

UNIVERSITE DE LILLE

LABORATOIRE INSERM U908 et OCR (Oncovet Clinical Research)

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale Biologie-Santé de Lille (ED 446)

Effets des neurotrophines dans l'enrichissement des
cellules souches de cancer du sein et étude
translationnelle dans le modèle canin

Présentée et soutenue publiquement par

Bernadette Rogez

Le 21 septembre 2018

Jury

Président : Pr. Philippe Delannoy

Rapporteurs : Pr. Frédérique Ponce

Pr. Charles Dumontet

Examineurs : Dr. Jérôme Abadie

Pr. Xuefen Le Bourhis

Dr. Valérie Chopin

Membres invités : Dr. Dominique Tierny

Dr. Quentin Pascal

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier le FEDER, l'université de Lille et OCR pour m'avoir financée durant ces 3 ans de thèse.

Je remercie les membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse : le Pr. Philippe Delannoy, le Pr. Charles Dumontet, le Pr. Frédérique Ponce, le Dr. Jérôme Abadie, le Pr. Xuefen Le Bourhis, le Dr. Valérie Chopin, le Dr. Dominique Tierny et le Dr. Quentin Pascal. Je vous remercie pour avoir pris le temps de relire mon manuscrit, et je remercie tout particulièrement le Pr. Charles Dumontet, le Pr. Frédérique Ponce, et le Dr. Jérôme Abadie pour avoir accepté de venir de Lyon ou Nantes pour assister à ma soutenance.

Je remercie également le Pr. Philippe Delannoy et M. Roland Bourette pour avoir participé à mes comités de suivi individuels afin de discuter de l'évolution du projet de thèse.

Je souhaite remercier la directrice de laboratoire et directrice de thèse, le Pr. Xuefen Le Bourhis, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, d'avoir assuré l'encadrement de ma dernière année de thèse et d'avoir pris en charge la correction de mon manuscrit de thèse.

Merci à mon encadrante, le Dr. Valérie Chopin, pour m'avoir préparée au grand jury et avoir accepté d'encadrer le travail de thèse d'une non-biologiste, avec le surplus d'attention et de temps que cela demandait.

Merci au Dr. Dominique Tierny, pour m'avoir soutenue dans ma volonté de réaliser un projet de thèse, sans vous rien n'aurait été possible.

Merci à Audrey, pour avoir accepté de t'investir dans ce projet de thèse. Ton aide a été précieuse, tu as assuré avec brio le travail de recueil des données. Les félicitations du jury lors de ta soutenance de thèse sont amplement méritées.

Equipe U908

Merci aux statutaires de l'équipe U908 – Eric Adriaenssens, Chann Lagadec, Robert-Alain Toillon, Pierre-Olivier Angrand, Pamela Völkel, Sylvain Julien – de m'avoir montré au jour le jour ce que signifie la recherche et ses valeurs essentielles. Merci pour vos remarques constructives et bienveillantes lors des labmeetings.

Merci à l'équipe du COL et tout particulièrement à Samuel Meignan et Christine Bal : votre aide a été précieuse pour toute la partie d'immunomarquage, merci pour les protocoles transmis, les anticorps prêtés, et pour les manips réalisées sur CD133.

Merci aux « anciennes », qui nous ont tout appris. Constance, je ne t'ai pas connue longtemps, mais c'était un plaisir de pouvoir discuter avec toi. Justine, merci pour tes conseils, tu as été un exemple de rigueur et de dévouement dans ton travail. Barbara, merci pour ta bonne

humeur et ton optimisme à toute épreuve, quand je pense à toi j'entends ton rire qui traverse les couloirs. Merci pour ta relecture de mon introduction et tes conseils avisés pour l'améliorer.

A mes co-thésards, Romain, Nadège, Jordan, Clément. Romain, je te souhaite une belle fin de thèse, et un bel avenir professionnel. Merci d'avoir toujours répondu présent quand je venais te demander de l'aide. A Jordan et Clément, bon courage pour la suite, vous formez une équipe du tonnerre, ne perdez pas votre grain de folie. Un merci tout particulier à Nadège, pour ton aide précieuse sur les clones cellulaires, les heures passées à me montrer les manip, discuter des résultats obtenus, échanger des articles, mais aussi pour ton implication auprès de l'équipe des jeunes, autant pour la gestion du labo que pour la bonne ambiance, et pour tout le temps passé à organiser des surprises/cadeaux/départs dignes de ce nom pour les uns et les autres alors que rien ne t'y obligeait. Je te souhaite le meilleur, si quelqu'un le mérite c'est bien toi.

A la nouvelle génération : Marie W, Marie D, et Sarah. Félicitations pour en être arrivées là. N'oubliez pas de garder la bonne ambiance dans l'équipe et l'ordre dans le labo, gardez en tête pourquoi vous avez voulu faire de la recherche, et le plus important de tout : n'oubliez jamais que vous avez une vie privée à côté de la thèse ! Marie W, j'aurais aimé pouvoir mieux t'encadrer, mais force est de constater qu'au niveau scientifique tu te débrouilles déjà mieux que moi ! Bats-toi pour tes idées car ce sont souvent les bonnes...

A Nathalie, qu'aurais-je fait sans toi ? Merci pour m'avoir montré les manip à mon arrivée au labo, pour ton aide à toutes les étapes de ma thèse, pour tes corrections sur la partie matériels et méthodes. Merci pour ta bonne humeur et ton humanité, pour toutes nos conversations sur la vie à la ferme ou les idées sorties du week-end. Tu seras toujours la bienvenue à la maison.

A Jérémy et Ihsan, vous faites plaisir à voir, je vous souhaite bon vent pour la suite. Ihsan, ne laisse jamais personne te prendre ta joie de vivre, tu es un rayon de soleil pour les personnes autour de toi ! Jérémy, j'espère que tu trouveras ta voie, dans la recherche ou ailleurs, et que tu trouveras une place à ta juste valeur.

A Karine, merci pour la correction de la partie cancers du sein de ma thèse et pour nos conversations sur la recherche du point de vue d'un clinicien, humain ou vétérinaire. Merci également aux M2 de médecine, Martin, Geoffrey et Thomas pour avoir amené un point de vue clinique sur les projets de recherche. A Aurélie, merci pour ta bonne humeur, je sais vers qui me tourner si j'ai besoin de conseils chinchillas !

A Isa, merci pour nos discussions au coin de la paillasse ou du PSM, pour toutes les bouteilles de PBS autoclavées, et pour t'être assurée qu'il ne nous manquait rien pour travailler dans de bonnes conditions. A Valérie C, merci pour ton rire et pour toutes les commandes et ordres de missions, souvent passés en dernière minute mais toujours avec le sourire.

A Véronique Houdot et Véronique Delaplace, pour nous avoir permis de travailler dans un laboratoire toujours propre, et pour nos conversations de 7h du matin.

Equipe OCR

A Quentin, merci pour tout le temps que tu as investi dans mon projet de thèse, pour m'avoir aidée à monter l'étude, appris les bases de la lecture des lames, avoir corrigé ma partie sur les tumeurs mammaires canines, et m'avoir fait découvrir le dark side du web... mais pas pour m'avoir mis une certaine chanson dans la tête à peu près tous les jours de ma période à OCR !!

To Agata, thank you for everything. It was really a blessing to welcome you in the team, thank you for your help especially on the corrections of the article, for your friendship, and for our girly talks. I wish you all the best for the future with Mathieu by your side. You will be a wonderful mom.

A Emmanuel, merci pour ta patience infinie quand je venais te voir avec mes « Manu, j'ai une question. ». Pour tout le temps passé sur les commandes de réactifs, le reviewing de l'article, la réparation du Ventana, la recherche d'échantillons, et j'en oublie sûrement...

A Thomas, ton passage fut bref mais remarqué et apprécié de tous. J'aurais aimé pouvoir travailler avec toi plus longtemps. Tu étais présent lorsqu'on se demandait comment on allait se dépatouiller avec toutes nos données d'IHC et tu as apporté les premières pierres pour créer le design de l'étude. Merci pour ton aide et bonne route auprès de ta famille.

A Tiffany, que dire que tu ne saches déjà. Tu es une personne rayonnante, qui rend meilleures les personnes autour d'elle. Merci pour tous tes conseils techniques, pour le temps passé à refondre des blocs ou couper des lames, pour avoir mis du soleil dans nos journées, pour nos post-its que j'ai gardés,... Avec Nicolas, Ethan et Nathanaël vous faites partie de la famille.

A Delphine, c'était vraiment agréable de travailler avec toi. Les quelques mois qu'on a passés tous ensemble avec Quentin et Tiffany dans le bureau derrière le labo ont été les meilleurs de ma thèse.

A Valentine et Floriane, THE team com'. Quel plaisir de travailler avec vous ! On se souviendra longtemps de notre ESVONC à Lyon... Je suis ravie qu'on soit restées en contact, et je serai toujours dispo pour des conseils véto !

A Virginie, merci pour avoir pris le temps de comprendre mon projet de thèse et m'avoir aidée à rédiger le plan d'analyses statistiques malgré tes journées plus que chargées.

A la team clinique au grand complet : Sandy, Claire, Olivia, Séverine, Céline, Quentin D. J'ai été ravie de vous rencontrer ou pour Claire, de te retrouver. Olivia, tu reviens quand tu veux à la ferme avec la famille ! A Audrey W, notre comptable de choc, pour ta bonne humeur

et ton sourire en toutes circonstances. A Nathalie M, notre « maman » d'OCR, merci pour toutes tes attentions au quotidien, pour avoir pris soin de l'équipe et veillé sur nous.

A Matthieu, merci pour m'avoir appris les bases du business development.

A Tarek, pour avoir organisé notre départ pour le congrès ESVONC 2018.

Merci aussi à ceux que j'ai croisés trop brièvement : Juliette Hordeaux, Ingrid Bemelmans, Ancuta Apreteuse, Aurélie Coussaert, Sandrine Rougier, Sidi Thierno Bah, Zacharie egaoula, Romain Voreaux.

Equipe Oncovet

Un grand merci aux cliniciens d'Oncovet qui nous ont aidés à mettre au point le questionnaire à destination des vétérinaires, et un merci tout particulier au Dr. Franck Floch pour avoir pris le temps de rechercher des photos de cas cliniques afin d'illustrer mon manuscrit de thèse.

Equipe statisticiens

A François Machuron, pour la somme de travail monumentale que vous avez fourni sur mon projet, qui a pu mener à 2 articles avec des statistiques bien carrées, et pour les innombrables mails de rectifications/modifications/coquilles que j'ai pu envoyer et auxquels vous avez toujours répondu très rapidement et sans perdre patience.

A Hélène Behal, Julien Labreuche et Alain Duhamel, pour l'aide apportée sur le traitement statistique des données et les réponses apportées pour le reviewing de l'article.

Equipe cytométrie en flux

Merci à Nathalie Jouy et Emilie Floquet, pour les heures passées en votre compagnie à trier les clones de MDA-MB-231. Pour les soins apportés, week-en inclus, aux flasques de cellules laissées à l'IRCL.

Famille

Enfin, le plus grand merci revient à ma base arrière.

A mon père et mon frère, merci pour votre soutien indéfectible.

A Odile et Gilbert, merci de m'avoir acceptée et accueillie chez vous, de m'avoir fait confiance, et de m'apprendre jour après jour la vie à la ferme.

A Stéphane, mon amour, merci pour ta patience et pour m'avoir portée et supportée dans les moments les plus difficiles.

A Jeff, parce que quand j'avais besoin d'un coup de main, j'ai trouvé ta patte, et ton museau sur mon clavier.

RESUME

Les cellules souches cancéreuses (CSC) sont impliquées dans les phénomènes de résistance aux traitements et de récives dans les cancers du sein. Les neurotrophines comprennent le NGF et le BDNF, synthétisés sous forme de pro-neurotrophines. Elles se lient au récepteur commun p75^{NTR} et à TrkA ou TrkB, fixant préférentiellement une (pro)neurotrophine. Récemment, le laboratoire INSERM U908 a démontré que le NGF/proNGF sont capables d'enrichir plusieurs lignées épithéliales cancéreuses de sein en CSC. L'objectif de ma thèse était de comprendre le rôle des neurotrophines dans la régulation des CSC de sein chez l'homme et dans le modèle canin.

Nous avons montré que le BDNF/proBDNF peuvent également enrichir des lignées cancéreuses de sein en CSC *in vitro*. De plus, l'enrichissement en CSC induit par le NGF implique p75^{NTR} et TrkA tandis que les effets du proNGF impliquent également EphA2.

Sur 96 tumeurs mammaires canines issues de la biobanque d'OCR (Oncovet Clinical Research, Lille Métropole, France), nous avons montré par immunohistochimie que le phénotype CD44⁺/CD24⁻ seul n'est pas adapté pour détecter les CSC. CD24 est associé à des paramètres clinicopathologiques défavorables. Le proNGF, le BDNF et TrkA sont exprimés dans une majorité des tumeurs, mais ne sont pas associés avec des paramètres clinicopathologiques. TrkB et p75^{NTR} sont associés à des paramètres clinicopathologiques favorables et à une meilleure survie globale. De plus, p75^{NTR} semble être un marqueur de cellules myoépithéliales. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues dans le cancer du sein, soulignant la pertinence du modèle canin dans le développement de nouvelles thérapies ciblées.

Mots-clés : Cancer du sein/Cellules souches cancéreuses/Neurotrophines/Modèle canin

ABSTRACT

Cancer stem cells (CSC) are implied in resistance to treatment and recurrences in breast cancer. Neurotrophins include NGF and BDNF, synthesized as proneurotrophins. They bind to common receptor p75^{NTR} and to TrkA or TrkB, which bind specifically one (pro)neurotrophin. Recently, INSERM U908 demonstrated that NGF/proNGF are able to enrich several breast cancer cell lines in CSC. The objective of my PhD was to better understand the role of neurotrophins in the regulation of breast cancer stem cells both in human breast cancer and in the canine model.

