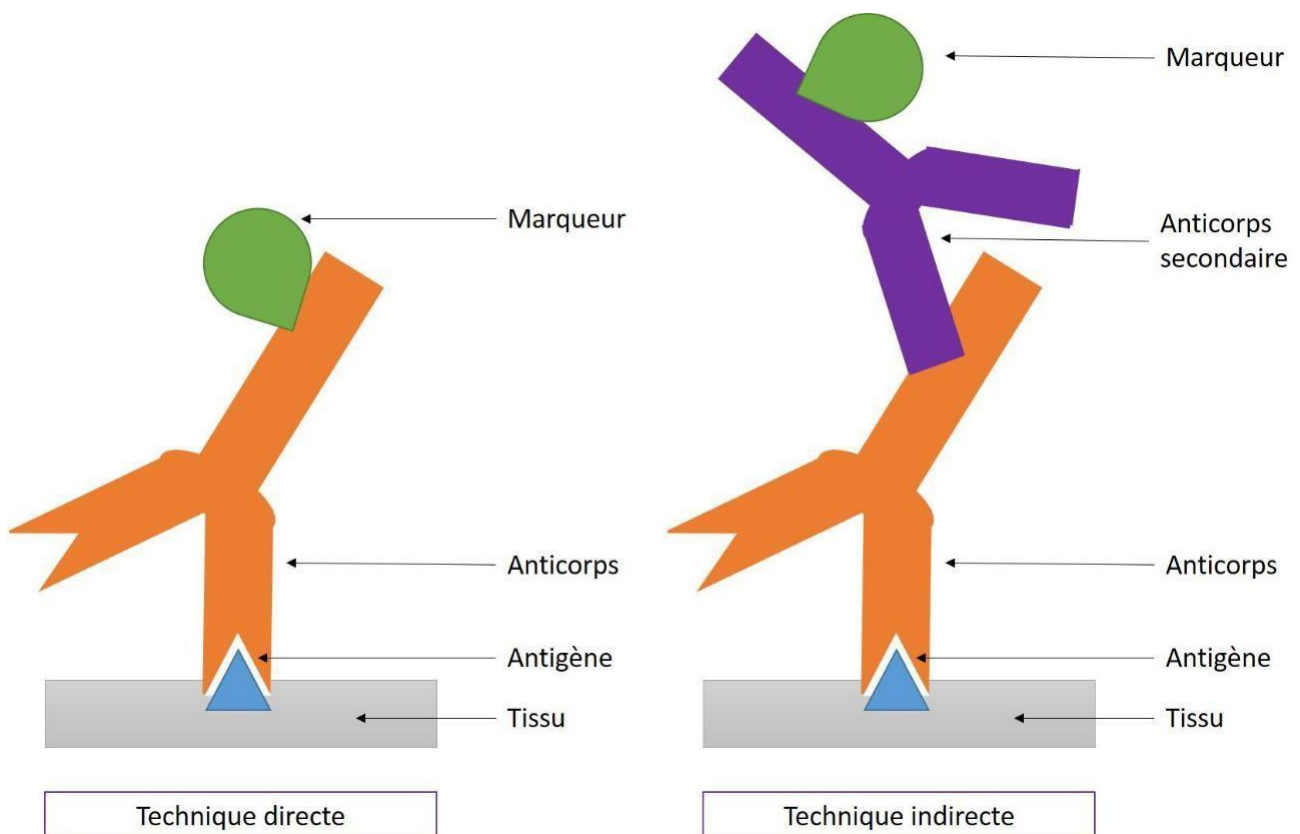
3. La mise en place de profils immunohistochimiques et l'utilisation des marqueurs tumoraux

L'immunohistochimie

La technique d'immunohistochimie

L'immunohistochimie est une méthode permettant de détecter des antigènes dans des sections de tissu (Pena *et al.*, 2014). Les prélèvements sont exposés à des anticorps marqués dirigés contre des épitopes de l'antigène cible (Figure 10). Il est possible de visualiser directement le marquage à l'aide d'un marqueur comme un colorant fluorescent, une enzyme, ou un traceur radioactif (technique directe). Il est également possible de visualiser indirectement le marquage à l'aide d'un anticorps secondaire possédant le marqueur et dirigé contre l'anticorps utilisé initialement (technique indirecte).

Figure 10 : Schéma représentant les techniques d'immunohistochimie directe et indirecte.



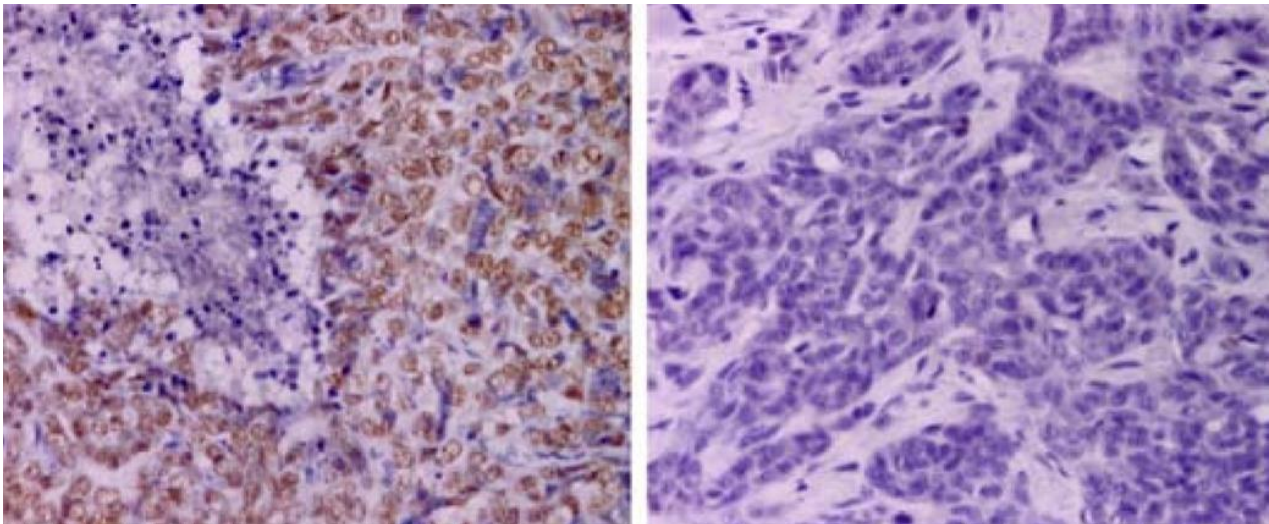
La quantité d'ARNm d'un gène ne correspond pas toujours au niveau d'expression de la protéine qu'il code. Le niveau d'expression d'une protéine ne dépend pas seulement du taux de transcription et de traduction de l'ARNm mais aussi de la vitesse de sa dégradation et de son transport. L'immunohistochimie a pour avantage d'identifier le niveau d'expression protéique et la localisation cellulaire des protéines recherchées contrairement à l'évaluation de la quantité d'ARNm.

L'immunohistochimie est utilisée en routine lors de la prise en charge de cancers du sein chez l'Homme à des fins diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques. Le marquage immunohistochimique de marqueurs tumoraux n'est pas réellement utilisé en médecine vétérinaire. Un nombre croissant d'études sur les marqueurs tumoraux et sur la recherche d'un lien entre diagnostic et pronostic ont cependant vu le jour depuis une quinzaine d'années en médecine vétérinaire.

Il existe deux catégories de tests immunohistochimiques. Les tests de classe I ont pour objectif d'identifier des marqueurs de la différenciation cellulaire comme les marqueurs des cellules épithéliales (pan-kératine), mésenchymateuses (vimentine) et myoépithéliales (p63 et calponine). Les tests de classe II ont quant à eux une valeur prédictive et pronostique. Ils suivent des lignes directrices plus strictes. On les utilise par exemple pour l'évaluation de l'expression de HER2 et des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone. On interprète les tests grâce à l'évaluation de l'intensité de l'immunomarquage et au pourcentage des cellules marquées (Pena *et al.*, 2014). La Figure 11 présente des coupes histologiques de glandes mammaires marquées par immunohistochimie.

Figure 11 : Coupes histologiques de carcinomes mammaires de chiennes marquées par immunohistochimie (Gama *et al.*, 2008).

Marquage p63 positif à gauche (coloration brune) et négatif à droite (absence de coloration brune).



Vers une standardisation de l'immunohistochimie à des fins diagnostiques

Au vu du nombre croissant d'expériences de marquage immunohistochimique des tumeurs mammaires canines, Peña *et al.*, en 2014, ont proposé de standardiser les méthodes. L'objectif est d'avoir une meilleure reproductibilité des manipulations, de pouvoir comparer plus aisément les études et d'interpréter plus facilement les résultats. Ils se sont basés autant que faire se peut sur les critères d'interprétation utilisés en médecine humaine.

Diagnostiquer une surexpression de HER2 en utilisant le *HercepTest*

L'immunohistochimie est utilisée en première intention pour diagnostiquer le statut HER2 de la tumeur du sein chez l'Homme. Des études ont confirmé la présence d'une réactivité croisée entre l'anticorps anti-HER2 humain et la protéine HER2 canine (Rungsipat *et al.*, 1999, De las Mulas *et al.*, 2003, Hsu *et al.*, 2009). Le test peut donc être utilisé en médecine vétérinaire.

Comme nous l'avons écrit précédemment, certaines tumeurs mammaires surexpriment le récepteur HER2. Quinze à 30% des tumeurs du sein chez l'Homme surexpriment HER2, parmi lesquelles 85 à 90% portent une amplification du gène *HER2*. Il existe une grande variabilité des résultats chez le Chien où le taux de tumeurs malignes surexprimant HER2 est compris entre 17,6 et 48% (Gama *et al.*, 2008, De las Mulas *et al.*, 2003, Rungsipat *et al.*, 1999, Sassi *et al.*, 2010, Dutra *et al.*, 2004, Im *et al.*, 2013, Ressel *et al.*, 2013, Hsu *et al.*, 2009).

Selon Peña *et al.*, 2014, la variabilité des chiffres et des interprétations est due aux différents protocoles expérimentaux et systèmes d'évaluation utilisés en immunohistochimie. Chez l'Homme, les protocoles sont obligatoirement standardisés. L'évaluation immunohistochimique du statut HER2 chez l'Homme est très standardisée, en particulier par l'utilisation du *HercepTest* (DAKO, Glostrup, Danemark).

Effectuons un aparté sur le *HercepTest*. Il s'agit de la première méthode d'immunohistochimie approuvée par l'*US Food and Drug Administration (FDA)* (Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux). L'objectif du *HercepTest* est de mesurer l'expression tumorale de HER2. Il a été accepté au niveau international. De nouvelles recommandations internationales comprenant quelques modifications ont été formulées en 2014. Ces modifications portent sur la phase pré-analytique (type de prélèvement, de fixateur, procédé de fixation et de préparation des tissus, lames blanches), analytique (introduction de techniques d'hybridation *in situ* non-fluorescente) et post-analytique (modification des seuils de positivité à 10% contre 30% auparavant, la définition du score 2+) (Wolff *et al.*, 2014). Les résultats de l'immunohistochimie identifient trois scores de HER2, notés 0, 1+, 2+ et 3+ :