We showed that BDNF/proBDNF could also enrich the pool of CSC in several breast cancer cell lines in vitro. Furthermore, the action of NGF on the enrichment of CSC pool is mediated by p75^{NTR} and TrkA, while the effects of proNGF also depend on EphA2.

On 96 paraffin-embedded canine mammary carcinomas samples coming from the biobank of OCR (Oncovet Clinical Research, Lille Métropole, France), we showed by immunohistochemistry that the phenotype CD44⁺/CD24⁻ alone is not suitable to detect CSC. CD24 is associated with poor clinicopathological parameters. ProNGF, BDNF and TrkA are expressed in a majority of tumors, but are not associated with clinicopathological parameters. Positive correlation between TrkB and p75^{NTR} expression and favorable clinicopathological parameters as well as better overall survival have been observed. Moreover, p75^{NTR} seems to be a marker of myoepithelial cells. These results are consistent with the results obtained in human breast cancer, which underlines the relevance of the canine model in the development of new targeted therapies.

Keywords: Breast cancer/Cancer stem cells/Neurotrophins/Canine model

ABBREVIATIONS

ABCB1 : ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1
ABCG2 : ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor
BRCA1 : Breast Cancer Gene 1
BRCA2 : Breast Cancer Gene 2
BrdU: bromodéoxyuridine
CDC : Communicable Diseases Center
CMI : Carcinome Mammaire Inflammatoire
COX : Cyclo-oxygénases
CSE : Cellules Souches Embryonnaires
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
CSPi : Cellules Souches Pluripotentes Induites
CTC : Cellules Tumorales Circulantes
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DFS : Disease-Free Survival
DiL : 1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DTC : Cellules Tumorales Disséminées
EE : Elston et Ellis
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EMA : Agence Européenne du Médicament
ER : Estrogen Receptor
ESMO: European Society for Medical Oncology
FDA : Food and Drug Administration
FDG : Fluoro-Désoxy-Glucose
FGF : Fibroblast Growth Factor
FZD : Frizzled
GH : Growth Hormone
GSH : Gluthation
HER-2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HGF/SF : Hepatic Growth Factor/ Scatter Factor
HMG : High Mobility Group
HSP90 : protéine de choc thermique 90
IM : Intramusculaire
INCA : Institut National du CAncer
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ITK : Inhibiteur de Tyrosine Kinase
IV : Intraveineux
Klf-4 : Krüppel-like Factor 4
LEF : Lymphocyte Enhancer Factor
MaSC : Cellules souches mammaires

MEC : Matrice Extra-Cellulaire
MMP : Métalloprotéinases Matricielles
MO : Moelle Osseuse
NCI : National Cancer Institute
NGF : Nerve Growth Factor
NICD : Notch IntraCellular Domain
NK : Natural Killer
NL : nœud lymphatique
Oct-4 : octamer-binding Transcription Factor-4
OMS : Organisation mondiale pour la santé
OS : Overall Survival
P75^{NTR} : p75 neurotrophin receptor
PAM : Plaque aérolo-mamelonnaire
PAR : Partitioning Defective
PGRN : Pluripotency Gene Regulatory Network
PI3-K : Phosphoinositide 3-kinase
PO : Per Os (Voie orale)
POU5f1 : POU domain class 5 transcription factor 1
PR : Progesterone Receptor
PTCH1 : Patched
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
QSE : Quadrant supéro-externe
QSI : Quadrant supéro-interne
QII : Quadrant inféro-interne
QIE : Quadrant inféro-externe
Rb : rétinoblastome
ROS : Reactive Oxygen Species
SBR : Scarff-Bloom Richardson
SMO : Smoothened
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
Sox-2 : Sex determining Region Y-box2
SRAS : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
TAM : Tumor Associated Macrophages
TCF : T-Cell Factor
TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TEP : Tomographie par Emission de Positons
TGF- β : Transforming Growth Factor-bêta
TMC : Tumeurs mammaires canines
TNM : Tumeur, Noeuds lymphatiques, Métastases
Trk : Tropomyosin-kinase
UICC : Union Internationale Contre le Cancer
USDA : United States Department of Agriculture
UTDL : Unité Terminale Ducto-Lobulaire
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
WCS: Wildlife Conservation Society
WHO : World Health Organization
ZEB : Zinc finger E-box binding homeobox

TABLE DES MATIERES

Remerciements.....	3
Résumé.....	7
Abstract.....	8
Abréviations.....	9
Table des matières.....	11
Liste des figures.....	19
Liste des tableaux.....	24
Introduction.....	25
I. Le chien comme modèle d'étude des pathologies humaines.....	27
A. Médecine translationnelle.....	27
1. De « One Medicine » à « One Health » : concept et enjeux.....	27
2. Maladies spontanées chez l'animal et contributions à la médecine translationnelle.....	28
B. Cancérologie translationnelle.....	31
1. Avantages et limites du modèle canin en cancérologie comparée.....	32
a. Avantages du modèle canin.....	32
b. Limites du modèle canin.....	34
2. Place du modèle canin dans le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses.....	36
II. Cancers du sein et tumeurs mammaires canines.....	39
A. Glande mammaire saine et tumorigénèse.....	39
1. Anatomie de la glande mammaire.....	39
a. Anatomie topographique.....	39
b. Drainage lymphatique.....	39
c. Structure de la glande mammaire	41
2. Histologie de la glande mammaire.....	42
3. Développement au cours de la vie et contrôle hormonal.....	43
a. De l'étape embryonnaire et fœtale à la puberté.....	43
b. Au cours du cycle menstruel/oestral	44
c. En période de gestation et de lactation.....	44
d. A la ménopause.....	44
4. Stades du développement tumoral mammaire.....	45
B. Généralités sur les cancers du sein et tumeurs mammaires canines.....	48
1. Incidence/épidémiologie.....	48
2. Facteurs de risque.....	49
a. Age.....	49
b. Exposition aux hormones.....	49

c.	Prédispositions génétiques et antécédents familiaux de cancer du sein.....	50
d.	Prédispositions raciales.....	51
e.	Antécédents personnels de maladie.....	51
f.	Facteurs de risque liés au mode de vie.....	52
g.	Expression de COX-2.....	52
C.	Diagnostic et facteurs pronostics.....	53
1.	Démarche clinique.....	53
a.	Dépistage.....	53
b.	Suspicion clinique.....	54
i.	Signes et présentation cliniques.....	54
ii.	Cas particuliers : Carcinome mammaire inflammatoire.....	55
2.	Evaluation du stade clinique.....	56
a.	Stade TNM.....	56
b.	Bilan d'extension.....	58
3.	Classification histologique des tumeurs mammaires	60
a.	Classification de l'OMS/WHO.....	60
b.	Classification de Peña et Clemente.....	61
4.	Grade histopronostique.....	64
a.	Chez la femme : grading de Scarff-Bloom-Richardson (SBR).....	64
b.	Chez la chienne : grading de Peña et Clemente.....	64
5.	Classification moléculaire des cancers mammaires et expression des récepteurs hormonaux.....	65
D.	Traitements.....	67
1.	Chirurgie.....	68
2.	Radiothérapie.....	70
3.	Traitements médicaux.....	70
a.	Chimiothérapie.....	71
b.	Hormonothérapie.....	71
c.	Anti-COX2.....	71
d.	Thérapies ciblées.....	72
e.	Médecines non conventionnelles.....	72
4.	Perspectives thérapeutiques : l'immunothérapie.....	73
III.	Cellules souches	75
A.	Cellules souches normales.....	75
1.	Mise en évidence.....	75
2.	Propriétés des cellules souches normales.....	76
a.	Potentialité	76
b.	Capacité d'autorenouvellement.....	77
c.	Plasticité : différenciation et reprogrammation.....	79
d.	Phénomène de quiescence.....	80
3.	Facteurs clés de la pluripotence et de l'autorenouvellement.....	81
a.	Facteurs de transcription.....	81

b. Les voies canoniques de signalisation.....	82
B. Cellules souches cancéreuses.....	83
1. CSC et modèles de tumorigénèse.....	83
2. Propriétés des cellules souches cancéreuses.....	86
3. Origine des CSC	88
4. Relation à la niche environnementale.....	89
C. Cellules souches cancéreuses mammaires.....	90
1. Rôle dans la tumorigénèse mammaire et les métastases.....	90
2. Identification des CSC mammaires.....	92
a. Le test de formation de sphères.....	92
b. Identification des cellules au cycle cellulaire lent.....	94
c. Exclusion de colorants vitaux – side population.....	94
d. Activité enzymatique de l'aldéhyde déshydrogénase.....	94
e. Marqueurs cellulaires.....	95
f. Test fonctionnel in vitro.....	97
g. Systèmes rapporteurs de CSC.....	97
D. Implications cliniques des CSC mammaires.....	98
1. Phénomènes de résistance aux traitements.....	98
2. Valeur pronostique des marqueurs de CSC.....	99
a. CD44 ⁺ /CD24 ⁻	99
b. ALDH1.....	100
3. Thérapies anti-CSC	101
IV. Neurotrophines et récepteurs.....	103
A. Les neurotrophines et leurs précurseurs.....	103
1. Découverte des neurotrophines	104
a. Chez l'homme.....	104
b. Etat des lieux des connaissances chez le chien.....	104
2. Structure des (pro)neurotrophines.....	105
3. Rôles physiologiques des (pro)neurotrophines.....	107
a. Les neurotrophines : des facteurs de croissance multifonctionnels.....	107
b. Les proneurotrophines : plus que de simples précurseurs protéiques.....	107
B. Les récepteurs des neurotrophines.....	107
1. Récepteurs à activité tyrosine kinase : TrkA, TrkB et TrkC.....	108
a. Découverte	108
b. Structure.....	108
c. Isoformes des récepteurs Trk.....	109
i. Isoformes de TrkA.....	110
ii. Isoformes de TrkB.....	110
d. Signalisation.....	111
e. Corécepteurs des Trk : CD44 et EphA2.....	112
2. Récepteur p75 ^{NTR}	113
a. Découverte.....	113
b. Structure.....	113

c.	Différentes formes de p75 ^{NTR}	114
d.	Signalisation de p75 ^{NTR}	115
e.	Corécepteurs de p75 ^{NTR}	117
i.	Famille des Trk.....	117
ii.	Sortiline.....	118
iii.	Nogo et LINGO-1.....	118
C.	Rôles des (pro)neurotrophines et de leurs récepteurs dans le cancer.....	118
1.	Néoplasies autres que mammaires.....	118
a.	Effets pro-tumoraux.....	118
b.	Effets anti-tumoraux.....	119
2.	Rôles dans le cancer du sein.....	121
3.	Rôle des neurotrophines sur les CSC.....	122
4.	Potentialités thérapeutiques : inhibiteurs de Trk.....	122
	Objectifs de la thèse.....	123
	Matériels et méthodes.....	127
I.	Culture cellulaire.....	129
A.	Lignées cellulaires.....	129
B.	Conditions de culture et de conservation.....	129
1.	Milieus de culture.....	129
2.	Entretien des cultures.....	130
C.	Traitements des cellules par les neurotrophines.....	133
1.	Molécules utilisées pour les traitements.....	133
2.	Types de traitement.....	133
a.	Traitement continu.....	133
b.	Pré-traitement.....	134
II.	Transfections cellulaires.....	135
A.	Expériences d'ARN interférence.....	135
1.	Reconstitution des siRNA.....	135
2.	Protocole de transfection.....	136
B.	Création des clones stables MDA-MB-231pNanog-mNeptune et pNanog-GFP.....	137
1.	Méthode de création des vecteurs.....	137
2.	Vecteurs utilisés.....	139
3.	Nucléofection en lignée cancéreuse de sein et sélection.....	140
III.	Analyse transcriptomique.....	140
A.	Extraction des ARN totaux.....	141
B.	Transcription inverse des ARN.....	141
C.	PCR quantitative (qPCR).....	141
1.	Protocole de qPCR.....	142
2.	Interprétation des données.....	143
IV.	Analyse protéique.....	143
A.	Extraction des protéines en condition dénaturante.....	143

1.	Extraction protéique.....	143
2.	Dosage des protéines.....	144
B.	Protein arrays.....	144
1.	Principe.....	144
2.	Kits utilisés.....	146
C.	Protocoles.....	147
1.	Conditions testées.....	147
2.	Principe d'utilisation des membranes.....	147
D.	Méthode de quantification.....	149
V.	Formation des mammosphères.....	150
A.	Composition du milieu sphère.....	150
B.	Formation de mammosphères en milieu sans ancrage.....	150
1.	Dilutions successives.....	151
2.	Une cellule par puits.....	152
3.	Sur plusieurs générations.....	153
4.	Dans du Matrigel.....	153
VI.	Test de clonogénicité.....	154
A.	En milieu 10% SVF.....	154
B.	Croissance en agar mou.....	154
VII.	Test Aldefluor.....	155
VIII.	Immunomarquage des CSC dans les lignées cancéreuses.....	155
A.	Anticorps utilisés.....	156
B.	Double marquage CD44/CD24.....	156
C.	Marquage CD133.....	156
D.	Marquage CD49f.....	157
IX.	Immunomarquage des coupes de tumeurs.....	158
A.	Origine des tissus canins et sélection des cas.....	158
1.	Tissus de tumeurs mammaires canines.....	158
2.	Tissus contrôles : amygdales et cervelet.....	158
B.	Immunohistochimie.....	159
1.	Anticorps utilisés.....	159
2.	Immunomarquages.....	159
C.	Evaluation des marquages.....	165
D.	Notion de composants.....	169
E.	Corrélation à la survie.....	169
X.	Analyses statistiques.....	170
A.	Analyses des données <i>in vitro</i>	170
B.	Analyses des données obtenues dans le modèle canin.....	170