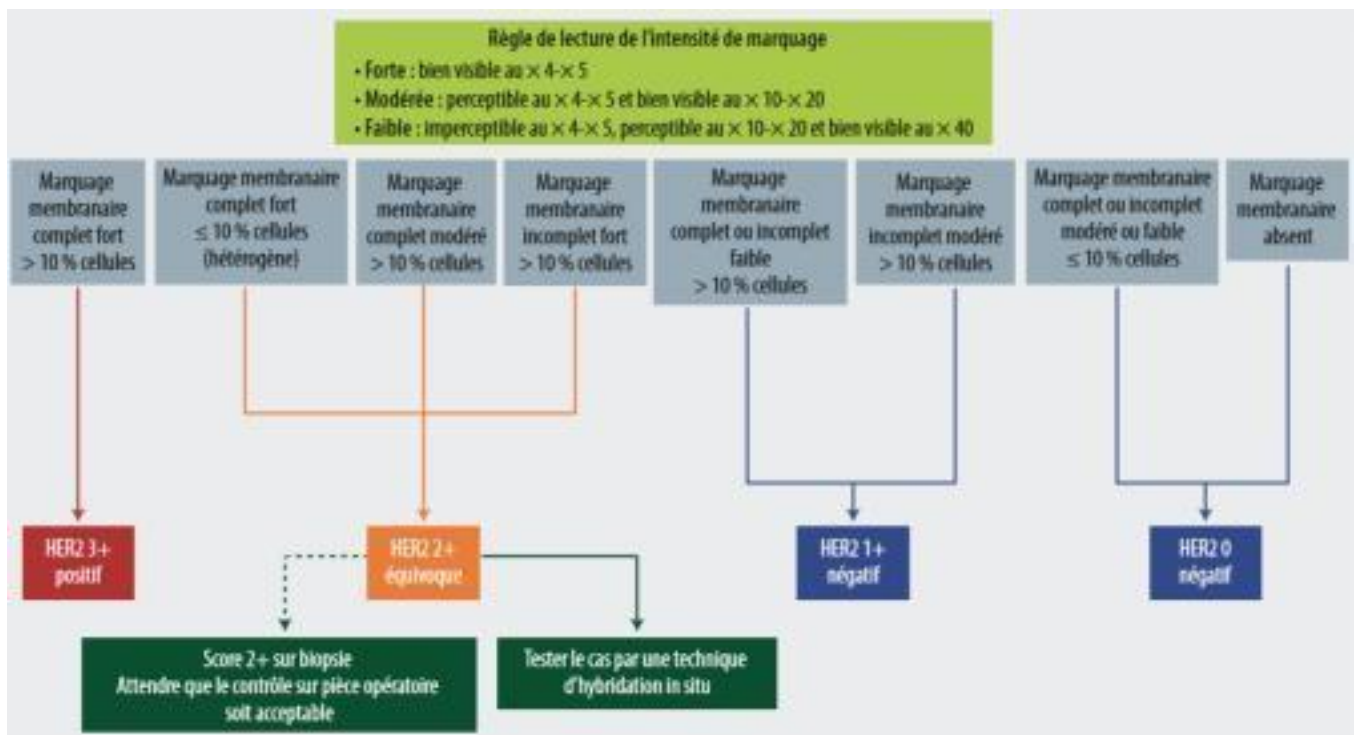
- Score 0 et 1+ : absence de cellule marquée ou moins de 10% de cellules marquées avec un marquage d'intensité faible et incomplet
- Score 2+ : au moins 10% des cellules marquées avec une intensité modérée et un marquage complet
- Score 3+ : plus de 10% des cellules marquées présentant une intensité du marquage forte et un marquage complet

Seules les tumeurs notées 3+ sont considérées comme réellement positives chez la femme.

Les scores 2+ sont aussi nommés « cas équivoques » et comprennent également le cas des tumeurs présentant un marquage hétérogène des cellules (Penault-Llorca, 2015).

La méthode d'interprétation des scores est résumée Figure 12.

Figure 12 : Interprétation et scores de la surexpression de la protéine HER2 déterminée par immunohistochimie (d'après Penault-Llorca, 2015).



D'autres informations sont notées dans le guide des recommandations internationales (Wolff *et al.*, 2014). Les prélèvements doivent être fixés dans du formol neutre tamponné à 10% pendant un temps de fixation de 6 à 72 heures. Le test ne doit être effectué qu'en cas de carcinome invasif. Les critères d'interprétation sont également standardisés. Une tumeur doit être considérée comme positive pour la surexpression de HER2 seulement si plus de 10% des cellules montrent un marquage uniforme et intense de la périphérie de la membrane plasmique. Si un marquage cytoplasmique masque le marquage de la membrane plasmique, le test doit être répété. Les critères d'exclusion sont l'utilisation d'un fixateur autre que celui cité précédemment, un temps de fixation différent, un fort marquage membranaire sur des acini mammaires ou des canaux lobulaires et un résultat inattendu sur les témoins. Des échantillons témoins commercialisés sont disponibles et permettent de valider le protocole. Ces échantillons contiennent 4 échantillons de cellules de tumeurs du sein respectivement notés 0, 1+, 2+, et 3+.

À ce jour, la plupart des études sur les tumeurs mammaires canines n'ont pas exactement suivi ces principes. En effet, plusieurs études ont respecté le système de notation du *HerceptTest* mais les tumeurs notées 2+ et 3+ ont été considérées comme positives sans autre test de vérification (De las Mulas *et al.*, 2003; Dutra *et al.*, 2004; Gama *et al.*, 2008; Hsu *et al.*, 2009; Im *et al.*, 2013; Ressel *et al.*, 2013; Sassi *et al.*, 2010). Afin de standardiser le niveau d'expression de HER2 par immunohistochimie, Peña et collaborateurs ont recommandé de se conformer à la méthode d'analyse et d'interprétation des résultats approuvée chez la femme au niveau international (Wolff *et al.*, 2014).

Une récente étude a révélé qu'il existe des tumeurs du sein HER2 positives qui possèdent un niveau d'expression hétérogène de HER2. Toute les cellules de la tumeur n'expriment pas HER2. Le taux de survie sans récurrence de ces femmes était plus faible que celui des femmes dont la surexpression de HER2 était homogène. Cela suggère que l'instabilité génétique, et par conséquent l'amplification aberrante de clones cellulaires *HER2* positifs dans de telles tumeurs peut être associée à une progression accélérée du cancer du sein.

dans de telles tumeurs peut être associée à une progression accélérée du cancer du sein. Le risque pour de telles tumeurs est d'obtenir un résultat faussement négatif pour HER2 (Seol *et al.*, 2012). C'est la raison pour laquelle il est préférable de tester l'entière tumeur d'exérèse pour ne pas identifier de faux négatifs.

Diagnostiquer l'expression des récepteurs hormonaux par immunohistochimie

Un marquage nucléaire en immunohistochimie pour les récepteurs ER et PR est uniquement observé dans le noyau de cellules épithéliales tumorales et normales, et non dans le noyau des cellules myoépithéliales, cartilagineuses, fusiformes et osseuses dans les tumeurs mixtes et complexes. Le marquage peut être très différent d'une tumeur à l'autre et au sein d'une même tumeur (De Las Mulas *et al.*, 2005).

Concernant le cancer du sein chez la femme, le seuil de positivité immunohistochimique des récepteurs hormonaux est le pourcentage de récepteurs hormonaux (ER et PR) qui assure l'efficacité du traitement hormonal. Cette valeur a été récemment standardisée à 1%, valeur seuil à partir de laquelle des patientes peuvent répondre à une thérapie hormonale (Hammond *et al.*, 2010). La valeur seuil n'a pas été établie chez la chienne à ce jour et chaque étude propose sa propre méthode d'évaluation inspirée de méthodes utilisées en médecine humaine.

Le temps est venu de standardiser les techniques de détection et d'évaluation des récepteurs hormonaux par immunohistochimie chez le Chien. La méthode de comptage total d'Allred (Allred *et al.*, 1998) est recommandée en médecine vétérinaire (Pena *et al.*, 2014). Il s'agit d'additionner la note donnant le pourcentage de cellules marquées positivement (note sur 5) et celle qui quantifie l'intensité du marquage (note sur 3). Le score total est une note sur 8. Un résultat sera positif si la note totale est supérieure ou égale à 3 sur 8. Un des inconvénients de cette méthode est que tous les récepteurs ER détectés par immunohistochimie ne sont pas fonctionnels. Une anomalie dans la production du récepteur peut intervenir au niveau transcriptionnel, traductionnel et/ou post-traductionnel. Une des méthodes pour évaluer la fonctionnalité de ER est d'évaluer le niveau d'expression de PR. En effet, la synthèse de PR dépend de la présence d'œstradiol et du fonctionnement normal du récepteur ER (De Las Mulas *et al.*, 2005). Un autre récepteur à œstrogènes nommé ER- β peut perturber les résultats ; une de ses fonctions est en effet d'activer l'expression du récepteur PR par l'intermédiaire de l'œstradiol.

Le seuil de positivité pour les récepteurs hormonaux chez la chienne est difficile à établir car il n'est pas basé sur des essais de traitement hormonaux.



Le moindre coût, la rapidité, l'observation directe de l'expression des récepteurs et la possibilité d'éliminer de visu l'expression des récepteurs des tissus sains environnants sont autant d'avantages à l'utilisation de l'immunohistochimie.



La variabilité des résultats peut s'expliquer par un recueil différent des données et du suivi cliniques, l'utilisation d'anticorps monoclonaux et des protocoles différents, et par des systèmes d'évaluation différents. Les faux négatifs obtenus par immunohistochimie résultent de l'une des causes suivantes : une fixation trop faible, des témoins positifs ou négatifs dont les résultats sont inexacts ou une absence de témoins positifs et négatifs (Hammond *et al.*, 2010).

Diagnostiquer la présence de cellules myoépithéliales par immunohistochimie

Plusieurs marqueurs des cellules myoépithéliales sont disponibles. Leur intensité d'expression est variable en fonction du type de tissu marqué (matrice extracellulaire, myofibroblaste, *etc.*). Le Tableau 4 résume quelques marqueurs utilisés pour la détection des cellules myoépithéliales par immunohistochimie.

Tableau 4 : Exemples de marqueurs utilisés pour identifier les cellules myoépithéliales des tumeurs mammaires chez la chienne en fonction de l'intensité du marquage et du type de tissu marqué (selon Pena et al., 2014).

Anticorps	Matrice extracellulaire	Myofibroblastes	Vaisseaux	Cellules de Tumeurs Epithéliales
Calponine	Fort	Faible à modéré	Fort	Rare
SMA	Fort	Modéré	Fort	Rare
P63	Fort	Négatif	Négatif	Rare
CD10	Fort	Modéré	Négatif	Fréquent
Kératines basales	Fort	Négatif	Négatif	Fréquent

En médecine humaine, on qualifie les tests de positifs lorsque plus de 10% des cellules sont marquées et que la localisation cellulaire de l'antigène est correcte. Les mêmes critères sont utilisés en médecine vétérinaire.

Certains marqueurs sont utilisés pour poser un diagnostic histologique définitif. En effet, un résultat positif pour la pan-kératine confirme la nature épithéliale d'une tumeur, et un résultat positif pour un des marqueurs myoépithéliaux confirme un diagnostic d'un myoépithéliome malin. Il faut cependant faire attention au choix du marqueur utilisé et à l'interprétation des résultats. Les cellules myoépithéliales néoplasiques peuvent perdre leurs caractéristiques de différenciation cellulaire. Il est donc plus prudent d'utiliser au moins deux marqueurs pour le diagnostic des cellules myoépithéliales. Les plus utilisés sont la protéine p63 et la calponine.

La protéine p63 partage une homologie avec la protéine p53 codée par le gène suppresseur de tumeur *Trp53* qui a une importante fonction dans la prolifération cellulaire, la différenciation, la sénescence et l'adhérence des cellules épithéliales stratifiées. La protéine p63 est également un marqueur spécifique des cellules myoépithéliales ; elle est usuellement associée à l'histogenèse de tumeurs mammaires canines complexes et mixtes. Chez la femme, la protéine p63 n'est pas seulement exprimée par les cellules myoépithéliales mais aussi par les cellules épithéliales des tumeurs du sein malignes (Gama et al., 2008).

Chez la chienne, la disparition de l'intégrité de la couche de cellules myoépithéliales ne permet pas de poser un diagnostic définitif de tumeur mammaire maligne car elle est observée dans les carcinomes *in situ* et invasifs. L'utilisation de p63 et de la calponine est recommandée pour asseoir l'existence d'une infiltration du stroma. Les carcinomes simples ne présentent pas de prolifération de cellules myoépithéliales.

Les cytokératines CK14 et CK5/6 sont des marqueurs des cellules myoépithéliales. Elles ont un poids moléculaire élevé et leur marquage est très utilisé en médecine humaine. Certaines études sur la tumeur du sein chez la femme montrent que l'expression des cytokératines est significativement associée à un mauvais pronostic (Pena *et al.*, 2014).

Confrontation des techniques de prélèvement : biopsie *versus* cytologie et sérum

L'objectif de l'étude de Campos *et al.* était de comparer la concentration sérique de la protéine HER2 avec le niveau d'expression tissulaire de HER2 chez des chiennes atteintes de tumeurs mammaires (Campos *et al.*, 2015). L'étude a porté sur 48 chiennes, 20 chiennes saines, 14 chiennes atteintes d'une tumeur mammaire non-métastasée, et 14 chiennes atteintes d'une tumeur mammaire métastasée à au moins un nœud lymphatique. Les tumeurs mammaires ont été retirées et analysées par immunohistochimie, afin de rechercher de l'expression de HER2. Les prélèvements 2+ et 3+ d'après le *HercepTest* ont été considérés comme positifs. La recherche de HER2 sérique a été effectuée par le biais d'un test ELISA à l'aide d'un anticorps contre des fragments solubles de HER2 tels que p185^{HER2}. Des contrôles positifs et négatifs des tests ont été utilisés. Les résultats n'ont pas montré de différence significative des niveaux sériques du récepteur HER2 entre les trois groupes ($P>0,05$). Aucune association significative n'a été notée entre l'augmentation de HER2 sérique et la présence d'une tumeur mammaire (avec ou sans métastase), en revanche une association significative a été observée entre l'immunomarquage sur la coupe histologique et le niveau sérique d'HER2. Enfin, les résultats ne révèlent pas d'association entre la présence d'une métastase régionale et la surexpression de HER2 dans le tissu, détectée par immunohistochimie, ou dans la circulation sanguine.