Résultats.....	172
Partie 1 : Modalités d'enrichissement en CSC.....	175
I. Expression des neurotrophines et leurs récepteurs dans différentes lignées cellulaires.....	176
II. Effets des différentes (pro)neurotrophines sur les lignées cellulaires.....	176
A. Effet sur la formation des sphères.....	176
1. Détermination des doses les plus efficaces.....	176
2. Capacité des lignées cellulaires à former des sphères.....	177
a. En pré-traitement.....	177
b. En traitement continu.....	182
B. Effet sur les marqueurs de CSC.....	187
1. Test Aldefluor.....	187
2. Marquage CD44 ⁺ /CD24 ⁻	190
3. Marquage CD133.....	191
4. Marquage CD49f.....	192
III. Modèles cellulaires pour l'isolement des CSC.....	193
A. MDA-MB-231 pNanog-mNeptune.....	193
B. MDA-MB-231 pNanog-GFP.....	195
Partie 2 : Voies de transduction impliquées dans l'enrichissement en CSC.....	200
I. Etude de l'implication des récepteurs des neurotrophines.....	200
II. Etude des voies de signalisation activées.....	201
A. Etude des facteurs de pluripotence modulés en population totale.....	201
B. Résultats des Protein Arrays.....	202
Partie 3 : Marqueurs de CSC, neurotrophines et récepteurs dans le modèle canin.....	204
I. Caractérisation des tumeurs et de la cohorte canine.....	204
II. Etude des marqueurs de CSC (CD44 et CD24).....	205
A. Résultats IHC.....	205
1. Expression de CD44.....	205
2. Expression de CD24.....	209
3. Expression de CD44 ⁺ /CD24 ⁻	211
4. Expression de CD44 ⁻ /CD24 ⁺	214
5. Expression de CD44 ⁺ /CD24 ⁺ et CD44 ⁻ /CD24 ⁻	216
B. Mise en relation des données IHC et de la survie.....	216
III. Etude de l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs.....	221
A. Résultats IHC.....	221
1. Expression du proNGF et du BDNF.....	221
2. Expression de TrkA.....	225
3. Expression de TrkB.....	227

4. Expression du récepteur commun aux neurotrophines : p75 ^{NTR}	230
B. Etude des colocalisations entre (pro)neurotrophines et récepteurs.....	232
C. Mise en relation des données IHC et de la survie.....	233
Discussion.....	237
I. Etude des CSC dans les lignées cancéreuses de sein <i>in vitro</i> : comment les identifier avec certitude ?	239
A. Tests fonctionnels <i>in vitro</i> , test Aldefluor et marqueurs cellulaires : des méthodes fiables pour identifier les CSC ?.....	239
B. L'isolement d'une population enrichie en CSC : un préalable indispensable à leur étude ?.....	241
C. Etude de l'effet des neurotrophines sur la population de CSC : sous quelles conditions ?.....	243
II. Le modèle canin de carcinogénèse mammaire spontanée tient-il toutes ses promesses ?.....	244
A. Le phénotype CD44 ⁺ /CD24 ⁻ : marqueur de CSC ?.....	244
B. Expression des neurotrophines et de leurs récepteurs : des premières données cohérentes avec l'homme ?.....	248
C. Les limites du modèle canin et quelques pistes pour y remédier.....	252
Bibliographie.....	255
Annexe : Données individuelles.....	295

LISTE DES FIGURES

- Figure 1. Le concept OneHealth : une approche holistique, transdisciplinaire et multisectorielle de la santé.
- Figure 2. Tumeurs spontanées chez les animaux domestiques comme modèles prédictifs des cancers humains : utilisation et pertinence dans les essais cliniques.
- Figure 3. Anatomie topographique A. Des seins chez la femme. B. Des mamelles chez la chienne.
- Figure 4. Drainage lymphatique du sein chez la femme.
- Figure 5. Structure de la glande mammaire chez la femme.
- Figure 6. A. Représentation schématique des lobes, lobules et UTDL de la glande mammaire chez la femme et la chienne. B. Coupes histologiques de tissu mammaire canin sain, à l'échelle d'un lobule (à gauche) ou des acini mammaires (à droite).
- Figure 7. Les différentes étapes de la cascade métastatique.
- Figure 8. Continuum entre tissu mammaire sain, lésions précancéreuses et lésions malignes.
- Figure 9. Exemples de tumeurs mammaires canines.
- Figure 10. A. Signes cliniques d'un CMI chez la femme : inflammation, peau d'orange et éversion du mamelon. B. CMI en M5 chez une chienne.
- Figure 11. Comparaison de l'établissement des stades TNM chez la femme et chez la chienne.
- Figure 12. Coupes histologiques de NL inguinaux canins après exérèse chirurgicale d'une tumeur mammaire.
- Figure 13. Exemples de bilans d'extensions objectivant des métastases de tumeurs mammaires canines.
- Figure 14. Tumeurs mammaires canines complexes et mixtes.
- Figure 15. Grading de Peña et Clemente et valeur pronostique chez la chienne.
- Figure 16. Classification moléculaire des cancers du sein.
- Figure 17. Analyse des marges d'exérèse chirurgicale de tumeurs mammaires canines.
- Figure 18. Evolution des cellules souches entre potentialité et différenciation.
- Figure 19. Auto-renouvellement des cellules souches par division symétrique ou asymétrique.
- Figure 20. Plasticité des cellules souches, transdifférenciation et reprogrammation.
- Figure 21. Les voies de signalisation canoniques.
- Figure 22. Modèle stochastique de développement tumoral.
- Figure 23. Modèle hiérarchique de développement tumoral.
- Figure 24. Modèle mixte alliant évolution clonale et CSC.
- Figure 25. Caractéristiques communes aux cellules souches normales et cancéreuses et fonctionnalités de ces deux types de cellules souches.
- Figure 26. Marqueurs moléculaires associés à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).
- Figure 27. Interactions entre les CSC et les composants de la niche cellulaire.
- Figure 28. Schéma de la différenciation épithéliale mammaire normale et tumorale.
- Figure 29. Principe du test de mammosphères.
- Figure 30. Principe du test *in vivo* en dilution limite.
- Figure 31. Comparaison de deux stratégies thérapeutiques : stratégie conventionnelle et thérapie ciblant les CSC.
- Figure 32. Membres de la famille des neurotrophines et leurs récepteurs.
- Figure 33. Composition des préproneurotrophines.
- Figure 34. Synthèse des neurotrophines.
- Figure 35. Structure du proNGF
- Figure 36. Représentation schématique des récepteurs Trk.

Figure 37. Signalisation des récepteurs Trk.

Figure 38. Structure du récepteur p75^{NTR}.

Figure 39. Les différentes formes du récepteur p75^{NTR}.

Figure 40. Signalisation du récepteur p75^{NTR}.

Figure 41. Formation du complexe p75^{NTR}/Trk.

Figure 42. Signalisation du complexe p75^{NTR}/sortiline.

Figure 43. Aspect des différentes lignées cellulaires utilisées en culture d'entretien.

Figure 44. Schéma expérimental du traitement continu par les neurotrophines, suivi d'un test de formation de sphères.

Figure 45. Schéma expérimental du pré-traitement par les neurotrophines, suivi d'un test de formation de sphères.

Figure 46. Représentation schématique des étapes de construction d'un vecteur avec la technologie e-Zyvec.

Figure 47. Structure des vecteurs pNanog-mNeptune.

Figure 48. Principe des Proteome ProfilerTM Antibody Arrays.

Figure 49. Exemple de quantification sur une membrane de nitrocellulose du kit Human Phospho-RTK array.

Figure 50. Représentation schématique du test de mammosphères en dilutions successives.

Figure 51. Amygdales, chien. Marquage IHC de CD44 et CD24 seuls ou en combinaison. Le marquage par CD44 apparaît en marron, le marquage par CD24 en violet.

Figure 52. A à E. Cervelet, chien. Marquage IHC des anticorps anti-proNGF (A), BDNF (B), TrkA(C), TrkB (D) et p75^{NTR}(E). F. Tumeur mammaire canine. L'anticorps anti-p75^{NTR} marque une fibre nerveuse, qui peut être utilisée comme contrôle positif.

Figure 53. Amygdales, chien. Marquages IHC de l'anticorps de rat monoclonal IgG1,κ et de l'anticorps lapin polyclonal IgG, contrôles isotypiques des anticorps anti-CD44 et CD24 respectivement.

Figure 54. A à E. Cervelet, chien. Marquages IHC de l'anticorps de rat monoclonal IgG1,κ (contrôle isotypique de l'anticorps anti-p75^{NTR}), de l'anticorps de lapin monoclonal IgG (contrôle isotypique de l'anticorps anti-BDNF et anti-TrkB) et de l'anticorps de lapin monoclonal IgG (contrôle isotypique de l'anticorps anti-proNGF et anti-TrkA). F. Tumeur mammaire maligne, chien. Contrôle négatif, sans anticorps primaire, du marquage par TrkB.

Figure 55. Système d'amplification DISCOVERY HQ-HRP detection kit utilisé pour TrkB.

Figure 56. Tumeurs mammaires malignes, chien. Immunohistochimie pour CD44/CD24. Exemples de gamme d'intensité (marquage faible, modéré ou fort). Le marquage par CD44 apparaît en marron, le marquage par CD24 en violet.

Figure 57. Tumeurs mammaires malignes, chien. Immunohistochimie pour le proNGF et le BDNF. Exemples de gamme d'intensité (marquage faible, modéré ou fort). Les marquages par proNGF et BDNF apparaissent en marron.

Figure 58. Tumeurs mammaires malignes, chien. Immunohistochimie pour les récepteurs des neurotrophines TrkB, TrkA et p75^{NTR}. Exemples de gamme d'intensité (marquage faible, modéré ou fort). Le marquage par TrkB apparaît en violet, les marquages par TrkA et p75^{NTR} apparaissent en marron.

Figure 59. Expression des (pro)neurotrophines et de leurs récepteurs (A) ou co-récepteurs (B) dans différentes lignées cellulaires cancéreuses de sein : luminales A (MCF-7 et T-47D), luminale B (BT-474), surexprimant HER2 (HCC1954) ou triple négatives basal-like (MDA-MB-231, SUM-159PT et HCC70).

Figure 60. Détermination de la dose optimale à utiliser pour chaque (pro)neurotrophine (NGF, proNGF, BDNF, proBDNF) dans les expériences de formation des mammosphères en traitement continu pour la lignée MCF-7.

Figure 61. Photographies représentatives des sphères formées en pré-traitement par l'EGF/bFGF après 8 jours de culture dans la lignée T-47D.

Figure 62. Photographies représentatives des sphères formées en pré-traitement par le NGF 1nM après 8 jours de culture dans la lignée BT-474.

Figure 63. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée HCC1954 en pré-traitement.

Figure 64. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée MCF-7 en pré-traitement.

Figure 65. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée HCC70 en pré-traitement.

Figure 66. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée MDA-MB-231 en pré-traitement.

Figure 67 : Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée BT-20 en pré-traitement.

Figure 68. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée SUM-159PT en pré-traitement.

Figure 69. Photographies représentatives des sphères formées en traitement continu par le proNGF 0,25nM après 7 jours de culture dans la lignée BT-474.

Figure 70. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée HCC1954 en traitement continu.

Figure 71. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée MCF-7 en traitement continu.

Figure 72. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée HCC70 en traitement continu.

Figure 73. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée MDA-MB-231 en traitement continu.

Figure 74. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée SUM-159PT en traitement continu.

Figure 75. Test Aldefluor sur les lignées MCF-7, MDA-MB-231 et SUM-159PT en monocouche, non traitées aux neurotrophines.

Figure 76. Test Aldefluor sur la lignée MCF-7 après 48h de traitement aux neurotrophines.

Figure 77. Double marquage CD44/CD24 sur la lignée MCF-7 après 48h de traitement aux neurotrophines en culture en monocouche.

Figure 78. Cellules non marquées, cellules marquées par l'isotype contrôle et cellules marquées avec l'anticorps CD133-PE dans la lignée DIPG013 et dans la lignée MDA-MB-231 cultivée dans un milieu à 1% ou 10% de SVF.

Figure 79. Marquage par CD49f dans la lignée MDA-MB-231 : Cellules non marquées, cellules marquées par l'isotype contrôle et cellules marquées avec l'anticorps CD49f-FITC.

Figure 80. Deuxième tri cellulaire réalisé sur les MDA-MB-231 pNanogB6-mNeptune.

Figure 81. Décroissance de fluorescence des cellules MDA-MB-231 pNanogB6-mNeptune^{high} au cours du temps après le 1^{er} tri cellulaire (N1) et le 2^{ème} tri cellulaire (N2).

Figure 82. Autofluorescence des cellules de la lignée MDA-MB-231 dans l'APC.

Figure 83. Tri des MDA-MB-231 pNanogB7-GFP après 14 jours de sélection par la généticine.

Figure 84. Evaluation de la fluorescence des MDA-MB-231 pNanogB7-GFP par microscopie (48h après tri cellulaire).

Figure 85. Fluorescence des cellules MDA-MB-231 non nucléofectées, nucléofectées avec le vecteur vide ou nucléofectées avec le vecteur pNanogB7-GFP, 4 jours après tri.

Figure 86. Sphères observées en microscopie optique ou de fluorescence dans les populations MDA-MB-231 pNanogB7-GFP neg, MDA-MB-231 pNanogB7-GFP faible et MDA-MB-231 pNanogB7-GFP fort.

Figure 87. Observation en photographie optique et de fluorescence de clones de MDA-MB-231 pNanogB7-GFP formés en Matrigel.

Figure 88. Quantification de l'expression des facteurs de pluripotence Oct-3/4, Sox 2, Nanog et Klf-4 dans les différentes populations de MDA-MB-231 : différence relative par rapport à la population B7-neg.

Figure 89. Test de formation de mammosphères après 7 jours de traitement continu au NGF (16 nM) et proNGF (0,5 nM) après inhibition de p75^{NTR}, TrkA et EphA2 dans la lignée MCF-7.

Figure 90. Tumeurs mammaires malignes, chien. Immunohistochimie pour CD44/CD24. Exemples d'immunomarquage avec CD44. A. Sur la partie basolatérale des cellules dans une structure tubulaire. B. Sur toute la membrane cellulaire dans des cellules anaplasiques. Marquage aspécifique cytoplasmique de CD44 sur une cellule néoplasique avec une caryomégalie majeure.

Figures 91. Tumeurs mammaires malignes, chien. Immunohistochimie pour CD44/CD24. Exemples d'immunomarquage avec CD24. A. Carcinome solide, marquage CD24 cytoplasmique. B. Carcinome tubulaire simple, marquage CD24 sur la membrane apicale des cellules tumorales luminales.

Figure 92. Tumeurs mammaires malignes, chien. Immunohistochimie pour CD44/CD24. Exemples d'immunomarquages avec le phénotype CD44⁺/CD24⁻.

Figure 93. Tumeurs mammaires malignes, chien. Immunohistochimie pour CD44/CD24. Exemples d'immunomarquages avec le phénotype CD44⁻/CD24⁺.

Figure 94. Tumeurs mammaires malignes, chien. Immunohistochimie pour CD44/CD24. Exemples d'immunomarquages avec le phénotype CD44⁺/CD24⁺.

Figure 95. Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des 86 chiennes au cours du temps, en fonction de CD44⁺/CD24⁻.

Figures 96. Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des 86 chiennes au cours du temps, en fonction de CD44⁻/CD24⁺.

Figure 97. Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des 39 chiennes faisant partie du groupe de mauvais pronostic (grades 3 et CMI) au cours du temps, en fonction de CD44⁺/CD24⁻.

Figure 98. Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des 39 chiennes faisant partie du groupe de mauvais pronostic (grades 3 et CMI) au cours du temps, en fonction de CD44⁻/CD24⁺.

Figure 99. Tumeurs mammaires malignes, chien. Exemples d'immunomarquages avec le proNGF et le BDNF.

Figure 100. Tumeurs mammaires malignes, chien. Exemples d'immunomarquages par TrkA.

Figure 101. Tumeurs mammaires malignes, chien. Exemples d'immunomarquages par TrkB.

Figure 102. Tumeurs mammaires malignes, chien. Exemples d'immunomarquages par p75^{NTR}.

Figure 103. Représentation graphique des colocalisations entre deux marqueurs (neurotrophines ou récepteurs).

Figure 104. Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des 86 chiennes au cours du temps, en fonction de l'expression ou non de TrkB.

Figure 105. Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des 86 chiennes au cours du temps, en fonction de l'expression ou non de p75^{NTR}.

Figure 106. Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des 39 chiennes incluses dans le groupe de mauvais pronostic (grades 3 et CMI) au cours du temps, en fonction de TrkB.

Figure 107. Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des 39 chiennes incluses dans le groupe de mauvais pronostic (grades 3 et CMI) au cours du temps, en fonction de p75^{NTR}.

Figure 108. Les niveaux de preuve en oncologie vétérinaire.

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1. Exemples de maladies humaines et leurs équivalents chez les animaux domestiques, hors cancers.
- Tableau 2. Avantages et limites du modèle canin.
- Tableau 3. Drainage lymphatique normal et néoplasique dans les glandes mammaires de la chienne.
- Tableau 4. Classification histologique des tumeurs mammaires.
- Tableau 5. Type histologique et pronostic dans les tumeurs mammaires canines.
- Tableau 6. Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées.
- Tableau 7. Milieux de culture utilisés pour l'entretien des cellules ou entrant dans la composition de milieux définis.
- Tableau 8. Suppléments utilisés pour l'entretien des cellules ou dans la composition de milieux définis.
- Tableau 9. Composition des milieux de culture pour l'entretien des lignées cellulaires.
- Tableau 10. (Pro)neurotrophines utilisées pour le traitement des cellules.
- Tableau 11. Séquences des siRNA utilisés pour les expériences d'ARN interférence.
- Tableau 12. Séquences des différentes amorces utilisées lors des réactions de PCR quantitatives.
- Tableau 13. Tampon de lyse pour protéines membranaires.
- Tableau 14. Composition du milieu défini pour le test de mammosphères.
- Tableau 15. Anticorps utilisés pour l'immunomarquage des CSC dans les lignées cancéreuses mammaires.
- Tableau 16. Anticorps isotypiques contrôles utilisés pour l'immunomarquage des CSC dans les lignées cancéreuses mammaires.
- Tableau 17. Anticorps utilisés pour les marquages IHC sur tumeurs mammaires canines.
- Tableau 18. Anticorps isotypiques utilisés sur tumeurs mammaires canines.
- Tableau 19. Correspondance entre le diagnostic morphologique et le type histologique des tumeurs mammaires canines malignes.
- Tableau 20. Correspondance entre le type histologique et le grade des échantillons de la cohorte.
- Tableau 21. Expression et score de marquage de CD44 en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques.
- Tableau 22. Expression et score de marquage de CD24 en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques.
- Tableau 23. Expression et proportion de cellules marquées par le phénotype CD44⁺/CD24⁻ en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques.
- Tableau 24. Expression et proportion de cellules marquées par le phénotype CD44⁻/CD24⁺ en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques.
- Tableau 25. Expression et score de marquage par le proNGF en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques.
- Tableau 26. Expression et score de marquage par le BDNF en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques.
- Tableau 27. Expression et score de marquage par TrkA en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques.
- Tableau 28. Expression et score de marquage par TrkB en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques.
- Tableau 29. Expression et score de marquage de p75^{NTR} en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques.

Introduction

I. Le chien comme modèle d'étude des pathologies humaines

A. Médecine translationnelle

1. De « One Medicine » à « One Health » : concept et enjeux

Le concept « One Medicine » préconise une combinaison des médecines humaine et vétérinaire. Son origine est associée à Rudolf Virchow, médecin et pathologiste allemand du 19^e siècle (Cardiff et al, 2008). Fils de boucher, Virchow a élucidé le cycle du parasite helminthe *Trichinella spiralis*, donnant lieu à une maladie équivalente chez le porc et l'homme : la trichinose. En comprenant que le mécanisme d'infection de l'homme passait par l'ingestion de viande de porc mal cuite, Virchow a montré le lien existant entre les maladies des hommes et des animaux. Il a ainsi introduit en 1855 le terme de « zoonose » pour désigner les maladies infectieuses transmissibles entre l'homme et animal, et a affirmé qu'entre la médecine humaine et animale il n'y avait pas et ne devait pas y avoir de frontière (Klauder, 1958 ; Saunders et al, 2000). Le concept a été repris par le médecin et pathologiste canadien sir William Osler dans les années 1870 puis par James Steele qui a créé le département de santé publique vétérinaire au Communicable Diseases Center (CDC) des États-Unis en 1947 (Cardiff et al, 2008 ; Gyles, 2016). En 1984, Calvin Schwabe a formalisé le terme One medicine dans la 3^{ème} édition de « Veterinary medicine and human health » (Schwabe, 1984).

Le concept a évolué en « One World – One Health – One Medicine » en 2004, année où la grippe aviaire H5N1 provoquait une inquiétude mondiale (Gibbs, 2014). La Wildlife Conservation Society (WCS) a rassemblé des experts de la santé venant du monde entier à l'université Rockefeller de New York. Au cours de cette conférence, 12 recommandations ont été listées, connues aujourd'hui comme les Principes de Manhattan, pour établir une approche plus holistique de la prévention des maladies épidémiques et du maintien de l'intégrité des écosystèmes (Figure 1) (Gibbs, 2014). En 2006, un médecin et un vétérinaire ont cofondé l'organisme One Health Initiative dans le but de promouvoir le concept One Health à l'échelle internationale par l'éducation et la sensibilisation (Sundberg et al, 2009).

L'augmentation de la population mondiale, l'industrialisation, les problèmes géopolitiques génèrent des perturbations à l'échelle planétaire : changement climatique,

dommages aux écosystèmes et mouvements rapides de populations et d'espèces animales. Ces changements environnementaux rapides conduisent à l'émergence ou à la réémergence de maladies infectieuses ou non infectieuses (Destoumieux-Garzón et al, 2018). Les éclosions récentes de zoonoses, comme l'infection par le SRAS (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère) en 2003, le virus Ébola en 2014 ou le virus Zika en 2016 ont mis en lumière l'importance du concept One Health (Gyles, 2016 ; Gibbs, 2014). Un autre défi mondial est la résistance bactérienne aux antibiotiques, qui cause la mort de plus de 700.000 personnes chaque année dans le monde, nombre qui pourrait monter à 10 millions d'ici 2050 si rien n'est fait (O'Neill, 2016).

Dans ce contexte, la profession vétérinaire, en association avec la médecine humaine et les instituts de recherche fondamentale, peuvent et doivent jouer un rôle dans le développement d'une approche « One World – One Health – One Medecine ».

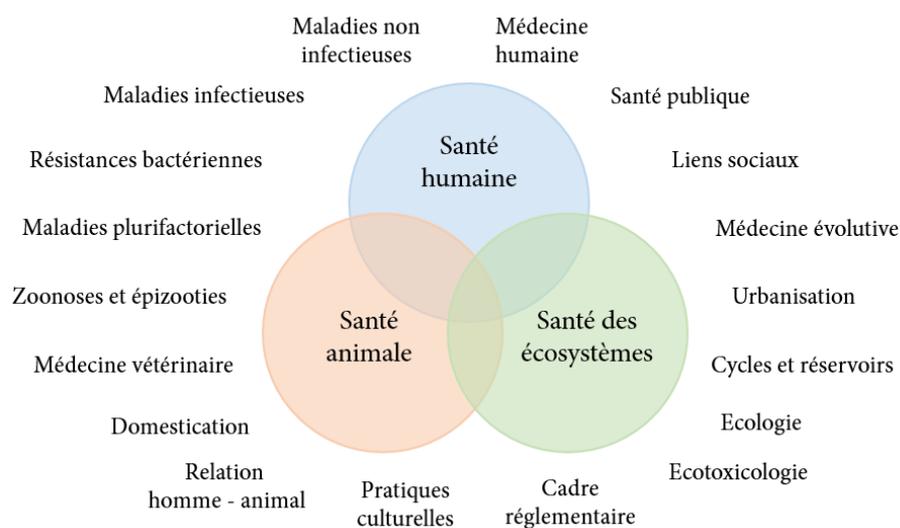


Figure 1. Le concept OneHealth : une approche holistique, transdisciplinaire et multisectorielle de la santé. La santé animale, humaine et la santé des écosystèmes sont liés et interdépendants (d'après Destoumieux-Garzón et al, 2018).

2. Maladies spontanées chez l'animal et contributions à la médecine translationnelle

La recherche translationnelle a pour objectif de faire le lien entre la recherche fondamentale et préclinique et les applications cliniques, chez l'homme et chez l'animal.

Les rongeurs sont les principaux animaux d'expérimentation utilisés pour la recherche médicale. Les souris sont de petite taille, faciles à élever et entretenir, et ont un temps de

gestation court, ce qui en fait un modèle d'étude relativement économique. Néanmoins, ces modèles ne permettent d'étudier qu'un processus spécifique, sans recréer l'image physiologique globale d'une maladie (Mak et al, 2014). Par ailleurs, les rongeurs de laboratoire sont hautement consanguins, souvent génétiquement modifiés et placés dans des environnements régulés, contrairement aux hommes qui ont une variabilité génétique, des régimes alimentaires et modes de vie variés (Kol et al, 2015).

Les limites du modèle murin peuvent expliquer le très faible taux de succès des essais cliniques. Sur un échantillonnage de 2562 essais cliniques, tous domaines pharmacologiques confondus, seuls 2,4% (61/2562) des essais cliniques passaient de la phase I à la mise sur le marché (Dahlin et al, 2016). Ce constat remet en cause les modèles précliniques actuels et nous questionne sur les alternatives possibles.

Afin d'améliorer la prédictibilité des essais cliniques chez l'homme, les informations obtenues grâce aux modèles murins doivent être complétées par des modèles physiologiques représentatifs de la clinique, comme les maladies spontanées observées chez nos animaux domestiques, qu'ils soient des animaux de compagnie (chats, chiens, rongeurs, lapins,...) ou des animaux de production (chevaux, bovins, ovins, caprins,...) (Tableau 1) (Decker et al, 2017).

Catégorie de maladie ou système organique concerné	Maladie spécifique	Espèces présentant une maladie spontanée équivalente
Musculosquelettique	Arthrose Lésions tendineuses Lésions des ligaments croisés Reconstruction mandibulaire	Chiens, chevaux, lapins Chevaux Chiens Chiens
Lésions médullaires	Hernie au niveau des disques intervertébraux Lésions du tube neural	Chiens Chiens
Génétiques	Hémophilie Narcolepsie Immunodéficience combinée sévère liée au chromosome X Fente palatine Dystrophie musculaire de Duchenne Maladie de stockage lysosomale Maladies squelettiques	Chiens Chiens Chiens, chevaux Chiens Chiens Chiens, chats, vaches, chèvres, moutons Chevaux
Yeux	Kératoconjonctivite sèche	Chiens
Immunitaire ou inflammatoire	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin Gingivostomatite chronique	Chiens, chats Chats
Cardiovasculaire	Cardiomyopathie dilatée Cardiomyopathie hypertrophique Cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène	Chiens Chats Chiens

Tableau 1. Exemples de maladies humaines et leurs équivalents chez les animaux domestiques, hors cancers (d'après Kol et al, 2015).