Les résultats de cette étude indiquent qu'on ne peut pas utiliser la concentration sérique du récepteur HER2 comme un marqueur tumoral en clinique. La concentration sérique en HER2 n'est pas significativement associée à la présence d'une tumeur mammaire de la chienne ou d'une métastase.

Komatsu *et al.* ont cherché à savoir s'il est possible de mesurer le niveau d'expression des gènes codant les récepteurs HER2, ER et PR après une cytoponction à l'aiguille, et de comparer les niveaux obtenus à ceux évalués sur des coupes histologiques par PCR (Komatsu *et al.*, 2012). L'étude a porté sur 56 prélèvements de tumeurs mammaires canines, 28 tumeurs bénignes et 28 tumeurs malignes. L'analyse cytologique a porté sur 31 prélèvements provenant de 21 tumeurs mammaires bénignes et 10 tumeurs mammaires malignes. Une corrélation significative a été observée entre le niveau d'expression des gènes codant les récepteurs ER et PR au sein des prélèvements cytologiques et histologiques du même animal ($P<0,01$). En effet, une corrélation a été observée pour 74,2% des prélèvements cytologiques avec la classification histologique.



Les récepteurs ER et PR sont des marqueurs tumoraux que l'on peut mesurer après une cytoponction. Il faut savoir qu'une quantification facile de marqueurs tumoraux, qui ne nécessite pas d'anesthésie, par cytoponction, est un outil diagnostique et pronostique utile, et cela même si la corrélation à la classification histologique n'est pas parfaite.



Vers la possibilité d'une classification des profils immunohistochimiques des tumeurs mammaires canines

Les tumeurs ER et PR positives chez la chienne

La détection des récepteurs hormonaux dans les tumeurs mammaires canines par immunohistochimie a débuté à la fin des années 1990 (Gerald *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2000). Nous avons choisi quatre études pilotes qui ont établi une association entre les récepteurs hormonaux et des éléments anatomopathologiques et pronostiques chez la chienne (Chang *et al.*, 2009; De Las Mulas *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2014; Nieto *et al.*, 2000). Les résultats des études ne sont pas tous concordants.

- ➔ les tumeurs mammaires bénignes de la chienne ont plus fréquemment un statut ER⁺ et/ou PR⁺. La majorité des tumeurs bénignes sont ER⁺/PR⁺. Parmi les tumeurs malignes, le statut ER⁺ et/ou PR⁺ est un indicateur d'un meilleur pronostic que celui des tumeurs ER⁻ et/ou PR⁻. Une tumeur mammaire PR⁺ est associée à un taux de survie globale supérieur à 1 an. Une tumeur mammaire ER⁺ est associée à une survie globale et une survie sans récurrence plus élevées, et à une moindre malignité que les tumeurs ER⁻.
- ➔ Les récepteurs ER et PR semblent être de bons facteurs pronostiques chez la chienne.

Les tumeurs HER2 positives chez la chienne

Depuis la publication initiale de Slamon *et al.*, 1987, qui a montré une association entre l'amplification du gène *HER2* et un mauvais pronostic du cancer du sein, de nombreuses études ont été faites. Nous avons rapporté que le récepteur HER2 est surexprimé dans les tumeurs mammaires de la chienne (*cf.* 2.2.7). Des études ont cherché à établir un lien entre l'expression d'HER2 et d'éventuels facteurs pronostiques chez le Chien. Ahern et collaborateurs ont été parmi les premiers à associer de façon significative la surexpression d'*HER2* et la malignité des tumeurs mammaires canines (Ahern *et al.*, 1996).

En 2004, une étude a recherché une association entre l'expression de HER2 et certains aspects morphologiques des cellules comme le pléomorphisme nucléaire, le taux mitotique et le grade histologique dans 70 tumeurs mammaires canines (Dutra *et al.*, 2004). Les tumeurs mammaires ayant un score de 2+ ou 3+ au *HercepTest* étaient considérées comme positives pour HER2. Parmi les tumeurs classées 2+ et 3+, 38% étaient de grade histologique I ou II, et 23% de grade histologique III. En ce qui concerne le pléomorphisme nucléaire, 6% étaient de grade 1, 56% de grade 2 et 38% de grade 3. En ce qui concerne le taux mitotique, 41% étaient de grade 1, 24% de grade 2 et 35% de grade 3. Une association significative entre l'expression de HER2 (2+ et 3+) et le grade histologique élevé ($P < 0,05$) a été observée. L'expression de HER2 était associée à la fois au pléomorphisme nucléaire et à un taux élevé des mitoses ($P < 0,05$). Aucune association significative n'existait entre la surexpression de HER2 et la survie globale et sans récurrence. Ces résultats suggèrent que la surexpression de HER2 est associée à une prolifération cellulaire élevée chez le Chien. Ainsi une corrélation positive a pu être mise en évidence entre la surexpression de HER2 et la morphologie histologique des tumeurs mammaires canines. D'autres études ont conduit à des conclusions identiques (Tsuda *et al.*, 1990 chez la femme, et Ressel *et al.*, 2013 chez la chienne).

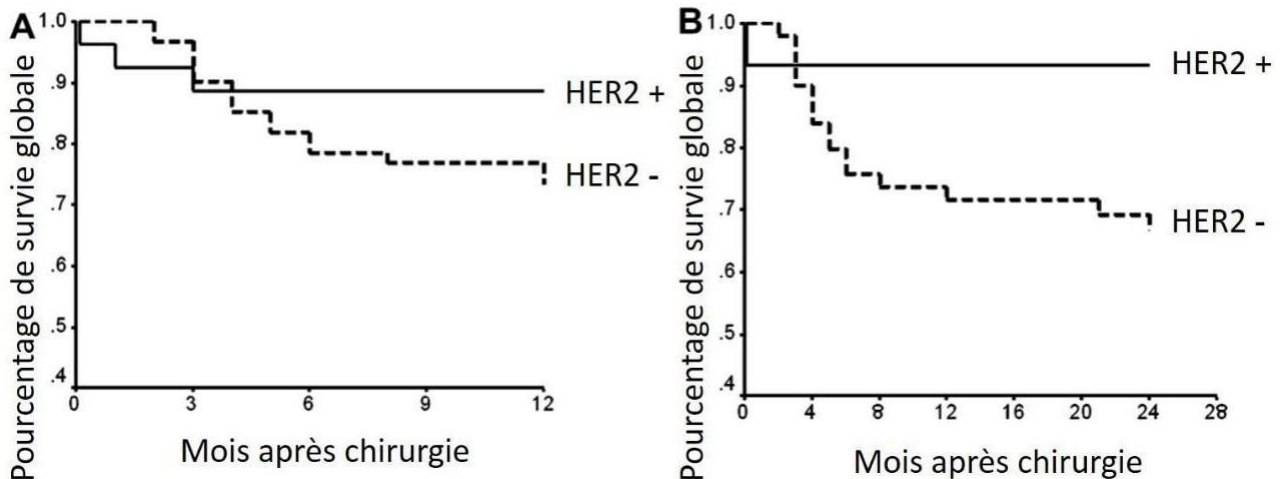


HER2 est un facteur pronostique négatif. Les résultats de ce travail renforcent l'hypothèse selon laquelle les tumeurs spontanées canines peuvent être utilisées comme modèle de la carcinogénèse du sein.

Une étude rétrospective sur 91 tumeurs mammaires malignes de la chienne a cherché à établir un lien entre la surexpression de HER2 et le pronostic (Hsu *et al.*, 2009). Les tumeurs mammaires notées 2+ ou 3+ au *HercepTest* étaient considérées comme positives pour HER2. Dans cette étude, 29,7% (27/91) des tumeurs étaient positives pour HER2. La surexpression de HER2 n'était pas associée à la taille de ces tumeurs, au type histologique, à la mortalité, et à la présence de métastases loco-régionales ou à distance du site tumoral ($P > 0,05$). Les tumeurs des chiennes ovariectomisées avant l'exérèse de la chaîne mammaire présentaient une association plus importante avec le statut HER2⁺ qu'avec statut HER2⁻.

Les courbes de survie globale à 1 an et 2 ans après exérèse sont présentées Figure 13. Les auteurs concluent une meilleure survie globale chez les chiennes HER2⁺ que chez les chiennes HER2⁻. Cependant, les différences ne sont pas significatives ($P>0,05$). L'interprétation des auteurs est donc étonnante. Ce travail ne confirme pas l'hypothèse selon laquelle les chiennes HER2⁺ ont une survie globale et sans récurrence meilleure que les chiennes HER2⁻.

Figure 13 : Courbes de survie globale 1 an après exérèse chez 89 chiennes (A) et 2 ans après chirurgie chez 66 chiennes (B) en fonction de leur statut HER2 (Hsu *et al.*, 2009).



Aucune expression de HER2 n'a été observée sur les 8 échantillons témoins, des tumeurs bénignes ou des tissus mammaires sains. Les auteurs ne sont pas tous d'accord sur la possibilité qu'il existe des tumeurs bénignes surexprimant HER2. En effet, certaines études rapportent que des tumeurs bénignes surexpriment HER2. Rungsipat et collaborateurs ont montré qu'environ 50% (16/32) des tumeurs bénignes expriment HER2 (Rungsipat *et al.*, 1999), tandis que Ressel et collaborateurs ont rapporté que ce pourcentage n'est que de 27,2% (3/11) (Ressel *et al.*, 2013). Le petit nombre des tumeurs étudiées par ces deux équipes peut expliquer ces pourcentages différents. Un autre doute persiste quant au taux de survie. Toutes les études n'ont pas trouvé une association significative entre la surexpression de HER2 chez la chienne et une baisse de la survie globale et sans récurrence (De las Mulas *et al.*, 2003; Dutra *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2009). L'étude des profils immunohistochimiques ci-après complète l'étude des survies globales des chiennes de profil HER2.



Chez la chienne, les récepteurs ER, PR et HER2 semblent être des facteurs pronostiques similaires à ce qui a été décrit chez la femme. Nous pouvons alors nous demander si la classification selon des profils immunohistochimiques est réalisable chez la chienne et si les pronostics associés à ces profils chez la femme sont transférables chez la chienne.

Les différents profils immunohistochimiques chez la chienne

La classification utilisée chez la femme peut-elle être adaptée à la chienne ?

Gama et collaborateurs ont été les premiers à chercher à classer des carcinomes mammaires canins (n=102) selon les profils immunohistochimiques utilisés chez l'Homme et à établir un lien entre profil et pronostic. Ils ont utilisé les cinq marqueurs moléculaires suivants : ER, HER2, la kératine CK5, la protéine p63 et la P-cadhérine comme marqueurs des cellules basales et myoépithéliales (Gama *et al.*, 2008).

L'âge moyen des chiennes au moment de la chirurgie était de 9,7 ans plus ou moins 2,5 ans. Les données de suivi post-exérèse tumorale étaient disponibles pour 69 animaux. La médiane de survie globale a été de 15 mois (5-74 mois). Trente-cinq animaux sont morts naturellement ou ont été euthanasiés pendant la période de suivi à cause d'une résurgence de la tumeur ou de la présence de métastases. La classification histologique a été notée selon la méthode d'Elston et Ellis, 2002. Les échantillons témoins étaient du tissu mammaire normal adjacent pour les marqueurs des cellules basales et myoépithéliales (CK5, p63 et P-cadhérine), du tissu utérin canin pour le récepteur aux œstrogènes, et des échantillons validés de carcinome du sein HER2 positifs. Des échantillons non traités avec les anticorps primaires spécifiques ont été ajoutés, comme témoins négatifs. La positivité pour le récepteur ER a été considérée comme établie si plus de 10% des cellules exprimaient ce marqueur. Le *HerceptTest* a été utilisé pour asseoir l'expression de HER2. Les tumeurs notées 2+ et 3+ étaient considérées comme positives avec une valeur seuil de 10%. Les échantillons ont été considérés comme positifs pour la kératine CK5, la protéine p63 et la P-cadhérine si plus de 50% des cellules de l'échantillon étaient positives pour le marqueur considéré. Les échantillons où le tissu mammaire adjacent était négatif pour le récepteur aux œstrogènes ont été écartés de l'étude. Le marquage immunohistochimique était nucléaire pour le récepteur ER et la protéine p63, cytoplasmique pour la kératine CK5 et la P-cadhérine, et membranaire pour le récepteur HER2 et la protéine P-cadhérine. Les résultats de l'immunomarquage des échantillons et de la classification des tumeurs selon les profils immunohistochimiques utilisés en médecine humaine sont présentés Figure 14, Tableau 5 et Tableau 6.

Figure 14 : Coupes histologiques de carcinomes mammaires canins marqués par immunohistochimie ; a-d : marquage du récepteur ER, e-h : marquage du récepteur HER2, i-l : marquage de la kératine CK5, m-p : marquage de la protéine p63, q-t : marquage de la P-cadhérine. Chaque colonne représente un sous-type immunohistochimique distinct. De gauche à droite : luminal A, luminal B, *Basal-like*, et HER2 (Gama *et al.*, 2008).

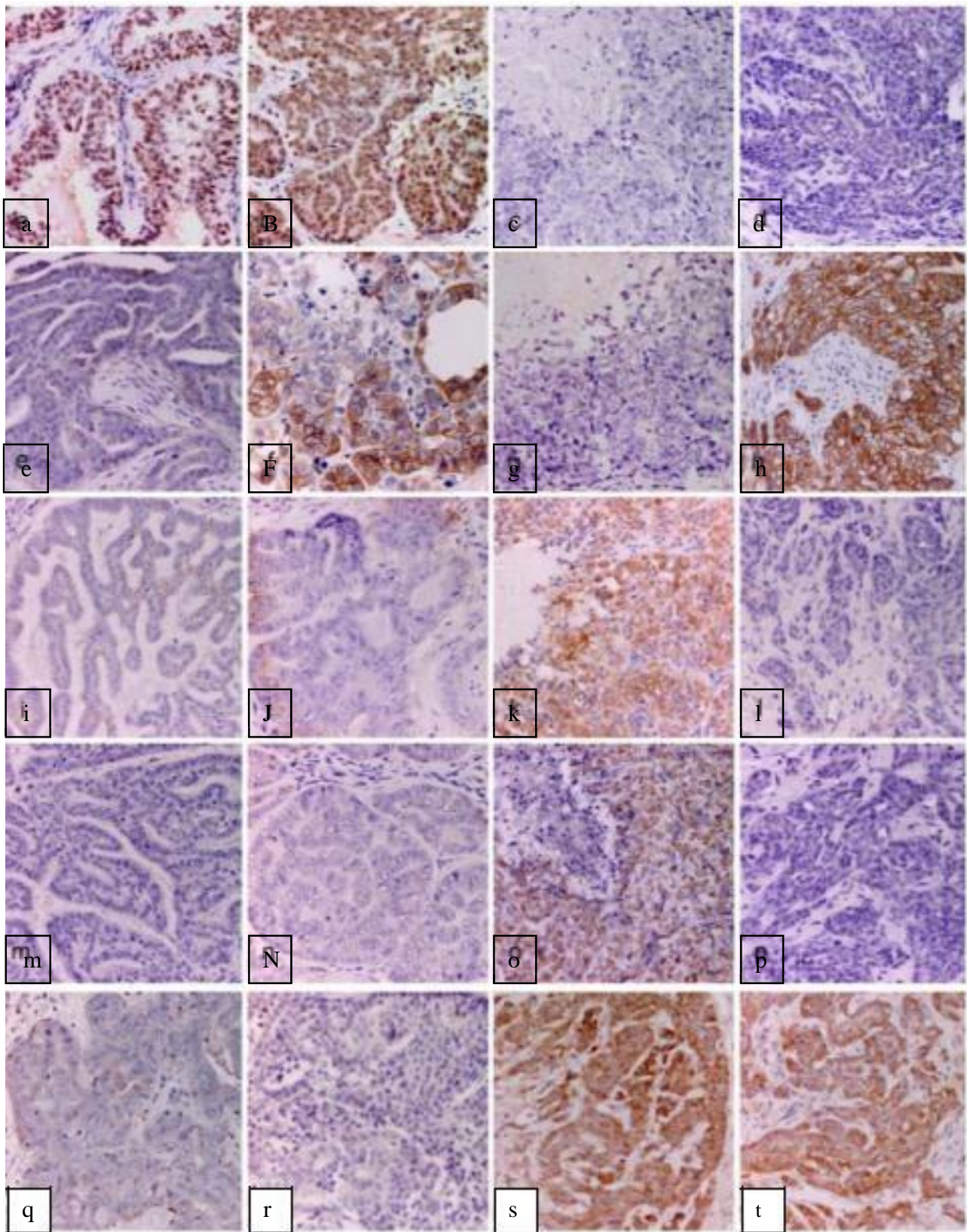


Tableau 5 : Résultats immunohistochimiques pour les marqueurs ER, HER2, CK5, P63, P-cadhérine (PCAD) de 100 carcinomes mammaires canins.

Les résultats pour le récepteur ER et la P-cadhérine étaient disponibles pour 96 échantillons et les résultats pour le récepteur HER2 étaient disponibles pour 100 échantillons (Gama *et al.*, 2008).

Marqueur moléculaire	Marquage positif	Marquage négatif
ER HE	56 (58,3%)	40 (41,7%)
R2 CK	21 (21%)	79 (79,0%)
5 P63	33 (32,4%)	69 (67,6%)
	33 (32,4%)	69 (67,6%)
PCAD	42 (42,8%)	54 (56,3%)

Tableau 6 : Répartition des carcinomes mammaires canins dans les sous-types moléculaires en fonction des marqueurs moléculaires (n=96) (Gama *et al.*, 2008).

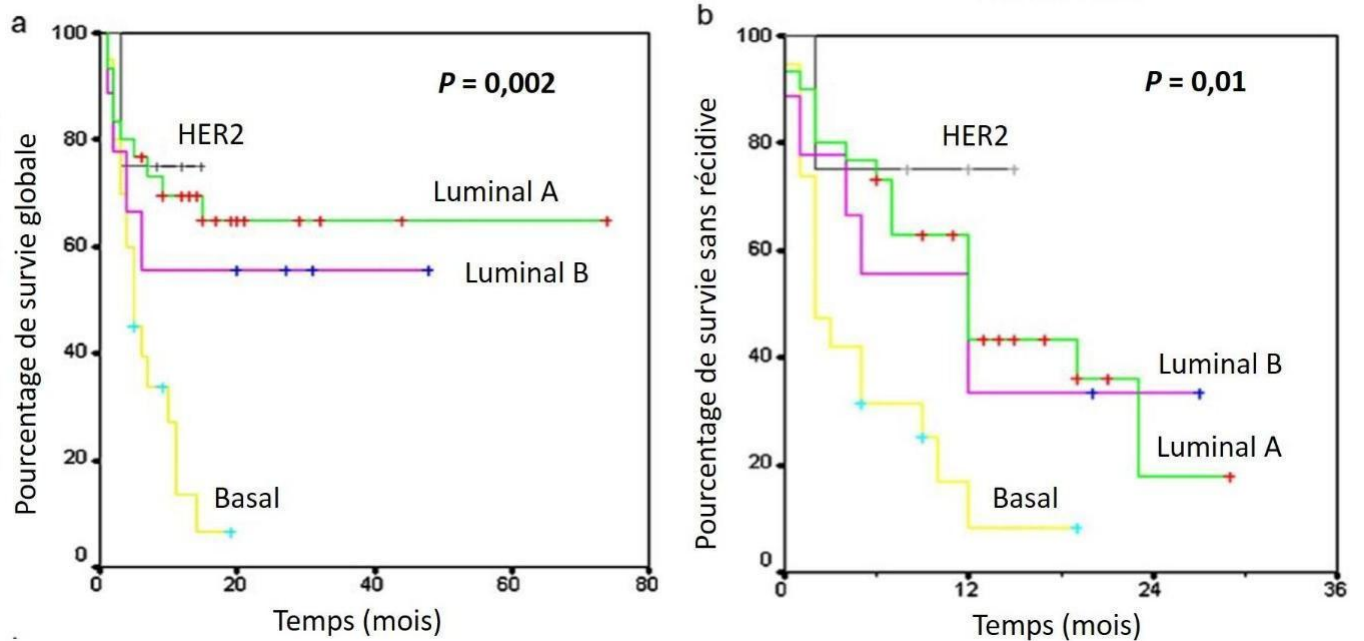
Sous-type ER HER2 PCAD ± p63 ± CK5 Nombre

				(pourcentage)
Luminal A	Positif	Négatif	Positif / Négatif	43 (44,8%)
Luminal B	Positif	Positif	Positif / Négatif	13 (13,5%)
Basal HER	Négatif	Négatif	Positif	28 (29,2%)
2	Négatif	Positif	Positif / Négatif	8 (8,3%)
Triple-négatif	Négatif	Négatif	Négatif	4 (4,2%)

Dans cette étude, 58,3% des carcinomes mammaires étaient positifs pour ER, 21% pour HER2 (2+ et 3+), 32,4% pour CK5 et p63, et 42,8% pour P-cadhérine. Les caractéristiques de positivité et de négativité des sous-types de la classification sont rappelées dans le Tableau 6. La répartition des carcinomes mammaires en profils immunohistochimiques est la suivante : 58,3% des tumeurs avaient un profil luminal dont trois quarts de luminal A et un quart de luminal B, 29,2% des tumeurs avaient un profil *basal-like*, 8,3% un profil HER2 et 4,2% des tumeurs étaient négatives pour les marqueurs testés.

Des différences significatives ont été observées concernant les paramètres anatomopathologiques des 4 groupes (luminal A, luminal B, HER2 et *basal-like*). Les profils HER2 et *basal-like* étaient associés aux types histologiques de carcinomes simples ou carcinosarcomes alors que la plupart des carcinomes complexes appartenaient au profil luminal A ($P < 0,0001$). Le profil *basal-like* était associé avec un stade histologique plus sévère représentant 55,6% des grades III ($P < 0,0001$). Le profil *basal-like* était également significativement associé à la présence d'une invasion vasculaire ($P < 0,0001$). L'expression des marqueurs basaux différait selon le profil immunohistochimique. Les profils *basal-like* et HER2 exprimaient avec une fréquence plus élevée les marqueurs basaux, la protéine p63 et la P-cadhérine (respectivement $P < 0,0001$ et $P = 0,001$). La kératine CK5 était plus fréquemment exprimée par les tumeurs ayant un profil *basal-like* ($P = 0,001$). Au contraire, le profil luminal était associé à une expression plus faible voire nulle des marqueurs basaux. L'index mitotique et le marqueur de prolifération Ki-67 étaient moins fréquemment présents sur les tumeurs de profil luminal A que sur les tumeurs ayant un autre profil ($P = 0,001$ et $P < 0,0001$ respectivement). Le profil *basal-like* était associé aux index mitotiques et aux fréquences du marqueur Ki-67 les plus élevés. Les courbes de survie globale et sans récurrence en fonction du temps et des différents sous-groupes sont présentées sur la Figure 15. Les taux de survie globale et de survie sans récurrence étaient plus faibles pour le profil *basal-like* ($P = 0,002$ et $P = 0,01$) que pour les autres profils y compris le profil HER2.

Figure 15 : Courbe de survie globale (a) et de survie sans récurrence (b) selon les différents sous-types moléculaires des carcinomes mammaires canins (Gama *et al.*, 2008).



- ➔ Gama et collaborateurs ont identifié des profils immunohistochimiques dans une série de carcinomes mammaires canins en se basant sur l'expression de cinq marqueurs (les récepteurs ER et HER2, la kératine CK5, la protéine p63 et la P-cadhérine). Dans cette étude, 44,8% des tumeurs avaient un profil luminal A, 13,5% un profil luminal B, 29,2% un profil *basal-like*, et 8,3% un profil HER2.
- ➔ Le profil luminal A est le plus souvent associé à une absence d'expression des marqueurs basaux, à des carcinomes complexes, un faible grade histologique et à des tumeurs présentant un faible pouvoir invasif et une progression limitée. Les profils *basal-like* et HER2 sont quant à eux associés à une expression des marqueurs basaux, des carcinomes simples et carcinosarcomes, un grade histologique élevé, une invasion lymphovasculaire et un fort taux de prolifération. Le profil *basal-like* est ainsi associé à un profil clinique agressif avec un faible taux de survie sans récurrence.
- ➔ Ces informations sont en accord avec les données collectées sur les profils immunohistochimiques du cancer du sein chez la femme.