Les animaux de compagnie partagent le même environnement que leurs propriétaires et peuvent servir de sentinelles épidémiologiques ou étiologiques lors de contamination environnementale (eau, air, alimentation). Ces études épidémiologiques sont exemptes de certains biais rencontrés chez l'homme : risques professionnels ou conduites à risque (tabagisme actif, alcool) (Backer et al, 2011).

Les chiens ont une espérance de vie plus courte que l'homme : elle est de 6-7 ans pour les plus grandes races (Irish Wolfhound) à 16 ans pour les petites races (caniches), avec un processus de vieillissement cinq à sept fois plus rapide que l'homme (Greer et al, 2007; Bonnett et al, 2010; Fleming et al, 2011). Les périodes de latence pour le développement de certaines maladies sont donc plus courtes.

L'élucidation du génome canin, sa ressemblance avec le génome humain et la découverte de plus de 2 millions de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) permettent une étude comparative au niveau génomique (Lindblad-Toh et al, 2005). La pression de sélection imposée par l'homme depuis des milliers d'années a résulté en l'apparition de races, formant des groupes génétiquement semblables en leur sein, mais très distincts entre eux. Le chien est ainsi l'une des espèces les plus phénotypiquement variables, le poids d'un chien pouvant varier d'un facteur 40 : 2kgs pour un Chihuahua et 80kgs pour un dogue allemand (Wayne et al, 1999). Certaines races présentent des prédispositions génétiques à des maladies, ce qui permet de simplifier l'identification des signatures génétiques en cause. Le projet LUPA, initié en 2008 par la Commission Européenne, a pour objectif de promouvoir l'utilisation du chien pour l'étude de certaines maladies complexes chez l'homme. Il cible les maladies cardiovasculaires, inflammatoires, neurologiques, monogéniques et les cancers. Des cohortes canines ont déjà été rassemblées pour plus de 20 maladies. Le consortium a développé un puce ADN à haute densité portant 172.000 marqueurs SNP, qui a déjà permis d'identifier des mutations pour 4 maladies monogéniques et leurs équivalents chez l'homme (Lequarré et al, 2011).

Les chiens sont des modèles du vieillissement et des maladies chroniques, les deux étant souvent liées (Hoffmann et al, 2018). Le dysfonctionnement cognitif des chiens âgés serait lié à l'accumulation dans le cerveau d'un peptide bêta-amyloïde similaire à celui retrouvé dans la maladie d'Alzheimer (Head, 2011). Les maladies rénales chroniques (Cianciolo et al, 2016), des

maladies endocriniennes comme la maladie de Cushing (de Bruin et al, 2009) ou le diabète (Fall et al, 2007), mais aussi l'obésité se retrouvent avec des niveaux de prévalence comparables chez l'homme et le chien (Osto et al, 2015). Les chiens sont également des modèles de maladies neurologiques ou musculosquelettiques : dystrophinopathies, épilepsie, spondyloses et maladies du disque intervertébral chez les boxers (Kornegay et al, 2014 ; Patterson et al, 2014 ; Kranenburg et al, 2014).

B. Cancérologie translationnelle

Chaque année, un cancer est diagnostiqué chez 14,1 millions de personnes et entraîne le décès de 8,2 millions de personnes dans le monde (Ferlay et al, 2015). Le développement des outils diagnostiques et thérapeutiques ainsi qu'une meilleure prévention ont permis de diminuer de 26 % le taux de mortalité par cancer entre 1991 et 2015 (Siegel et al, 2018). Cependant, en dépit des 107 milliards de dollars du marché de l'oncologie, le développement de médicaments anticancéreux se heurte toujours à un taux d'approbation peu élevé : 6,7 % (Hay et al, 2014). Même si les études sur modèles murins ont permis de faire des progrès considérables dans la recherche sur le cancer, les cancers spontanés des animaux domestiques représentent une opportunité de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques en cancérologie humaine (Ranieri et al, 2013 ; Gardner et al, 2016). Chez nos animaux de compagnie, l'incidence réelle du cancer n'est pas connue. En se basant sur des études nécropsiques, on estime que 45% des chiens de 10 ans ou plus meurent de cancer. Sans ajustement par l'âge, 23% des chiens meurent de cancer (Bronson, 1982). Le cancer serait la première cause de décès par maladie à la fois chez les chiens (47%) et chez les chats (32%) (Animal Health Survey, 1998 et 2005).

En 2003, le National Cancer Institute (NCI) a initié un programme d'oncologie comparée dans le but de favoriser les études sur les cancers spontanés des animaux de compagnie, les chiens en particulier, pour documenter les essais cliniques chez l'homme. A cette époque, peu d'études ont été menées à cause du financement limité par les firmes pharmaceutiques qui ne reconnaissaient pas les similitudes entre les cancers des chiens et des hommes (Paoloni et al, 2007 ; Leblanc et al, 2015 ; Gordon et al, 2009). Depuis, de nombreuses

initiatives ont été menées pour comparer les tumeurs spontanées chez l'animal et l'homme (Riccardo et al, 2015). Au sein de l'initiative LUPA décrite plus haut, les cancers particulièrement étudiés sont les tumeurs mammaires, les mélanomes, les sarcomes des tissus mous et les mastocytomes (Lequarré et al, 2011). En 2017, le NCI a versé un fond de subvention significatif pour supporter des études cliniques utilisant de l'immunothérapie et de nouvelles combinaisons de traitements (immunomodulateurs, thérapies ciblées, chimiothérapie, radiothérapie), associées à des études fondamentales visant à comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui déterminent la réponse ou la non-réponse tumorale chez des chiens présentant une tumeur spontanée (Department of health and human services, 2017 ; Klingemann et al, 2018).

1. Avantages et limites du modèle canin en cancérologie comparée
 - a. Avantages du modèle canin

Les cancers canins se développent spontanément et reproduisent les étapes du développement tumoral observé chez l'homme. Le spectre des cancers rencontrés chez le chien est aussi divers que chez l'homme : ostéosarcomes, mélanomes, lymphomes non-hodgkiniens, leucémies, cancers de la prostate, tumeurs mammaires, cancer des poumons, cancers de la tête et du cou, sarcomes des tissus mous, cancers de la vessie (Withrow et McEwen, 2013). Les tumeurs spontanées chez le chien ressemblent fortement aux tumeurs humaines d'un point de vue moléculaire, morphologique et clinique, et permet d'étudier les processus d'initiation de la tumorigénèse, la progression de la maladie et la résistance aux traitements (Queiroga et al, 2011 ; Ito et al, 2014 ; Dickinson et al, 2010). Dans la majorité des cas, les cancers canins peuvent être décrits en utilisant la même terminologie et les mêmes systèmes de classifications cliniques, histologiques voire moléculaires que leurs équivalents humains, par exemple pour la classification des lymphomes (Ponce et al, 2010 ; Sayag et al, 2018) ou des tumeurs mammaires (Gama et al, 2008a ; Abadie et al, 2018 ; Nguyen et al, 2018).

Les chiens sont génétiquement non consanguins et reproduisent une hétérogénéité intratumorale et des différences interindividuelles. Certaines races présentent des

prédispositions génétiques, par exemple les Bouviers Bernois, Scottish Terriers et Rottweilers ont plus de risques de développer respectivement des sarcomes histiocytaires, des carcinomes transitionnels de la vessie et des ostéosarcomes (Davis et al, 2014 ; Nielsen et al, 2010 ; McNeill et al, 2007). Des études génomiques menées sur des Golden Retrievers ont identifié des loci associés à un risque plus élevé de lymphomes des cellules B et d'hémangiosarcomes (Tonomura et al, 2015 ; Thamm et al, 2013).

Les études épidémiologiques sur les chiens permettent d'identifier les facteurs de risque de cancers. Un lien a été établi entre les lymphomes canins et l'exposition à la fumée du tabac ou aux produits chimiques ménagers ou entre les carcinomes transitionnels de la vessie chez les Scottish Terriers et l'exposition aux herbicides (Pinello, 2017 ; Takashima-Uebelhoer et al, 2012 ; Glickman et al, 2004).

D'un point de vue clinique, les chiens ont une incidence plus élevée de certains types de cancers que les hommes. C'est le cas pour les mastocytomes, les lymphomes non-hodgkiniens ou les ostéosarcomes (Ranieri et al, 2003 ; Ito et al, 2014 ; Fenger et al, 2014). L'ostéosarcome est la tumeur maligne de l'os la plus fréquente chez les enfants et chez le chien, mais ce cancer est 10 fois plus prévalent chez le chien (Fenger et al, 2014).

En conséquence de leur durée de vie réduite, les cancers canins progressent à un rythme plus rapide, ce qui permet de déterminer plus rapidement l'issue en termes de dissémination métastatique, récurrence locale ou survie. Dans le même temps, les chiens vivent assez longtemps pour étudier les effets secondaires à long terme des traitements (Paoloni et al, 2007). Enfin, les propriétaires sont souvent d'accord pour procéder à des autopsies, permettant d'évaluer la dissémination tumorale ou la toxicité liée au traitement (Withrow et Mc Ewen, 2013).

Les chiens sont plus semblables à l'homme en termes de taille. De nombreux actes cliniques peuvent être réalisés sur des patients chiens dans le cadre d'une étude clinique (chirurgie, imagerie scanner ou IRM, biopsies répétées sous anesthésie lors des examens d'imagerie, prélèvements sanguins et tumoraux, etc.). Ils peuvent bénéficier de traitements combinés incluant la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, voire des thérapies ciblées ou de l'immunothérapie. Ils présentent par ailleurs une physiologie et un métabolisme

similaires à l'homme et ont souvent la même réponse à la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie (Paoloni et al, 2007 ; Paoloni et al, 2014).

Les chiens ont un système immunitaire intact comparé à de nombreux modèles murins, ce qui permet d'étudier les interactions complexes entre la tumeur, le micro-environnement tumoral et le système immunitaire, mais aussi d'explorer de nouvelles approches thérapeutiques en immunothérapie (Barutello et al, 2018 ; Klingemann, 2018).

Comme peu de standards de soin existent en médecine vétérinaire, il est éthiquement acceptable de tester de nouvelles formes de thérapies sur un cancer non traité plutôt que d'attendre que tous les traitements connus aient échoué, comme cela se fait fréquemment chez l'homme (Paoloni et al, 2007).

Enfin, de par l'origine spontanée des tumeurs canines et la considération du chien comme un patient à part entière, les études en oncologie comparatives suscitent moins de préoccupations éthiques auprès de l'opinion publique que les modèles murins. Les essais sur animaux domestiques sont généralement plus économiques, avec une plus grande rapidité pour récupérer les données du fait des temps de progression compressés. Le développement de groupes collaboratifs permet de réaliser des essais multicentriques à grande échelle, de créer des biobanques tumorales, et ainsi de donner plus de poids scientifique à l'oncologie comparée (Paoloni et al, 2007 ; Withrow et al, 2013).

b. Limites du modèle canin.

Conduire des essais cliniques bien contrôlés chez le chien peut s'avérer complexe si l'on considère les spécificités de races. De plus, les firmes pharmaceutiques et de biotechnologies savent que le marché des immunothérapies, plus coûteuses que les traitements standard, est limité chez le chien, et les marges de profit seront plus faibles en médecine vétérinaire (Klingemann, 2018).

Le nombre limité de réactifs spécifiques de l'espèce canine reste une difficulté à relever, particulièrement pour les études en immuno-oncologie. Le système immunitaire canin n'a pas été étudié en détail en partie à cause de la disponibilité limitée d'agents spécifiques pour

caractériser ses composants. Les sous-types de lymphocytes, l'expression et la régulation de leurs récepteurs, ou les cytokines canines sont peu connus. Ceci implique aussi qu'il n'y a pas de test prédictif dont le chien pourrait bénéficier pour tout type d'immunothérapie. De plus, les tumeurs canines ne sont pas aussi bien caractérisées que chez l'homme, ce qui peut freiner le développement d'anticorps monoclonaux ou d'autres thérapies ciblées chez le chien (Klingemann, 2018).

Certaines pathologies tumorales humaines fréquentes ont une prévalence faible chez le chien, comme le cancer de la prostate (LeRoy et al, 2009), ou sont d'évolution foudroyante, comme le cancer du pancréas (survie de 2 à 4 mois) ou certaines leucémies aiguës (survie de quelques jours pour les sous-types les plus agressifs), ce qui ne permet pas de réaliser d'essai clinique (Crozier et al, 2016 ; Roode et al, 2015).

Certains types tumoraux peuvent diverger de ceux connus chez l'homme. Par exemple, le carcinome mammaire simple canin (prolifération des cellules luminales uniquement) est histologiquement très proche du cancer du sein chez la femme, contrairement aux carcinomes mammaires complexes (prolifération des cellules luminales et myoépithéliales) qui sont fréquents chez le chien mais très rares chez la femme (Liu et al, 2014).

Enfin, cette latitude dans les essais cliniques peut être utilisée à mauvais escient pour permettre des traitements peu caractérisés ou non éthiques. Le vétérinaire a l'obligation de s'assurer que les patients chiens ne se voient pas refuser des traitements efficaces pour augmenter les inclusions dans un essai clinique et que l'innocuité des traitements novateurs a été démontrée. Les considérations éthiques à respecter dans le cadre des études cliniques sur patient chien amènent certaines restrictions dans les procédures cliniques réalisables par rapport à celles appliquées en expérimentation animale. Des études nécessitant des hospitalisations trop prolongées ou de trop nombreux examens invasifs peuvent ne pas être acceptables pour un propriétaire de chien. En cas de dégradation de l'animal, le propriétaire peut choisir l'euthanasie de son animal (Withrow et Mc Ewen, 2013 ; Rybicka et al, 2017).