Deux ans plus tard, Sassi et collaborateurs ont complété ce travail et recherché les récepteurs ER, PR, HER2 ainsi que les kératines CK5/6 et CK14 pour les marqueurs basaux sur 45 carcinomes mammaires canins (Sassi *et al.*, 2010). Seuls trois profils ont été trouvés : 29% des carcinomes étaient luminal A, 49% luminal B et 22% *basal-like*. Les résultats de l'étude semblent contredire ceux de l'étude précédente. En effet, dans cette étude, il n'y avait aucune association significative entre le type de profil et le degré d'invasion, le type histologique, et le taux de survie. Un pourcentage plus élevé de profil luminal A a été observé parmi les tumeurs de grade I (50%) et de type luminal B pour les tumeurs de grades II (63%) et III (77%). Cette association entre les profils et les grades n'était pas significative dans l'étude précédente.



Les différences observées dans ces deux études peuvent s'expliquer par une différence d'échantillonnage, par un manque de puissance statistique dans la seconde étude (Sassi *et al.*, 2010), par une utilisation de marqueurs basaux différents et par l'utilisation d'un seuil de positivité pour les marqueurs basaux très bas dans la seconde étude (la positivité était validée lorsque plus de 1% des cellules étaient marquées contrairement à la première étude qui considérait l'échantillon comme positif lorsque plus de 50% des cellules étaient marquées (Gama *et al.*, 2008)). La fréquence du profil *basal-like* peut ainsi artificiellement être surestimée par la présence de faux positifs. De plus, les recommandations sont claires : il est préférable d'utiliser la protéine p63 comme marqueur des cellules basales plutôt que la kératine CK14. La première étude (Gama *et al.*, 2008) semble donc plus fiable que la seconde (Sassi *et al.*, 2010).

Im *et al.*, 2013 ont cherché à savoir si les profils luminal A, luminal B, HER2, *basal-like* et triple-négatif sont présents avec des fréquences comparables dans toutes les races de chiens. Ils ont utilisé 292 prélèvements de carcinomes mammaires canins appartenant aux races suivantes : bichon Maltais, yorkshire, caniche, Shih-Tzu et chiens croisés. Aucune association significative n'est observée entre les profils et les races. Seules les chiennes de la race Shih-Tzu avaient plus fréquemment des tumeurs de grade III avec une invasion lymphatique. Les chiennes Shih-Tzu présentent un pronostic clinique plus défavorable que les autres races étudiées sans qu'il soit rattaché à un des profils en particulier.

Les profils triple-négatif et *basal-like* existent-ils réellement chez la chienne ?

Kim *et al.*, 2013 ont cherché à savoir si les profils *basal-like* et triple-négatif observés chez la femme existent chez la chienne. Ils ont utilisé une série de 241 carcinomes mammaires canins et les récepteurs ER, PR, HER2, EGFR, les kératines CK14 et CK5/6, et la protéine p63 qu'ils ont détectés par immunohistochimie. Le second objectif était d'associer à chaque marqueur une éventuelle valeur pronostique. Les seuils de positivité étaient de 10% des cellules marquées pour les récepteurs ER, PR et HER2, 5% pour les kératines CK14 et CK5/6, la protéine p63 et le récepteur EGFR. La classification histologique a été effectuée selon la méthode d'Elston et Ellis, 2002.

Au total, parmi les carcinomes mammaires analysés 18,7% (45/241) de tumeurs étaient triple-négatives. Les caractéristiques anatomopathologiques ont été étudiées. Une association significative a été observée entre le profil triple-négatif et le type tumoral spécial, le grade III, la présence d'un centre de nécrose au sein de la tumeur, la présence d'une infiltration lymphatique et un fort taux mitotique ($P < 0,005$). Une association significative a été observée entre les tumeurs non-triple-négatives et le type de tumeur mixte, le grade I, l'absence de centre de nécrose tumoral, l'absence d'invasion lymphatique, et un taux mitotique bas. Les tumeurs triple-négatives présentaient des caractéristiques anatomopathologiques et un pronostic plus sévères que les tumeurs non-triple-négatives ($P < 0,005$).

Au total 91,1% (43/45) des tumeurs triple-négatives exprimaient au moins un des marqueurs basaux. Elles étaient donc de profil *basal-like*. Les autres tumeurs étaient *normal-like*, c'est-à-dire négatives pour tous les marqueurs testés y compris les marqueurs basaux. Cette différence entre les profils *basal-like* et triple-négatif n'avait pas été notée dans les deux études précédentes (Sassi *et al.*, 2010 ; Gama *et al.*, 2008). Dans cette étude, les carcinomes mammaires positifs pour la kératine CK5/6 étaient associés à un taux mitotique élevé, à la présence d'une invasion lymphatique et des paramètres anatomopathologiques défavorables. Il était plus difficile d'établir des associations pronostiques avec la kératine CK14 car cette protéine était exprimée dans quasiment toutes les tumeurs triple-négatives (91,1%). La kératine CK14 était plus fréquemment exprimée dans les tumeurs triple-négatives que la kératine CK5/6 (91,1% contre 46,6%, respectivement). L'expression de la protéine p63 dans les tumeurs triple-négatives n'était pas associée significativement avec les paramètres anatomopathologiques.

L'expression du récepteur EGFR était associée significativement avec le type spécial, le grade III, la présence de nécrose tumorale et la présence d'invasion lymphatique et des paramètres anatomopathologiques défavorables. Le récepteur EGFR pourrait être un bon marqueur pronostique. Dans cette étude, 75,6% (34/45) des tumeurs triple-négatives étaient positives pour au moins deux marqueurs basaux. Cela suggère que la plupart des carcinomes mammaires de profil triple-négatif chez la chienne expriment un profil *basal-like*. Considérant la variabilité d'expression des différents marqueurs basaux utilisés, il est difficile de sélectionner des marqueurs donnés pour identifier le profil *basal-like* chez la chienne.

En conclusion, cette étude montre que le profil triple-négatif peut être observé au sein des carcinomes mammaires canins et qu'il possède des caractéristiques pronostiques défavorables. Les données collectées n'ont pas permis de démontrer l'existence du profil *basal-like* en utilisant les marqueurs CK14, CK5/6, p63 et EGFR pour différencier des tumeurs plus agressives parmi les triple-négatives. D'autres études devront être réalisées afin d'approfondir ces pistes.



La différence des résultats entre les études peut s'expliquer par l'utilisation de différents marqueurs et critères de positivité pour déterminer le profil *basal-like* chez la chienne. Les critères discriminant les profils dans les tumeurs humaines ont été utilisés chez la chienne. Ce choix stratégique peut sembler contradictoire avec le fait que la prolifération myoépithéliale est rare chez la femme, contrairement à ce qui est observé chez la chienne. La prolifération myoépithéliale peut en effet influencer l'expression des marqueurs de cellules basales et entraver l'identification du profil *basal-like* (Sorenmo *et al.*, 2011). De nouvelles études devront être effectuées afin de mieux cerner le profil *basal-like* chez la chienne, en prenant en compte la prolifération myoépithéliale, possible dans les tumeurs canines.

4. Le traitement des tumeurs mammaires

Les tumeurs mammaires chez la chienne, comme les tumeurs du sein chez la femme, peuvent être distinguées selon leurs profils immunohistochimiques. Les marqueurs tumoraux utilisés pour établir ces profils peuvent-ils être utiles pour établir un plan thérapeutique ? La médecine humaine s'est penchée sur la recherche de thérapies adaptées à chaque sous-type tumoral en utilisant pour cible les marqueurs tumoraux précédemment cités. L'objectif est d'améliorer la survie globale et la survie sans récurrence des patientes.

La médecine vétérinaire a 10 à 20 ans de retard sur la médecine humaine pour ce qui concerne les avancées thérapeutiques contre le cancer. Principalement pour des raisons de coûts et d'éthique, la chimiothérapie est très peu choisie par les propriétaires. Il convient de préciser que 3 ans de survie chez le Chien équivalent à environ 12 ans chez l'Homme (Dutra *et al.*, 2004).

Nous rappellerons succinctement les traitements anticancéreux classiques utilisés en médecine vétérinaire. Nous développerons plus précisément les traitements de thérapie ciblée sur les marqueurs tumoraux précédemment décrits et utilisés en médecine humaine. Nous nous demanderons alors si ces traitements peuvent être utilisés chez le Chien.

Les traitements classiques chez le Chien : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie

La chirurgie

L'exérèse chirurgicale est le traitement le plus utilisé en médecine vétérinaire à l'heure actuelle contre les tumeurs mammaires chez le Chien. Elle est indispensable au diagnostic histologique de la tumeur et à l'établissement d'un pronostic. Il n'existe pas à l'heure actuelle de réel consensus international quant à la démarche à suivre (Doliger, 2003).

Plusieurs types d'exérèse peuvent être effectuées lors de tumeurs mammaires chez la Chienne :

- La nodulectomie : dissection et exérèse du nodule.
- La mammectomie locale : exérèse entière de la mamelle concernée par la tumeur.
- La mammectomie régionale (ou exérèse de la demi-chaine mammaire) : exérèse de la mamelle concernée par la tumeur, du nœud lymphatique la drainant et de toutes les mamelles drainées par ce nœud lymphatique.
- La mammectomie unilatérale complète (ou exérèse de la chaîne mammaire) : exérèse en bloc de la chaîne mammaire, du nœud lymphatique inguinal superficiel, et des nœuds lymphatiques axillaires s'ils sont hypertrophiés.
- La mammectomie bilatérale complète : exérèse en bloc des deux chaînes mammaires à un mois d'intervalle, des nœuds lymphatiques inguinaux et des nœuds lymphatiques axillaires s'ils sont hypertrophiés.

Le Tableau 7 présente les indications d'approche chirurgicale.

Tableau 7 : Technique chirurgicale conseillée en fonction de caractéristiques anatomo-pathologiques de la tumeur mammaire chez la chienne (Doliger, 2003).

<i>Chirurgie</i>	<i>Tumeur unique Di Ou multi centrique</i>	<i>mètre de la Tumeur</i>	<i>Adénopathie associée</i>
<i>Nodulectomie</i>	Unique	<0,5 cm	Non
<i>Mammectomie Locale</i>	Unique	<1 cm	Non
<i>Mammectomie Régionale</i>	Unique	1-2 cm	Oui ou Non
<i>Mammectomie Unilatérale Complète</i>	Multicentrique	>2 cm	Oui ou Non
<i>Mammectomie Bilatérale Complète</i>	Multicentrique Bilatérale	>2 cm	Oui ou non

Il est important de définir avec le propriétaire l'objectif de la chirurgie. L'objectif est-il de retirer la tumeur avec des marges saines ou de retirer la tumeur avec des marges saines et de prévenir l'apparition de nouvelles tumeurs mammaires ? Dans le second cas il est préférable d'effectuer une chirurgie plus invasive comme la mammectomie unilatérale complète même en cas de tumeur unique.

La radiothérapie

La radiothérapie est un traitement local réservé à des tumeurs présentant un risque important de récurrence locale. Elle est notamment utilisée lors de tumeurs mammaires très adhérentes au plan profond ou lors d'un diagnostic de sarcome ou carcinosarcome à fort pouvoir d'infiltration locale. Le traitement des tumeurs mammaires chez le Chien consiste en général en une radiothérapie externe (Cobalt 60 ou accélérateur de particules) à la dose de 3 grays 3 fois par semaine pendant 4 à 5 semaines, soit un total de 36 à 45 grays (Doliger, 2003; Sorenmo *et al.*, 2013).

La chimiothérapie

Lors de tumeurs mammaires avec embolies vasculaires intratumorales, de métastases ganglionnaires avérées, de tumeurs très indifférenciées (adénocarcinomes de grade III, carcinomes ou sarcomes indifférenciés), la chimiothérapie adjuvante est conseillée. Une chimiothérapie adjuvante est une chimiothérapie pratiquée en 2^{ème} intention après un traitement de 1^{ère} intention (chirurgie ou radiothérapie) pratiqué en vue de l'exérèse tumorale. L'objectif d'une chimiothérapie adjuvante est de diminuer le risque de récurrence et de formation de métastases en éliminant les cellules tumorales disséminées dans l'organisme. Il est très rare d'effectuer en médecine vétérinaire une chimiothérapie néo-adjuvante en cas de tumeur mammaire. Il s'agit d'une chimiothérapie de 1^{ère} intention thérapeutique dont l'objectif principal est la réduction de la taille de la tumeur avant chirurgie. La chirurgie d'exérèse est quasi-exclusivement pratiquée en 1^{ère} intention. Une chimiothérapie palliative peut être proposée lorsque des métastases pulmonaires ont été détectées.