Les avantages et limites du modèle canin sont regroupés dans la Tableau 2.

Avantages		Limites
✓ Etiologie et facteurs de risque	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Même environnement et risques associés ✓ Homogénéité génétique intraraciale, prédispositions raciales à certains types de cancers 	
✓ Développement tumoral	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tumeurs spontanées évoluant dans le temps ✓ Similarités anatomiques, physiologiques, histologiques et génétiques fortes ✓ Interactions complexes entre la tumeur, le micro-environnement tumoral et le système immunitaire intact ✓ Hétérogénéité intratumorale et interindividuelle ✓ Incidence plus élevée de certains types de cancers (mastocytomes, lymphomes non-hodgkiniens, ostéosarcomes) ✓ Temps de progression compressés (5 à 7 fois plus rapide) ✓ Récidives et métastases ✓ Possibilité de réaliser des autopsies 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Incidence moins élevée de certains types de cancers (prostate, pancréas) et/ou d'évolution fulgurante (pancréas, leucémies aigües) ✓ Types tumoraux parfois différents de l'homme ✓ Tumeurs peu caractérisées par rapport à l'homme (génotype, phénotype)
✓ Traitements et essais cliniques	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Taille similaire à l'homme ✓ Traitements combinés et suivi de la réponse au traitement (imagerie haute résolution, biopsies répétées) ✓ Pas de standards de soin : médicament-candidat plus facilement utilisable ✓ Réponse aux traitements standards similaires à l'homme ✓ Phénomènes de résistance aux traitements ✓ Peu de préoccupations éthiques de la part de l'opinion publique ✓ Coût et durée des essais cliniques inférieur à l'homme 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Faible connaissance du système immunitaire canin ✓ Nombre limité de réactifs ou de marqueurs biologiques ✓ Variabilité forte entre les races ✓ Coût important des essais cliniques en immunothérapie ✓ Profit des firmes pharmaceutiques limité sur le marché vétérinaire ✓ Risque de dérives non éthiques vis-à-vis des patients chiens ✓ Restrictions dans les procédures cliniques par rapport aux animaux d'expérimentation ✓ Recours possible des propriétaires à l'euthanasie si la maladie progresse

Tableau 2. Avantages et limites du modèle canin (d'après Riccardo et al, 2015 ; Klingemman, 2018).

2. Place du modèle canin dans le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses

Lors du développement d'un nouveau candidat médicament, les essais de phase I et II visent à évaluer son efficacité préliminaire, son profil PK/PD (pharmacocinétique et pharmacodynamie), et sa tolérance afin de justifier son développement ultérieur et de sélectionner la meilleure dose et le meilleur schéma thérapeutique à appliquer. Ces données initiales sont requises à la fois par la US Food and Drug Administration (FDA) et l'Agence européenne des médicaments (EMA) (Paoloni et al, 2007 ; Rybicka et al, 2017).

Les études comparatives chez le chien permettent de prévoir au mieux le comportement d'un candidat-médicament lors des phases de tests précoces *in vivo*, en particulier en termes de dose initiale, de schéma thérapeutique, d'efficacité, de potentiels effets secondaires d'un candidat-médicament ou encore de la mise en évidence de biomarqueurs, et peuvent aider à optimiser le design d'un essai clinique chez l'homme (cf. Figure 2) (Rybicka et al, 2017).

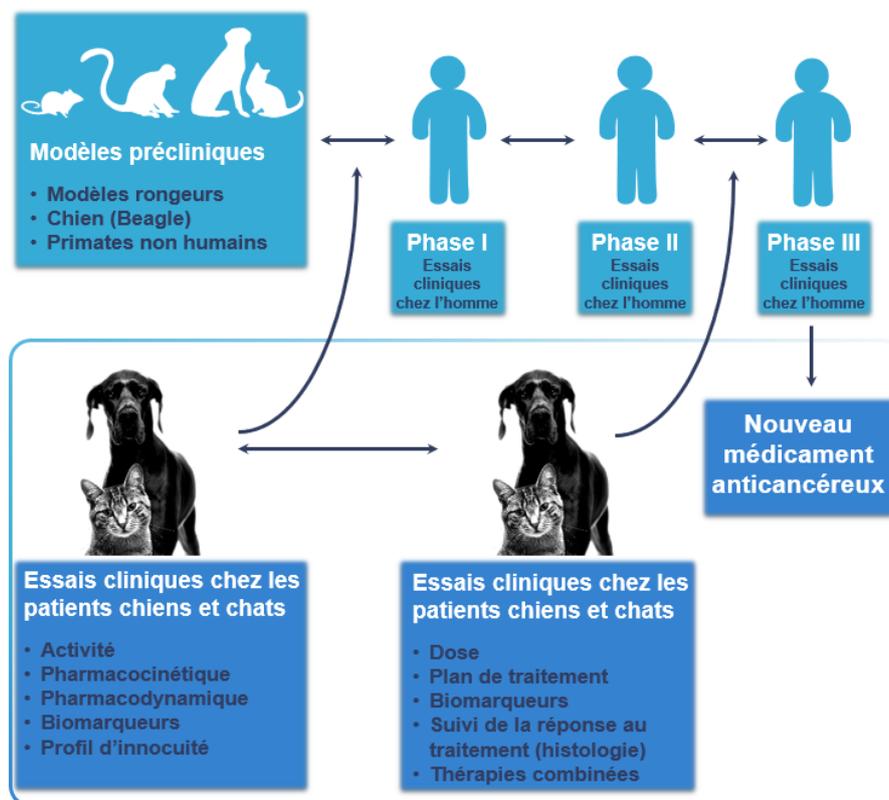


Figure 2. Tumeurs spontanées chez les animaux domestiques comme modèles prédictifs des cancers humains : utilisation et pertinence dans les essais cliniques (d'après Paoloni et al, 2007).

Plusieurs candidats-médicaments ont bénéficié des données obtenues lors d'essais sur patients chiens pour la conception des essais cliniques chez l'homme.

Dès 2003, plusieurs études menées sur des patients chiens ont démontré l'innocuité et l'efficacité thérapeutique d'un vaccin à ADN codant pour la tyrosinase humaine chez des chiens affectés par des mélanomes à un stade avancé (Bergman et al, 2003), ce qui a mené en 2010 à l'approbation par l'USDA (United States Department of Agriculture) du premier vaccin ADN anti tyrosinase humaine (Oncept, Merial) pour le traitement du mélanome chez le chien (Grosenbaugh et al, 2011). Grâce à ces résultats encourageants chez le chien, une translation rapide a été appliquée aux essais cliniques chez l'homme (Wolchok et al, 2007).

C'est le cas également pour l'ibrutinib (IMBRUVICA®), inhibiteur de la tyrosine kinase de Bruton utilisé dans le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques ou pour le ganétespib (STA-14714), inhibiteur de la protéine de choc thermique 90 (Hsp90), actuellement en cours d'évaluation dans plus de 20 essais cliniques dans les cancers du sein, du poumon, les tumeurs

stromales gastro-intestinales ou le mélanome (Honigberg et al, 2010 ; Novero et al, 2014 ; London et al, 2011 ; Jhaveri et al, 2015).

Enfin, plusieurs inhibiteurs de tyrosine kinase en cours de développement ou déjà utilisés en clinique sont identiques ou similaires entre l'homme et le chien. Le tocéranib (PALLADIA®), très proche du sunitinib (SUTENT®) utilisé dans les tumeurs stromales gastro-intestinales ou les carcinomes rénaux avancés chez l'homme, ainsi que le masitinib (MASIVET® ou KINAVET®), en cours de développement chez l'homme dans de nombreuses applications, ont été approuvés par la FDA pour le traitement des mastocytomes canin (London et al, 2009 ; Papaetis et al, 2009 ; Hahn et al, 2008). De même l'imatinib (GLIVEC®) utilisé pour les leucémies myéloïdes chroniques chez l'homme a été testé avec succès chez le chien (Bonkobara et al, 2015). Ces données montrent que les tumeurs spontanées chez le chien peuvent servir de modèle pour établir la toxicité et la réponse à des thérapies ciblées comme les inhibiteurs de tyrosine kinase (London et al, 2009).

Le succès de ces premiers candidats-médicaments anticancéreux encourage à intégrer progressivement le processus de développement de nouvelles thérapies anticancéreuses pour l'homme dans les études sur des chiens présentant des tumeurs spontanées.

II. Cancers du sein et tumeurs mammaires canines

A. Glande mammaire saine et tumorigénèse

1. Anatomie de la glande mammaire

a. Anatomie topographique.

La femme possède deux seins dans la partie antéro-supérieure du thorax, en avant du muscle grand pectoral. Chaque sein est divisé arbitrairement en quatre quadrants : supéro-externe (QSE), supéro-interne (QSI), inféro-interne (QII) et inféro-externe (QIE), centrés sur la plaque aérolo-mamelonnaire (PAM), et en quatre segments (I à IV) (Figure 3.A) (Fitoussi et al, 2017).

La chienne possède 2 chaînes mammaires composées chacune de 5 mamelles, séparées par une ligne médiane (Figure 3.B) (Sorenmo et al, 2011):

- 2 mamelles thoraciques : crâniale (M1) et caudale (M2)
- 2 mamelles abdominales : crâniale (M3) et caudale (M4)
- 1 mamelle inguinale (M5)

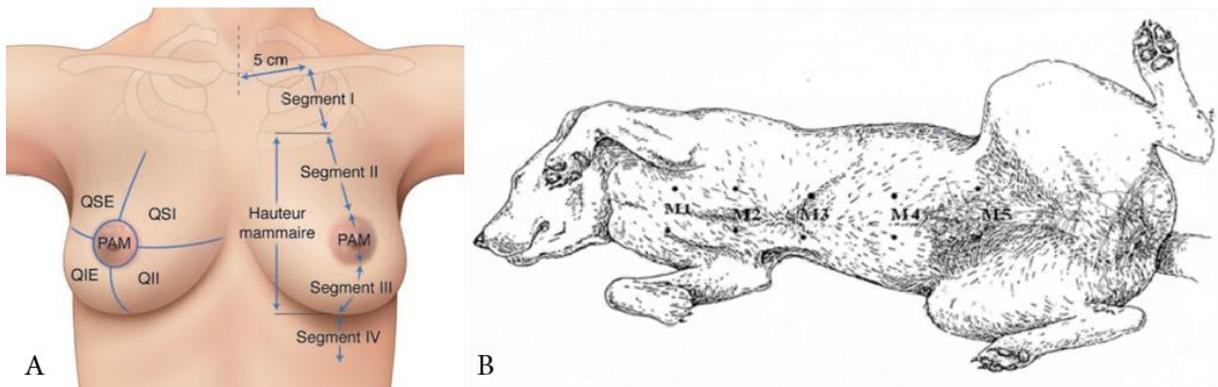


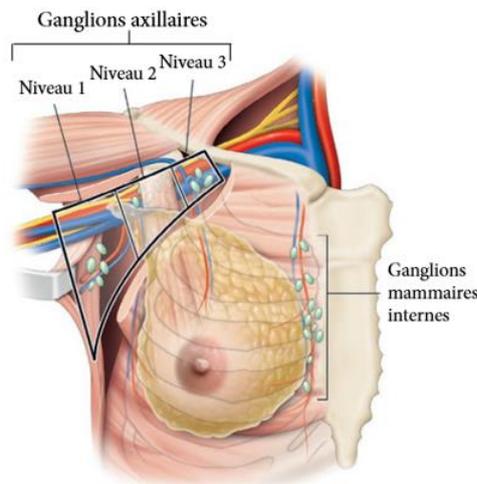
Figure 3. Anatomie topographique. A. Des seins chez la femme (D'après Fitoussi et al, 2017, dessin de Cyrille Martinet). B. Des mamelles chez la chienne (Eliane Chatelain, 1999, ENVL).

b. Drainage lymphatique

Chez la femme, le réseau lymphatique du sein est constitué d'un riche réseau cutané dans la couche profonde du derme, d'un réseau glandulaire profond et d'un réseau péri-aréolaire. Le drainage lymphatique du sein converge vers deux groupes essentiels : les ganglions axillaires (75% du drainage lymphatique) et les ganglions parasternaux ou chaîne ganglionnaire

mammaire interne (la majorité des 25% restants) (Ellis et al, 2013 ; Fitoussi et al, 2017). Les ganglions parasternaux sont au nombre de 3 à 5 pour chaque sein. Les ganglions axillaires sont au nombre de 20 à 30 répartis en cinq groupes anatomiques : axillaires pectoraux, postérieurs, latéraux, centraux et apicaux (Fitoussi et al, 2017). Ces groupes forment un continuum au sein de la graisse du creux axillaire et ne sont pas anatomiquement distincts. Cliniquement, trois étages ganglionnaires dits de Berg (niveaux I, II et III) sont utilisés pour définir le niveau de dissémination métastatique aux ganglions axillaires (Figure 4) (Berg, 1955).

Chez la chienne, le drainage lymphatique est complexe. Dans des chaînes mammaires saines, M1 et M2 sont drainées par le nœud lymphatique (NL) axillaire, M3 est drainée à la fois par les NL axillaire et inguinal superficiel, M4 et M5 par le NL inguinal superficiel (Patsikas et al, a et b, 1996). En cas de tumeur mammaire, des remaniements lymphatiques sont observés (Patsikas et al, 2006) : le drainage lymphatique mammaire implique un plus grand nombre de NL (Tableau 3). Les glandes mammaires néoplasiques présentent par ailleurs plus d'anastomoses lymphatiques entre les différentes glandes (40,9%), en particulier entre glandes controlatérales (50%), que les glandes saines (respectivement 33,3% et 33%) (Pereira et al, 2003).



Glande mammaire	Drainage lymphatique normal	Drainage lymphatique néoplasique
M1 (thoracique crâniale)	NL axillaire	NL axillaire, NL sternal
M2 (thoracique caudale)	NL axillaire	NL axillaire, NL sternal
M3 (abdominale crâniale)	NL axillaire NL inguinal superficiel	NL axillaire NL inguinal superficiel NL iliaque médial
M4 (abdominale caudale)		NL inguinal superficiel NL axillaire
M5 (inguinale)	NL inguinal superficiel	NL inguinal superficiel NL poplité Plexus lymphatique en partie médiale de la cuisse

Figure 4. Drainage lymphatique du sein chez la femme (Fitoussi et al, 2017 ; Dessin Cyrille Martinet). Tableau 3. Drainage lymphatique normal et néoplasique dans les glandes mammaires de la chienne (d'après Sorenmo et al, 2011 ; Goldschmidt et al, 2016).

c. Structure de la glande mammaire

La structure de la glande mammaire est identique chez la femme et chez la chienne (Figure 5). La glande mammaire est une glande tubulo-alvéolaire de type sudoripare modifiée, sécrétant du lait, d'origine ectodermique. Elle est constituée de l'extérieur vers l'intérieur de la peau, d'un tissu conjonctif sous-cutané et d'un corps mammaire constitué d'un tissu interstitiel (stroma) et d'un tissu glandulaire (lobes). Un lobe est constitué d'un ensemble de lobules, qui sont l'unité fonctionnelle de la glande mammaire. Chaque lobe est drainé par un canal galactophore propre s'abouchant indépendamment au niveau du mamelon et de l'aréole (Ellis et al, 2013 ; Mansar-Benhamza et al, 2008). Chez la femme, chaque glande mammaire est composée de 15-20 lobes (Fitoussi, 2017). Chez la chienne, le nombre de lobes varie de 7 à 16 en fonction de mamelles (Sorenmo et al, 2011).

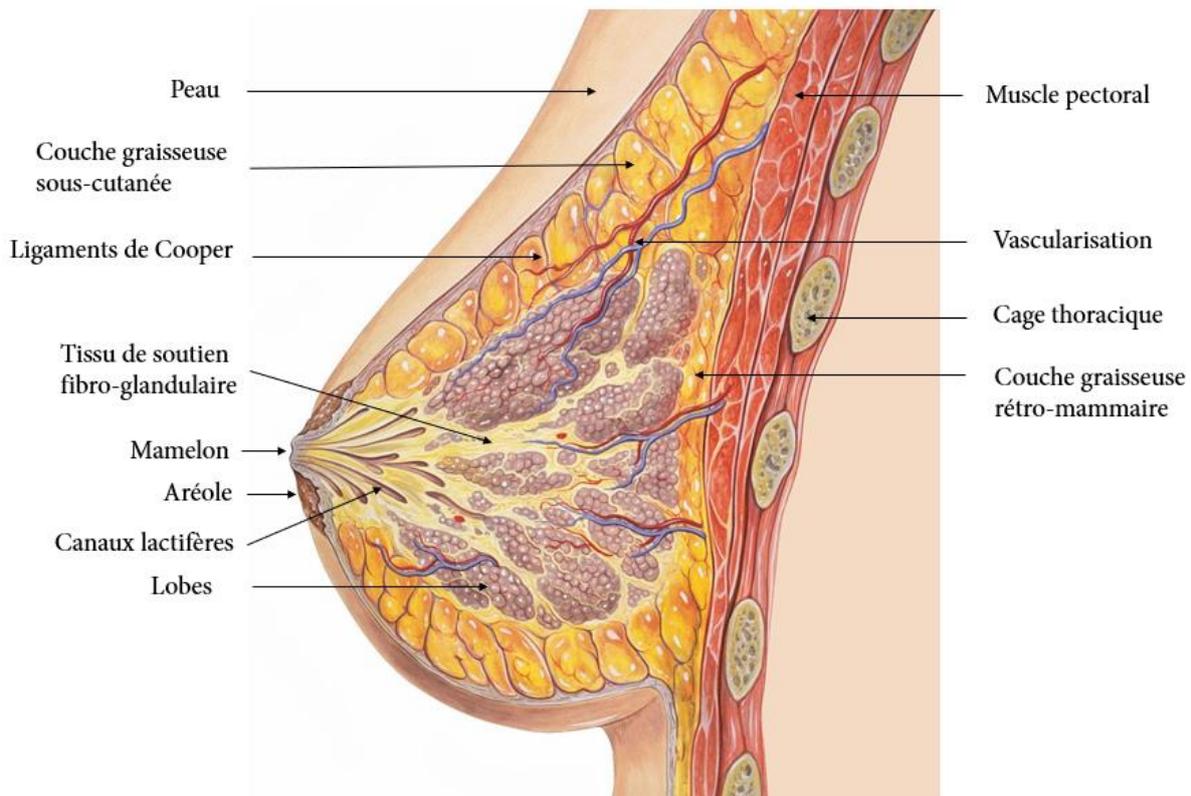


Figure 5. Structure de la glande mammaire chez la femme (D'après Fitoussi et al, 2017 ; dessin : Patrick Lynch, 2006).

2. Histologie de la glande mammaire

Les lobules mammaires sont constitués des canaux galactophores intra-lobulaires et des acini, entourés de tissu conjonctif. Chaque canal galactophore se divise successivement pour former, dans les lobules, les canaux galactophores intra-lobulaires où s'ouvrent plusieurs acini ou alvéoles (Figure 6). L'ensemble {canal galactophore intralobulaire + acini} est appelé unité terminale ducto-lobulaire (UTDL). Les canaux galactophores intra-lobulaires sont formés par un épithélium cubique dont les cellules sont entourées par des fibres élastiques. Des cellules myoépithéliales fusiformes sont parfois retrouvées autour de l'épithélium. L'acinus glandulaire a une très mince membrane basale, une couche discontinue de cellules myoépithéliales et une assise de cellules épithéliales glandulaires ou alvéolaires : les lactocytes. La hauteur de l'épithélium varie selon l'état fonctionnel de la glande mammaire (Mansar-Benhamza, 2008).

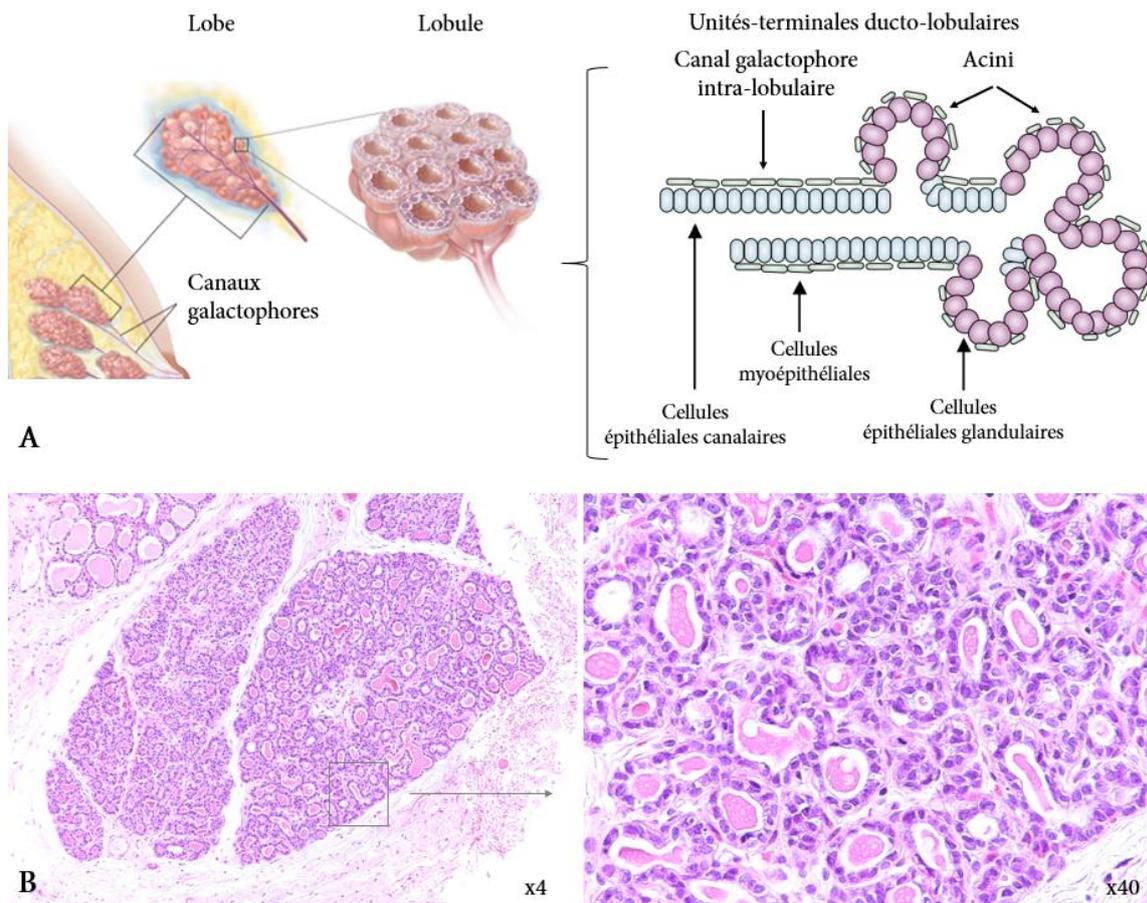


Figure 6. A. Représentation schématique des lobes, lobules et UTDL de la glande mammaire chez la femme et la chienne (d'après Woodward et al, 2005 ; dessins lobe et lobule de Terese Winslow, 2012). B. Coupes histologiques de tissu mammaire canin sain, à l'échelle d'un lobule (à gauche) ou des acini mammaires (à droite). Photographies : Bernadette Rogez et Quentin Pascal, OCR.

3. Développement au cours de la vie et contrôle hormonal
 - a. De l'étape embryonnaire et fœtale à la puberté

Chez la femme et la chienne, le développement embryonnaire commence de façon identique par l'apparition de deux crêtes mammaires, constituées de cellules ectodermiques, s'étendant de la région axillaire à la région inguinale (Pretzer et al, 2008 ; Jesinger et al, 2013). Ces cellules migrent et entrent en coalescence pour former des bourgeons mammaires, à l'origine des glandes mammaires individuelles : deux chez l'homme au niveau pectoral, dix chez le chien dans la majorité des cas (8 à 12 bourgeons peuvent être observés) (Sorenmo, 2003). Puis, les bourgeons mammaires s'invaginent dans le mésoderme sous-jacent et forment les ébauches des canaux galactophores et des futurs acini. La lumière des canaux galactophores se creuse, et ils s'ouvrent au niveau de la fovea mammaire. En profondeur, les canaux se différencient en unités glandulaires. A la naissance, la structure de la glande mammaire est inachevée. Elle restera à ce stade toute la vie chez les mâles et au repos jusqu'à la puberté chez les femelles (Jesinger et al, 2013 ; Sorenmo et al, 2011).

Chez la femme, la puberté est atteinte vers 12-13 ans. Chez la chienne, il existe des variations raciales : les petites races sont plus précoces (premier oestrus vers 6-10 mois) que les grandes races (premier oestrus vers 18-24 mois). En moyenne un intervalle de 7 mois sépare chaque cycle oestral (Feldman et al, 2004). A la puberté, dans les deux espèces, le développement mammaire est initié par la production des stéroïdes sexuels (oestrogènes, progestérone), de l'hormone de croissance (Growth hormone, GH) et de corticostéroïdes. Les hormones ovariennes agissent sur des populations de cellules souches mammaires (MaSC) présentes dans la couche basale et induisent une phase rapide de croissance. A l'extrémité terminale des canaux, les cellules prolifèrent pour former les bourgeons terminaux. Les acini restent par contre peu développés. La majeure partie de l'augmentation de volume des glandes mammaires est due à des dépôts lipidiques (Sorenmo et al, 2011 ; Russo et al, 2004).

b. Au cours du cycle menstruel/oestral

La femme présente une prolifération cyclique minimale durant le cycle menstruel, et une différenciation sécrétoire modeste pendant la phase lutéale (Russo et al, 2004). La glande mammaire canine est également un organe hormono-dépendant dont l'activité cyclique (développement, sécrétion, involution, repos) suit le cycle oestral de la chienne (Rehm et al, 2007). Ce cycle est caractérisé par un metoestrus très long de 60 jours. Pendant toute cette période, le corps jaune est fonctionnel, produisant des niveaux de progestérone aussi élevés que lors d'une gestation (Feldman et al, 2004). La glande mammaire canine subit une différenciation lobulo-alvéolaire et sécrétoire complète pendant le métoestrus (Van Garderen et al, 1997; Rehm et al, 2007 ; Santos et al, 2010). Le développement mammaire persiste 1 à 2 mois après retour à un niveau de progestérone normal. Les particularités du cycle oestral canin expliquent les fréquentes lactations de pseudo-gestation ou « grossesses nerveuses » (Sorenmo et al, 2011). Cette plasticité mammaire varie selon les animaux et les paires de mamelles (Moulton, 1986).

c. En période de gestation et de lactation

Au cours d'une grossesse, que ce soit chez la femme ou la chienne, le tissu glandulaire atteint sa maturité fonctionnelle. Au sein des lobules mammaires, la couche unistratifiée de cellules épithéliales et la couche de cellules myoépithéliales sous-jacente se différencient pour permettre la lactation. Après la parturition, la prolactine stimule les cellules épithéliales alvéolaires pour sécréter le lait, et l'ocytocine induit la contraction des cellules myoépithéliales entourant les alvéoles pour l'éjecter. A l'arrêt de l'allaitement, les cellules épithéliales alvéolaires retournent à leur état non fonctionnel (Jesinger et al, 2013).

d. A la ménopause

La ménopause correspond à la cessation de l'activité ovarienne. Elle survient vers 50 ans chez la femme, mais dès 40 ans, le tissu mammaire commence à s'atrophier : le tissu glandulaire

involue et est remplacé par du tissu conjonctif et gras (Jesinger et al, 2013). Chez la chienne, la ménopause n'existe pas, les cycles ovariens persistent toute la vie, en conséquence il n'y a pas de modification de la glande mammaire avec l'âge (Mansar-Benhamza et al, 2008).