Les molécules de choix sont la doxorubicine (AdriamycineTM) (25 à 30 mg/m², par voie intraveineuse stricte toutes les trois semaines, 4 à 6 cycles). La mitoxantrone (NovantroneTM) ou le 5-fluorouracile (5-FU) peuvent être utilisés lorsque la doxorubicine est contre-indiquée (elle présente une forte toxicité cardiaque et rénale) (Doliger, 2003).

Vers des traitements plus ciblés

L'existence de tumeurs exprimant des marqueurs tumoraux spécifiques permet l'utilisation de traitements ciblés contre les cellules tumorales exprimant ces marqueurs. L'objectif des thérapies ciblées est d'éliminer spécifiquement la cellule tumorale tout en causant le moins d'effets indésirables possibles. Des traitements anti-tumoraux dont les cibles sont les récepteurs hormonaux et plus récemment HER2 existent en médecine humaine. Nous avons vu que des profils immunohistochimiques différentiels existent chez la chienne, comme chez la femme. Nous nous demanderons si ces thérapies peuvent être utilisées en médecine vétérinaire.

L'hormonothérapie

En médecine vétérinaire

Selon une étude, 48% des chiennes présentant un carcinome mammaire meurent ou sont euthanasiées dans l'année qui suit la mammectomie (Graham *et al.*, 1999). La chirurgie ne semble donc pas toujours suffisante à la rémission des chiennes. En médecine humaine, nous venons de voir que l'hormonothérapie est souvent utilisée pour traiter les tumeurs positives pour les récepteurs hormonaux. Ces traitements peuvent-ils être utilisés en médecine vétérinaire ?

Traitement anti-ER : le tamoxifène

Le tamoxifène a un effet anti-œstrogénique sur la glande mammaire et pro-œstrogénique sur l'utérus de la chienne, comme chez la femme. Cette affinité est responsable chez la femme d'effets indésirables comme des endométrites et des hyperplasies de l'endomètre.

Ces lésions sont considérées comme pouvant accroître le risque de carcinome de l'endomètre. Les chiennes traitées au tamoxifène présentent des proliférations cellulaires de l'endomètre en accord avec le mode d'action du tamoxifène chez la femme. Le tamoxifène stimule la prolifération des cellules de l'endomètre. La stimulation hormonale a pour conséquence une hyperplasie de l'endomètre et une hausse du nombre des récepteurs aux œstrogènes et à progestérone. La concentration sérique en hormones demeure inchangée mais le nombre des récepteurs hormonaux augmente dans l'utérus. Le recrutement des leucocytes dans l'utérus est réduit et la contraction utérine est incomplète. Cela promeut une réduction des défenses immunitaires de l'utérus et facilite les infections bactériennes ascendantes, principalement dues à *Escherichia coli* à l'origine de pyomètres (Tavares *et al.*, 2010).



Compte tenu de la haute prévalence de pyomètre chez la chienne entière traitée au tamoxifène, il est préférable d'interdire l'indication du tamoxifène à des femelles entières. Puisqu'il n'existe aucune différence significative dans les effets indésirables entre les doses de 0,5 et 0,8 mg/kg, une dose de 0,8 mg/kg pendant au moins 120 jours est conseillée par les auteurs. Aucune étude n'a évalué les effets thérapeutiques du tamoxifène sur un plus long terme. Son utilisation reste contre-indiquée à ce jour.

L'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH)

Une étude a évalué l'activité de la goséréline, un agoniste de la GnRH, dans des tumeurs mammaires hormono-dépendantes du Chien (Lombardi *et al.*, 1999). L'étude portait sur 18 chiennes entières ayant des tumeurs mammaires dites T2-T4, N0, M0 selon la classification TNM, positives pour le récepteur ER. Neuf chiennes ont été traitées par la goséréline à 60 µg/kg par voie sous-cutanée tous les 21 jours pendant 12 mois et neuf chiennes n'ont pas reçu de traitement (groupe témoin). Des examens cliniques, des radiographies thoraciques et des tests sanguins hématologiques et biochimiques ont été effectués tous les 21 jours. Un examen clinique de suivi a été réalisé 6 mois après l'arrêt du traitement.

Les tumeurs ont été mesurées à J1, J30, J360 et J540. Concernant le groupe témoin, une augmentation du diamètre des tumeurs de 8,8%, 53,5% et 57,9% en moyenne à J30, J360 et J540 respectivement par rapport à J1 a été notée. Concernant le groupe expérimental, une diminution de diamètre des tumeurs de 8,2%, 65,3% en moyenne à respectivement J30 et J360 par rapport à J1 a été observée. La taille des tumeurs de ce groupe était stable de J360 à J540. Le taux de mortalité (survie globale) due à la tumeur mammaire a été de 55% à J360 et 88% à J540 pour le groupe témoin contre 0% à J540 pour le groupe expérimental. La présence de métastases locorégionales atteignait 78% à J540 pour le groupe témoin contre 0% pour le groupe expérimental. La présence de métastases à distance de la tumeur primitive était de 22% pour le groupe témoin à 360 jours, et 33% à 540 jours, contre 0% et 15% pour le groupe expérimental. La concentration sanguine en œstradiol est restée stable autour de 10 pg/ml pour le groupe témoin alors qu'elle a diminué progressivement jusqu'à rester stable autour de 2,8 pg/ml à partir de J63 pour le groupe expérimental. La concentration sanguine de progestérone a diminué progressivement jusqu'à J63 puis a atteint un plateau autour de 0,41 ng/ml pour le groupe expérimental. Elle était stable autour de 0,8 ng/ml pour le groupe témoin. Il y a eu un pic de concentration sanguine d'œstradiol et de progestérone autour de J42 pour le groupe témoin correspondant au pic d'ovulation du cycle sexuel de la chienne. Ces pics de concentration n'ont pas été observés dans le groupe expérimental. Une reprise de l'activité gonadique a été notée dans le groupe expérimental après l'arrêt du traitement (J360-J540). Aucune anomalie des paramètres sanguins biochimiques et hématologiques du groupe expérimental et aucun signe clinique indiquant une intolérance au traitement n'a été observé.

En résumé, la concentration sanguine en œstradiol et progestérone du groupe expérimental a diminué jusqu'au niveau de l'anœstrus pendant la durée du traitement. Cette diminution était réversible à l'arrêt du traitement et une reprise du cycle sexuel était possible. Le diamètre des tumeurs mammaires du groupe expérimental a été réduit de plus de 60% à J360. Cette diminution de taille s'est avérée stable 6 mois après le traitement. Tous les animaux ont montré une réponse objective au traitement après 3 mois de traitement et le taux de survie sans récurrence était de 88% à 2 ans. Les examens cliniques et des bilans sanguins n'ont indiqué aucune toxicité de la goséréline.



Ces résultats suggèrent qu'à la dose de 60 µg/kg par voie sous-cutanée, la goséréline est capable de bloquer la production hormonale ovarienne de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La goséréline améliore le pronostic vital et facilite la chirurgie d'exérèse tumorale en réduisant la taille des tumeurs mammaires canines hormono-dépendantes.



La suppression de la fonction ovarienne est indiquée pour les tumeurs hormono-dépendantes. Une ovariectomie et/ou un traitement à base de goséréline sont indiqués, si la chirurgie n'est pas réalisable ou en traitement néo-adjuvant.

Traitement anti-récepteur PR : l'aglépristone

Guil-Luna et collaborateurs ont entrepris de rechercher les effets de l'aglépristone sur la prolifération et l'apoptose de cellules tumorales de carcinomes mammaires canins en fonction de l'expression du récepteur PR (Guil-Luna *et al.*, 2011). L'étude portait sur 27 femelles entières ayant un carcinome mammaire. Cinq femelles ont été traitées avec un placebo et 22 femelles ont reçu une dose de 20 mg/kg d'aglépristone par voie sous-cutanée à J1 et J8. Une biopsie des tumeurs a été effectuée avant le début du traitement (J1) et 15 jours plus tard (J15). La présence du récepteur PR, du marqueur de prolifération Ki67 et de la lamine A/C dégradée, un marqueur de l'apoptose, a été évaluée par immunohistochimie. Aucune différence significative dans la quantité de récepteurs PR n'a été observée avant et après le traitement pour le groupe contrôle. Dans le groupe expérimental, 59,1% des échantillons étaient PR⁺ à J1 contre 36,4% à J15. Cette différence est significative. Une réduction de plus de 20% de l'indice de prolifération a également été notée entre J1 et J15 pour 61,5% des tumeurs du groupe expérimental ayant des tumeurs PR⁺. En revanche, aucune diminution significative n'a été enregistrée dans le groupe des tumeurs PR⁻. Concernant l'apoptose, aucune différence significative de la quantité de lamine A/C dégradée n'a été notée entre les deux groupes.

En 2014, les effets de l'aglépristone sur la prolifération de cellules de carcinomes mammaires canins en fonction de l'expression des deux isoformes A et B du récepteur PR ont été étudiés. Une réduction significative de plus de 20% de l'indice de prolifération a été observée pour l'isoforme A du récepteur PR, mais pas pour l'isoforme B. L'action antiproliférative de l'aglépristone est donc due à l'isoforme A du récepteur PR (Guil-Luna *et al.*, 2014). Les auteurs suggèrent que l'aglépristone est un bon inhibiteur de la prolifération cellulaire des tumeurs mammaires PR⁺ ; elle agit en particulier sur l'isoforme A du récepteur. L'aglépristone pourrait être utilisée en traitement néo-adjuvant pour traiter les tumeurs mammaires PR⁺ chez le Chien.



Les récepteurs ER et PR sont des marqueurs prédictifs d'une réponse favorable à l'endocrinothérapie chez la chienne atteinte d'un carcinome mammaire.



La goséréline et l'aglépristone semblent des molécules prometteuses dans le traitement néo-adjuvant des tumeurs mammaires ER⁺ et PR⁺ chez la chienne. Elles peuvent être utilisées en cas d'impossibilité d'effectuer une anesthésie générale en vue d'une chirurgie.



Aucune étude n'a été menée à ce jour pour étudier l'action des inhibiteurs de l'aromatase sur les tumeurs mammaires du Chien

L'immunothérapie

Il existe deux sortes d'immunothérapies : l'immunothérapie passive utilisant des anticorps monoclonaux dont la cible est spécifique et l'immunothérapie active activant les défenses du système immunitaire comme la vaccination.

L'immunothérapie passive : les anticorps anti-HER2

Trastuzumab

Il s'agit de l'unique étude visant à tester l'efficacité du trastuzumab chez le Chien. Au vu des résultats préliminaires, il serait intéressant de commencer des essais cliniques incluant le trastuzumab chez le Chien. Le trastuzumab deviendra un médicament générique en 2017. Il sera alors accessible en médecine vétérinaire et pourrait constituer une révolution dans l'établissement du plan thérapeutique des tumeurs mammaires surexprimant HER2. Il faut cependant prêter attention au fort risque d'immunisation des anticorps humains par la chienne. Une étude sur la perte d'efficacité et sur le risque de choc anaphylactique après quelques injections serait nécessaire.

L'immunothérapie active : la vaccination anti-HER2

La surexpression de HER2, récepteur ayant un domaine extracellulaire, par certaines cellules tumorales mammaires permet l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire et/ou humorale spécifique contre les cellules HER2 positives. L'immunothérapie passive à base d'anticorps monoclonaux a été très étudiée et fait maintenant partie du traitement recommandé pour les tumeurs du sein HER2 positives. La piste d'un traitement par approche vaccinale ou immunothérapie active visant HER2 a également été explorée (Loirat et Diéras, 2015).

Les premiers résultats, que nous n'allons pas présenter, semblent pauvres en termes de bénéfice clinique. Ils sont toujours en cours d'étude de phase I et les résultats définitifs sont attendus. Les différents types de vaccins en cours d'étude sont les suivants (Loirat et Diéras, 2015):

- Les vaccins peptidiques. Ce sont des peptides dérivés d'antigènes co-administrés avec un adjuvant capable d'induire une réponse cytotoxique antitumorale. Reconnus par les CMH I et II, ils permettent une stimulation des lymphocytes T CD8+ et T CD4+ responsables respectivement de la lyse des cellules tumorales et de la stimulation des réponses T et B spécifiques. Un inconvénient est la restriction à un sous-type HLA qui limite l'utilisation de ce vaccin à une partie de la population. La patiente doit être du phénotype HLA qui permettra la présentation de l'antigène. Ainsi, le vaccin le plus étudié est l'E75 composé d'un peptide du domaine extracellulaire de HER2, destiné aux patientes des sous-types HLA-A2 et A3.
- Les vaccins protéiques. Ils sont formés de protéines entières et de forts adjuvants capables de recruter des cellules présentatrices d'antigènes. L'intérêt réside en la production d'une réponse polyclonale T CD4 et CD8 contre plusieurs épitopes. Ainsi, le dHER2 est une forme tronquée de HER2.

- Les vaccins ADN. Ils sont composés de plasmides portant un gène codant la protéine antigénique et d'adjuvants contenus dans le vecteur. La protéine est exprimée de façon endogène, la toxicité chez l'Homme est faible mais les capacités immunologiques le sont également. Ainsi, le plasmide HER2-pDNA a été utilisé.
- Les vaccins viraux. L'utilisation de vecteurs viraux permet d'obtenir une réponse T CD8, T CD4 et humorale par l'expression endogène d'antigènes tumoraux sans que l'on soit confronté au problème de compatibilité du CMH.
- Les vaccins cellulaires à base de cellules présentatrices d'antigènes. Les cellules présentatrices d'antigènes autologues fusionnées avec HER2 présentent une lenteur et un coût élevé de fabrication. Il faut en effet produire un lot de vaccins par patiente.
- Les vaccins à base de cellules tumorales. Les cellules issues de lignées tumorales spécifiques surexprimant HER2 (SKBR3) sont couplées à un adjuvant. Ces vaccins n'ont pas de restriction au CMH et induisent une réponse cellulaire et humorale spécifiques.

CONCLUSION

Les tumeurs mammaires sont les tumeurs les plus fréquentes chez la chienne. Elles représentent 50 à 70% des tumeurs de cette espèce avec une incidence de 205 cas pour 100 000 chiennes (Sorenmo *et al.*, 2013). La tumeur mammaire de la chienne présente de nombreuses similitudes avec la tumeur du sein chez la femme aux niveaux anatomique, histologique et moléculaire.

De nombreux marqueurs tumoraux sont décrits et sont utilisés en médecine humaine. Ils sont utilisés pour aider au diagnostic de certains cancers, pour proposer un pronostic au patient, pour mettre en place un plan thérapeutique adapté et pour apprécier la réponse au traitement effectué. Trois marqueurs principaux sont étudiés dans la tumeur du sein : les récepteurs ER, PR et HER2. Une nouvelle classification moléculaire des tumeurs du sein chez la femme voit le jour en 2001. Elle est basée sur l'expression ou la non-expression de ces trois principaux marqueurs. Les tumeurs du sein sont classées selon 5 profils : luminal A (ER⁺ et/ou PR⁺, HER2⁻), luminal B (ER⁺ et/ou PR⁺, HER2⁺), HER2 (ER⁻ et/ou PR⁻, HER2⁺), *basal-like* (ER⁻, PR⁻, HER2⁻ et au moins un marqueur basal positif) et profil *normal-like* (négatif pour ces marqueurs).

Au vu des grandes similitudes existant entre les tumeurs du sein chez la femme et les tumeurs mammaires chez la chienne, nous avons exploré la littérature pour savoir si ces marqueurs pourraient être utilisés en médecine vétérinaire. Notre étude bibliographique expose l'intérêt des marqueurs dans le diagnostic, le pronostic et la prise en charge thérapeutique de la tumeur mammaire chez la chienne.

Nous avons tout d'abord vu que la détermination d'un stade et d'un grade joue un rôle important dans l'établissement du diagnostic du sous-type tumoral et du pronostic. Trois autres facteurs de risque principaux ont été identifiés : l'âge, le statut hormonal et la race de l'animal.

Nous avons ensuite découvert dans la littérature que la surexpression des récepteurs ER, PR et HER2 est également observée dans certaines tumeurs mammaires de la chienne. Ces marqueurs sont affiliés à des pronostics différents selon leur expression tumorale. Différents profils immunohistochimiques, basés sur la classification humaine, sont retrouvés dans des séries de tumeurs mammaires malignes chez la chienne. En moyenne, 45% des tumeurs ont un profil luminal A, 15% un profil luminal B, 30% un profil *basal-like* et moins de 10% un profil HER2 (Gama *et al.*, 2008). Comme chez la femme, les différents profils immunohistochimiques sont associés à des pronostics différents. Le profil luminal A est le plus souvent associé à une non-expression des marqueurs basaux, un faible grade histologique et correspondent à des carcinomes complexes et des tumeurs à faible invasion et progression. Les profils *basal-like* et HER2 sont, quant à eux, associés à une expression des marqueurs basaux, un grade histologique élevé et correspondent à des carcinomes simples et des carcinosarcomes. Ils présentent une invasion lymphovasculaire et un fort taux de prolifération. Le profil *basal-like* est ainsi associé à un profil clinique agressif avec un faible taux de survie sans récurrence. Ces informations concordent avec les données récoltées sur les profils immunohistochimiques du cancer du sein chez la femme.

Les marqueurs tumoraux cités précédemment permettent l'établissement du sous-type de la tumeur mammaire chez la chienne. À chaque sous-type tumoral correspond un profil immunohistochimique associé à un pronostic.

L'établissement d'un pronostic dépend non seulement de la nature de la tumeur mais également de l'efficacité des traitements existants pour lutter contre cette tumeur.

L'existence de tumeurs exprimant des marqueurs tumoraux spécifiques permet l'utilisation de traitements ciblés contre les cellules tumorales exprimant ces marqueurs. L'objectif des thérapies ciblées est d'éliminer spécifiquement la cellule tumorale tout en causant le moins d'effets indésirables possibles. Des traitements anti-tumoraux ayant pour cibles des récepteurs hormonaux, et plus récemment HER2, existent en médecine humaine : il s'agit de l'hormonothérapie et des traitements anti-HER2 (Boudin et Gonçalves, 2015). En tant que vétérinaire, nous nous sommes demandés si l'utilisation de ces thérapies est possible chez la chienne et si elles permettent d'améliorer le pronostic clinique de l'animal.

Le tamoxifène est le standard de la thérapie hormonale adjuvante chez les femmes en préménopause ayant un cancer du sein ER⁺ diagnostiqué au stade précoce. Les récepteurs ER et PR sont des marqueurs prédictifs d'une réponse favorable à l'endocrinothérapie chez le Chien atteint d'un carcinome mammaire. Les effets secondaires sont très délétères chez la chienne et aucune étude n'a analysé sur le long terme les bénéfices thérapeutiques du tamoxifène. Son utilisation reste contre-indiquée. Il a cependant été montré que la goséréline, un agoniste de la GnRH, et l'aglépristone, un anti-récepteur PR, sont prometteurs comme traitements néo-adjuvants des tumeurs mammaires ER⁺ et PR⁺ chez la chienne. Ces molécules permettent une amélioration du pronostic vital et facilitent la chirurgie d'exérèse tumorale en réduisant la taille des tumeurs mammaires hormono-dépendantes.

Le trastuzumab est le premier anticorps monoclonal ciblé contre les tumeurs du sein HER2 positives. Associé à une chimiothérapie classique, il a permis d'améliorer considérablement la survie globale et sans récurrence de patientes atteintes d'une tumeur HER2 positive métastasée ou non. Le récepteur HER2 du Chien présente une forte homologie avec le récepteur HER2 de l'Homme. La conservation des épitopes de la protéine canine permet une fixation *in vitro* du trastuzumab sur des cellules de carcinome mammaire surexprimant HER2. Nous avons découvert dans la littérature que les cellules de carcinomes mammaires surexprimant HER2 sont sensibles à l'inhibition de croissance induite par le trastuzumab. L'utilisation du trastuzumab pourrait constituer un traitement sûr et efficace des carcinomes mammaires canins surexprimant HER2. Une adaptation à la séquence canine de l'anticorps trastuzumab pour un anticorps canin permettrait une meilleure réponse au traitement. Synthétiser de tels anticorps pourrait non seulement avoir un effet local sur la tumeur mais aussi provoquer une réponse immunitaire active, qui serait médiée par les cellules immunitaires canines et activée par le fragment Fc de l'anticorps adapté au Chien. La réponse au traitement en serait améliorée.

Nous restons tout de même prudents quant à l'interprétation des pronostics des profils immunohistochimiques et des résultats des traitements ciblés testés chez la chienne. En effet, même si les études chez la femme sont nombreuses, la découverte des profils est trop récente pour que les vétérinaires aient eu le temps de se pencher sur le sujet. Trop peu d'études ont été publiées pour permettre une interprétation solide des marqueurs tumoraux ER, PR et HER2 chez la chienne. Vis-à-vis des nombreux résultats en médecine humaine et des quelques résultats prometteurs en médecine vétérinaire, nous souhaitons pouvoir croire à une révolution dans l'établissement du diagnostic et du plan thérapeutique des tumeurs mammaires chez la chienne. De nouvelles molécules ciblées contre HER2 ne cessent d'être commercialisées (trastuzumab, pertuzumab, trastuzumab emtansine, lapatinib...) et nous n'avons pas fini d'entendre parler du récepteur HER2 et des améliorations des pronostics vitaux chez la femme.

Actuellement, chez l'Homme, il est commun de rechercher une dizaine de gènes mutés dans les tumeurs. Si aucune de ces mutations n'est trouvée sur la tumeur d'un patient, certains médecins n'hésitent pas à aller plus loin et proposent un séquençage extensif du génome de la tumeur. Le séquençage de nouvelle génération (NGS, *Next Generation Sequencing*) permet d'analyser les 315 gènes les plus fréquemment impliqués dans les processus tumoraux (voir par exemple le site FoundationOne, <http://foundationone.com/>). En France, l'Institut National du Cancer a annoncé que d'ici 2020, le génome de 50 000 tumeurs de patients atteints de cancer sera connu (Buzyn, 2014).

L'oncologie est en constante évolution. Au départ, les protocoles thérapeutiques étaient quasiment uniques. Limités par le nombre de molécules utilisables en chimiothérapie, les oncologues avaient pour objectif de trouver un plan thérapeutique qui convienne au plus grand nombre. Avec les avancées en recherche médicale, une nouvelle prise en charge est apparue : la médecine de précision. Grâce à la découverte de nombreux marqueurs tumoraux, les tumeurs ont pu être classées en sous-type tumoraux pour lesquels des traitements ciblés ont été mis en place. L'objectif de demain est donc d'aller encore plus loin et d'obtenir une médecine dite personnalisée, où chaque tumeur pourra être séquencée et traitée le plus précisément possible par un traitement unique.

La médecine vétérinaire ne cesse d'évoluer et suit la trace de la médecine humaine avec quelques dizaines d'années de retard. Il était encore impossible de penser il y a une vingtaine d'années que l'examen d'imagerie tomodynamique serait aussi fréquemment utilisé en médecine vétérinaire. La cancérologie reste encore un domaine peu développé et le recours à l'euthanasie est très fréquent. Les limites financières et le souhait de ne pas faire souffrir son animal lors d'une chimiothérapie sont des raisons fréquemment données par les propriétaires et les vétérinaires, à juste titre. Lorsque la médecine vétérinaire aura accès à des traitements ciblés provoquant moins d'effets indésirables et que ces derniers seront plus abordables en termes de coûts, il sera peut-être judicieux d'envisager une chimiothérapie. L'arrivée de nombreux biosimilaires de thérapies ciblées est prévue à partir de 2017 et une très importante baisse des prix est attendue, permettant ainsi d'engager un plus grand nombre d'études chez la chienne. Au vu des similitudes qu'elle possède avec la femme, la chienne a longtemps été un modèle d'études des tumeurs du sein. Il est probable que la chienne puisse bénéficier un jour à son tour de ces différentes avancées médicales.

BIBLIOGRAPHIE

- AHERN TE., BIRD RC., BIRD AE., WOLFE LG. Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *Am. J. Vet. Res.* 1996, **57**, 693-696.
- ALLRED DC., HARVEY JM., BERARDO M., CLARK GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod. Pathol.* 1998, **11**, 155-168.
- BELSCHE-S-JABLONSKI AP., BISCARDI JS., PEAVY DR., TICE DA., ROMNEY DA., PARSONS SJ. Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival. *Oncogene*. 2001, **20**, 1465-1475.
- BILLON-GALES A., FONTAINE C., FILIPÉ C., DOUIN-ECHINARD V., FOUQUE M-J., FLOURIOT G., *et al.* The transactivating function 1 of estrogen receptor alpha is dispensable for the vasculoprotective actions of 17beta-estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009, **106**, 2053-2058.
- BUZYN A. Les apports des Plans cancer à la cancérologie. *Oncologie*. 2014, **16**, 4-6.
- CAMPOS LC., SILVA JO., SANTOS FS., ARAÚJO MR., LAVALLE GE., FERREIRA E., *et al.* Prognostic significance of tissue and serum HER2 and MUC1 in canine mammary cancer.
- CUZICK J., SESTAK I., BAUM M., BUZDAR A., HOWELL A., DOWSETT M., *et al.* Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *The lancet oncology*. 2010, **11**, 1135-1141.
- DALENC F. PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and HER2-positive breast cancers. *La lettre du cancérologue*. 2015, **24**, 400-403.
- DE LAS MULAS JM., MILLÁN Y., DIOS R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology Online*. 2005, **42**, 200-212.
- DE LAS MULAS JM., ORDÁS J., MILLÁN Y., FERNÁNDEZ-SORIA V., Y CAJAL SR. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas. *Breast cancer research and treatment*. 2003, **80**, 363-367.
- DOLIGER S. *Vade-Mecum de cancérologie vétérinaire*, 1ère ed, *Vade-mecum*. 2003, ÉDITIONS MED'COM, 224 p.
- DONNAY I., DEVLEESCHOUWER N., WOUTERS-BALLMAN P., LECLERCQ G., VERSTEGEN J. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid
- DUTRA AP., GRANJA NVM., SCHMITT FC., CASSALI GD. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res*. 2004, **37**, 11.
- ELSTON CW., ELLIS IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; **19**: 403-410. *Histopathology*. 2002, **41**, 151-152, discussion 152-153.
- FALTUS T., YUAN J., ZIMMER B., KRÄMER A., LOIBL S., KAUFMANN M., *et al.* Silencing of the HER2/neu gene by siRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *Neoplasia*. 2004, **6**, 786-795.
- FRENEL JS., PATSOURIS A., GOURMELON C., AUGEREAU P., BOURBOULOUX E., SOULIÉ P., *et al.* State of art of management of advanced HEER2+ breast cancer. *La lettre du cancérologue*. 2015, **24**, 444-449.
- GUIL-LUNA S., STENVANG J., BRÜNNER N., DE ANDRÉS FJ., ROLLÓN E., DOMINGO V., *et al.* Progesterone receptor isoform A may regulate the effects of neoadjuvant aglepristone in canine mammary carcinoma. *BMC Vet. Res.* 2014, **10**, 296.
- GUIOCHON-MANTEL A., LOOSFELT H., LESCOP P., SAR S., ATGER M., PERROT-APPLANAT M., *et al.* Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor:
- KOMATSU T., IWANO H., EBISAWA M., WATABE A., ENDO Y., HIRAYAMA K., *et al.* Pathological classification of canine mammary tumor based on quantifying mRNA levels of hormonal receptors, SATB1, and Snail in tissue and fine needle biopsy samples. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2012, **74**, 719-726.
- LEE JW., SOUNG YH., SEO SH., KIM SY., PARK CH., WANG YP., *et al.* Somatic mutations of ERBB2 kinase domain in gastric, colorectal, and breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 2006, **12**, 57-61.
- LI J-J., SHAO Z-M. Endocrine therapy as adjuvant or neoadjuvant therapy for breast cancer: selecting the best agents, the timing and duration of treatment. *Chin Clin Oncol*. 2016,.
- LOCKER GY. Hormonal therapy of breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 1998, **24**, 221-240. LOIRAT D., DIÉRAS V. Immunity and HER2+ breast cancer : impact of immune environnement and some therapeutic approaches. La lettre du cancérologue, 2015, 24, 411-442.
- LOMBARDI P., FLORIO S., PAGNINI U., CRISPINO A., AVALLONE L. Ovarian function suppression with a GnRH analogue: D-ser(But[t])-[6]-Arzglyl[10]-LHRH (Goserelin) in hormone dependent canine mammary cancer. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1999, **22**, 56-61.
- LOOSFELT H., ATGER M., MISRAHI M., GUIOCHON-MANTEL A., MERIEL C., LOGEAT F., *et al.* Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986, **83**, 9045-9049.
- MARTY M., COGNETTI F., MARANINCHI D., SNYDER R., MAURIAC L., TUBIANA-HULIN M., *et al.* Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J. Clin. Oncol.* 2005, **23**, 4265-4274.

- MUTHUSWAMY SK., LI D., LELIEVRE S., BISSELL MJ., BRUGGE JS. ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nature Cell Biology*. 2001, **3**, 785-792.
- NIETO A., PENA L., PEREZ-ALENZA MD., SANCHEZ MA., FLORES JM., CASTANO M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Veterinary Pathology Online*. 2000, **37**, 239-247.
- OWEN LN. *TNM Classification of Tumours in Domestic Animals*. 1980, World Health Organization, 53 p.
- PAGANI O., REGAN MM., WALLEY BA., FLEMING GF., COLLEONI M., LÁNG I., *et al.* Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2014, **371**, 107-115.
- PATSIKAS MN., KARAYANNOPOULOU M., KALDRYMIDOY E., PAPAZOGLOU LG., PAPADOPOULOU PL., TZEGAS SL., *et al.* The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat Histol Embryol*. 2006, **35**, 228-234.
- PENA L., GAMA A., GOLDSCHMIDT MH., ABADIE J., BENAZZI C., CASTAGNARO M. REIMANN N., BARTNITZKE S., BULLERDIEK J., MISCHKE R., NOLTE I. Trisomy 1 in a canine acute leukemia indicating the pathogenetic importance of polysomy 1 in leukemias of the dog. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1998, **101**, 49-52.
- RUNGSIPAT A., ATEYAMA S., YAMAGUCHI R., UCHIDA K., MIYOSHI N., HAYASHI T. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors.. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1999, **61**, 27-32.
- SABLIN MP., LE TOURNEAU C., ALT M., LOIRAT D., BORCOMAN E., DIÉRAS V. Tyrosine kinase inhibitors in HER2+ breast cancers. *La lettre du cancérologue*. 2015, **24**, 382-390.
- SAINT-DIZIER M., CHASTANT-MAILLARD S. *La reproduction animale et humaine*. 2014, Quae, 1317 p.
- SASSI F., BENAZZI C., CASTELLANI G., SARLI G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research*. 2010,
- TAVARES WL., LAVALLE GE., FIGUEIREDO MS., SOUZA AG., BERTAGNOLLI AC., VIANA FA., *et al.* Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. *Acta Vet Scand*. 2010, **52**, 67.
- TSUDA H., HIROHASHI S., SHIMOSATO Y., HIROTA T., TSUGANE S., WATANABE S., *et al.* correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma. A retrospective analysis of 176 cases. *Cancer*. 1990, **65**, 1794-1800.
- VERSTEGEN J., ONCLIN K. Ethio-pathogeny, classification and prognosis of mammary tumors in the canine and feline species. *Proceedings Congress SFT*. Columbus : USA, Sept 2003, 230-238.
- WEIJER K . feline malignant mammary tumors : morphology and biology , some comparisons with in same and dog.
- WEIJER K., HEAD K. W., MISDORP W., HAMPE J F. Feline malignant mammary tumors .; I Morphology and biology . some comparisons with the same in man and dog, *Nat, Cancer, Instit*, 49,; 1697-1704,, 1972,
- Withrow S. J., 1975. Surgical management of Canine Mammary Tumors. *Veterinary Clinics of NortFh America*, **5**(3), p. 495-506.
- ZANINOVIC P., SIMCIC V. Epidemiology of mammary tumours in dogs. In : Z. B. VetFak, Univ Ljubljana. 1991, **1**, 57-72.
- ZUCCARI D.A., SANTANA A.E., CURY P.M., CORDEIRO J.A. –Immunohistochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Vet. Clin. Pathol.*,

LISTE FIGURES

Figure 1 : Schéma d'un acinus de glande mammaire (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014).....	08
Figure 2 : Schéma représentant le drainage lymphatique de chiennes atteintes de tumeurs mammaires sur M1 et M2 (a), M3 (b), M4 (c) et M5 (d) (Patsikas <i>et al.</i> , 2006).....	11
Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation du gène <i>ER</i> et de la protéine ER (adapté de Billon-Galés <i>et al.</i> , 2009).....	14
Figure 4 : Mécanisme d'action du récepteur aux œstrogènes (Modifié d'après Heldring <i>et al.</i> , 2007; Reid <i>et al.</i> , 2002).....	16
Figure 5 : Schéma représentant HER2, récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase. Les lettres représentent les localisations des mutations les plus fréquentes de HER2 (Moasser, 2007).....	18
Figure 6 : Voies de signalisation intracellulaire résultant d'une surexpression du récepteur HER2 (adapté de Moasser, 2007).....	21
Figure 7 : Cellules exprimant le récepteur chimère p75.B2 en l'absence du ligand synthétique AP1510 pendant 10 jours (a), 20 jours (b, c), et en présence du ligand AP1510 du 10 ^{ème} au 20 ^{ème} jour (d, e, f) (Muthuswamy <i>et al.</i> , 2001).....	22
Figure 8 : Graphique représentant le pourcentage d'acini exprimant le marqueur de la prolifération cellulaire Ki-67 en fonction de la durée d'une stimulation par le ligand synthétique AP1510 (Muthuswamy <i>et al.</i> , 2001).....	23
Figure 9 : Nombre de copies du gène HER2 dans une glande mammaire canine. De un à quatre signaux par noyau sont présents dans une lésion épithéliale proliférative bénigne (A) (flèches indiquant le marquage CISH) et dans un carcinome mammaire (B) (De las Mulas <i>et al.</i> , 2003).....	27
Figure 10 : Schéma représentant les techniques d'immunohistochimie directe et indirecte.....	31
Figure 11 : Coupes histologiques de carcinomes mammaires de chiennes marquées par immunohistochimie (Gama <i>et al.</i> , 2008).....	32
Figure 12 : Interprétation et scores de la surexpression de la protéine HER2 déterminée par immunohistochimie (d'après Penault-Llorca, 2015).....	34
Figure 13 : Courbes de survie globale 1 an après exérèse chez 89 chiennes (A) et 2 ans après chirurgie chez 66 chiennes (B) en fonction de leur statut HER2 (Hsu <i>et al.</i> , 2009).....	39

Figure 14 : Coupes histologiques de carcinomes mammaires canins marqués par immunohistochimie ; a-d : marquage du récepteur ER, e-h : marquage du récepteur HER2, i-l : marquage de la kératine CK5, m-p : marquage de la protéine p63, q-t : marquage de la P-cadhérine. Chaque colonne représente un sous-type immunohistochimique distinct. De gauche à droite : luminal A, luminal B, *Basal-like*, et HER2 (Gama *et al.*, 2008). 41

Figure 15 : Courbe de survie globale (a) et de survie sans récurrence (b) selon les différents sous-types moléculaires des carcinomes mammaires canins (Gama *et al.*, 2008)..... 43

LISTE TABLEAUX

Tableau 1 : Drainage lymphatique de glandes mammaires saines et présentant une tumeur (d'après Patsikas <i>et al.</i> , 2006)	10
Tableau 2 : Classification TNM (Tumeur/Nœuds lymphatiques/Métastases) du stade des tumeurs mammaires chez la chienne (selon Owen, 1980, version modifiée)	28
Tableau 3 : Grade en fonction du score total selon Elston et Ellis, 2002, pour les tumeurs mammaires chez la chienne	30
Tableau 4 : Exemples de marqueurs utilisés pour identifier les cellules myoépithéliales des tumeurs mammaires chez la chienne en fonction de l'intensité du marquage et du type de tissu marqué (selon Pena et al., 2014).....	36
Tableau 5 : Résultats immunohistochimiques pour les marqueurs ER, HER2, CK5, P63, P-cadhérine (PCAD) de 100 carcinomes mammaires canins.	42
Tableau 6 : Répartition des carcinomes mammaires canins dans les sous-types moléculaires en fonction des marqueurs moléculaires (n=96) (Gama <i>et al.</i> , 2008).....	42
Tableau 7 : Technique chirurgicale conseillée en fonction de caractéristiques anatomo-pathologiques de la tumeur mammaire chez la chienne (Doliger, 2003).....	47