4. Stades du développement tumoral mammaire

La cancérisation est un processus multi-étapes : des cellules normales se transforment en cellules cancéreuses via l'accumulation d'altérations génétiques. Par expansion clonale, elles mènent à la croissance d'une masse tumorale, et après acquisition par les cellules cancéreuses de la capacité de migrer, à la formation de foyers métastatiques à distance. Cette suite d'étapes a été regroupée sous le terme de cascade métastatique (Figure 7) (Fidler, 2003; Talmadge et al, 2010; Langley et al, 2011). Ce processus est lié à une succession de plusieurs stades anatomopathologiques : chez la femme et la chienne, un continuum histologique a été mis en évidence entre lésions mammaires bénignes et malignes (Figure 8) (Sorenmo et al, 2009).

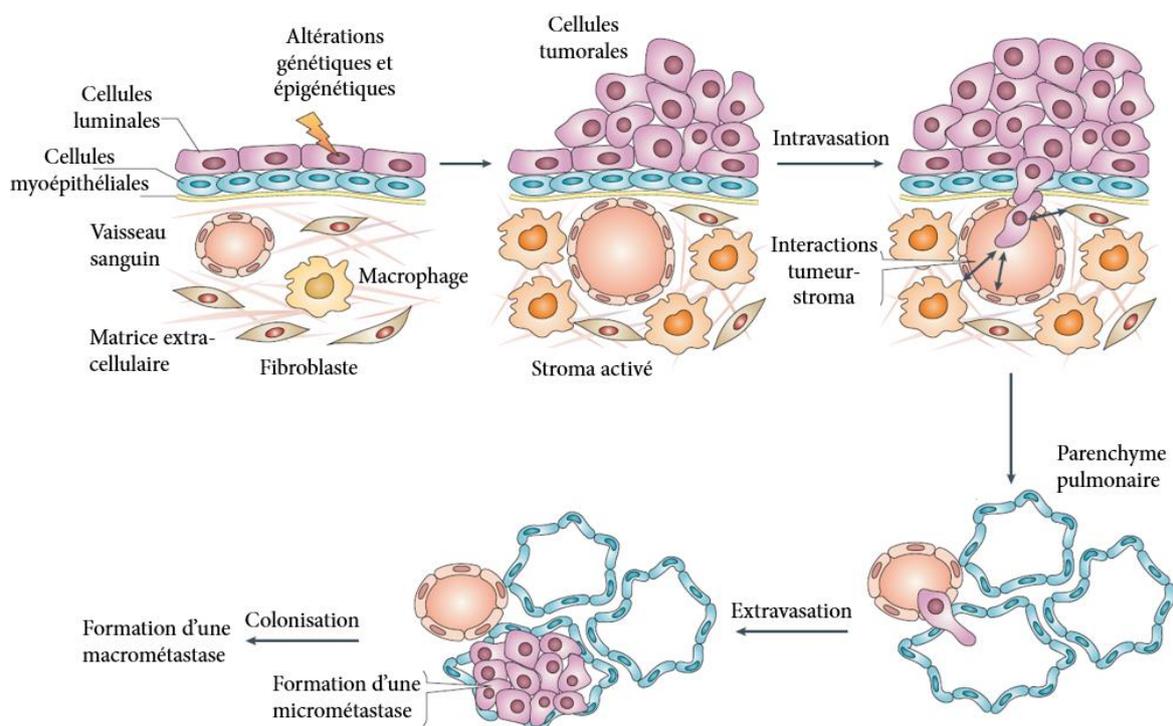


Figure 7. Les différentes étapes de la cascade métastatique (Adapté de Vargo-Gogola et al, 2007 et de *The Biology of Cancer*, Garland Science 2014). Des cellules normales se transforment en cellules cancéreuses via l'accumulation d'altérations génétiques. Par expansion clonale, elles mènent à la croissance d'une masse tumorale, et après acquisition par les cellules cancéreuses de la capacité de migrer, à la formation de foyers métastatiques à distance.

La première étape de transformation est l'acquisition d'altérations génétiques donnant à des cellules épithéliales de sous-type luminal ou basal des capacités prolifératives anormales. Elles forment alors des masses bénignes ou hyperplasies, qui peuvent ensuite évoluer vers des stades dysplasiques, où les cellules commencent à présenter des altérations de l'architecture et de la fonction de l'épithélium, accompagnées d'un processus de dédifférenciation cellulaire. L'hyperplasie et la dysplasie sont considérées comme des lésions précancéreuses. Les dysplasies les plus agressives peuvent évoluer vers les stades de carcinomes *in situ*, c'est-à-dire une invasion locale des tissus par des cellules épithéliales prolifératives, sans infiltration de la membrane basale. S'ils ne sont pas détectés et traités, ces carcinomes évoluent en carcinomes invasifs. A ce stade les cellules tumorales franchissent la membrane basale et envahissent le tissu conjonctif. Ce processus d'invasion du stroma met en jeu l'activation de nombreux processus cellulaires, comme la perte d'adhérence, et la sécrétion des enzymes protéolytiques. Les cellules cancéreuses les plus agressives dégradent la membrane basale et essaient à partir de la tumeur primaire par les voies lymphatiques et sanguines. Elles sont alors transportées via la circulation générale vers des sites distants de la tumeur primaire, s'arrêtent au niveau des capillaires sanguins où elles adhèrent à l'endothélium, s'extravasent, et forment des micrométastases. Ces micrométastases peuvent rester en état de dormance pendant plusieurs années. Certaines d'entre elles peuvent ensuite acquérir la capacité de coloniser ce nouveau tissu et de former des métastases macroscopiques. Cette dernière étape est nommée la colonisation (Fidler, 2003). On considère aujourd'hui que les métastases sont la cause de 90% des décès chez les patients présentant des tumeurs solides (Weiss, 2000).

La probabilité que des cellules cancéreuses franchissent toutes les étapes de cette cascade est très faible et une infime proportion de cellules cancéreuses isolées quittant une tumeur primaire pourra être à l'origine de métastases à distance cliniquement significatives. L'étape de colonisation semble être la moins efficace de toutes. De plus en plus d'études suggèrent que la dissémination métastatique survient à un stade très précoce de la tumorigénèse, parfois avant la formation de tumeurs primaires significatives (Bernards et al, 2002 ; Kim et al, 2009). Ainsi, des cellules tumorales en circulation dans le sang peuvent être détectées dans des cancers du sein primitifs de petite taille et avant toute intervention chirurgicale (Cristofanilli et al, 2004).

Dans une étude de 2014, des cellules tumorales circulantes (CTC) étaient retrouvées dans le sang de 19,6% des patientes présentant un cancer du sein sans métastase et avec des NL négatifs (Rack et al, 2014). De même, des cellules tumorales disséminées (DTC) peuvent être détectées à des stades précoces de la progression tumorale dans les NL périphériques et dans la moelle osseuse (MO) de patients (Pantel et al, 2004). Le taux de détection des DTC dans la MO de patientes atteintes d'un cancer du sein sans métastase clinique est de 20-40% (Braun et al, 2005).

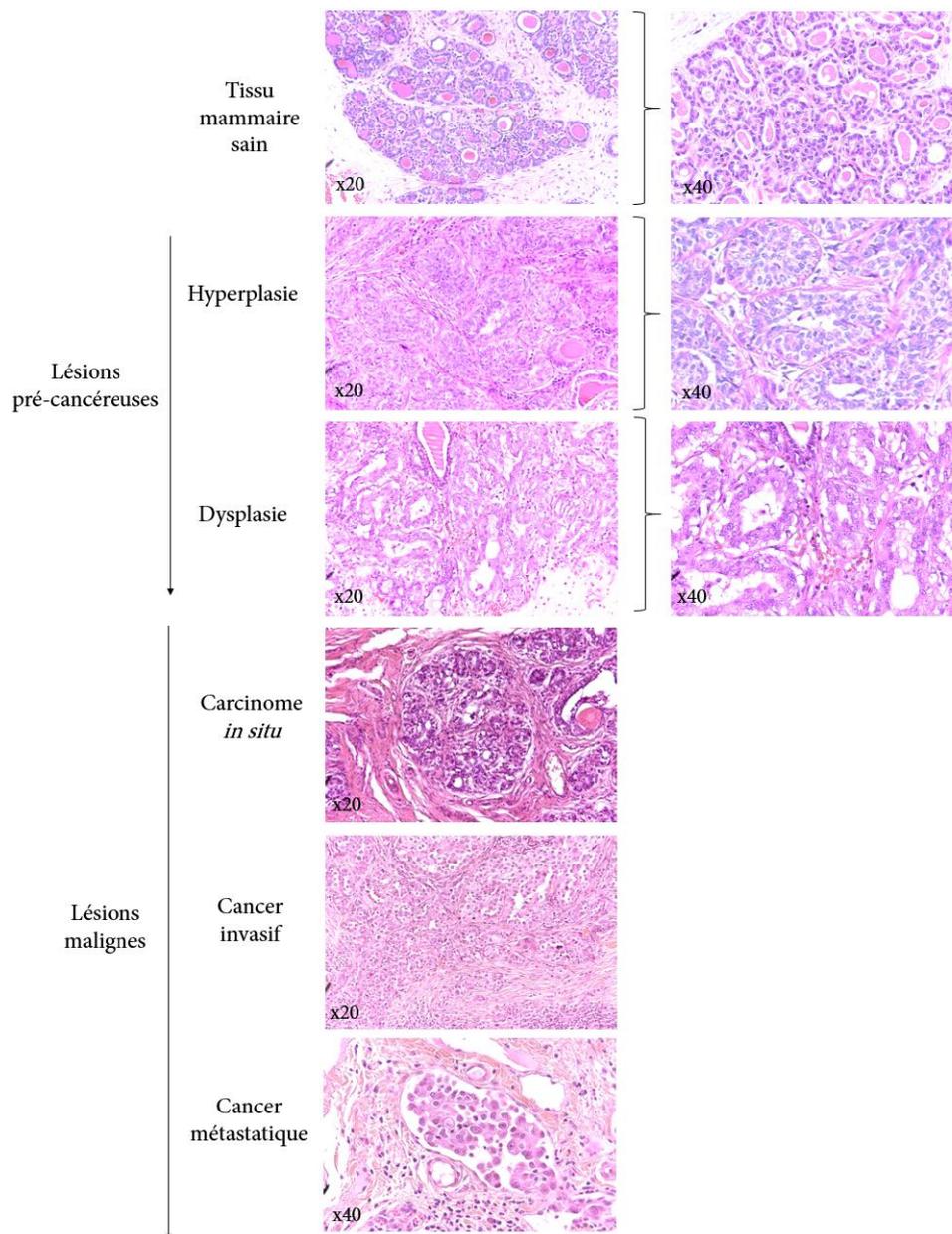


Figure 8. Continuum entre tissu mammaire sain, lésions précancéreuses et lésions malignes (d'après Vargo-Gogola et al, 2007). L'hyperplasie et la dysplasie sont considérées comme des lésions précancéreuses. Les dysplasies peuvent évoluer vers les stades de carcinomes *in situ* puis de carcinomes invasifs. Les cellules cancéreuses les plus agressives dégradent la membrane basale, essaient et forment des micrométastases puis des métastases macroscopiques. Photographies de tissu mammaire canin : Bernadette Rogez et Quentin Pascal (OCR).

B. Généralités sur les cancers du sein et tumeurs mammaires canines

1. Incidence/épidémiologie

Le cancer du sein est le cancer à la fois le plus fréquent et le plus mortel chez les femmes. Dans le monde, en 2012, 1,67 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués (25% des cancers chez la femme) et 522.000 patientes en sont décédées (14,7% des décès par cancer chez la femme) (Ferlay et al, 2015). En France, en 2015, 54 000 nouveaux cas ont été détectés, et près de 12 000 femmes en sont décédées. On estime qu'une femme sur huit sera atteinte par un cancer du sein au cours de sa vie. Le cancer du sein fait cependant partie des cancers de bon pronostic. La survie nette standardisée sur l'âge à 5 et 10 ans est respectivement de 86 % et 76 % (Inca, 2017). Elle varie selon le stade du cancer au moment du diagnostic. Selon les données américaines, les taux de survie à 5 ans pour les patientes diagnostiquées entre 1999 et 2005 sont de 98,3 % pour le stade local, 83,5 % pour le stade régional (envahissement ganglionnaire) et seulement 23,3 % pour le stade métastatique (Horner et al, 2009). Grâce à la précocité des diagnostics et aux progrès de la prise en charge thérapeutique, la mortalité de ce cancer a globalement diminué de 1,5 % par an entre 2005 et 2012.

Les tumeurs mammaires représentent les tumeurs les plus fréquentes (50 à 70% des tumeurs) chez les chiennes non stérilisées (Moe, 2001 ; Merlo et al, 2008). L'étude de Dorn menée aux Etats-Unis en 1968 donne une estimation de l'ordre de 257,7 cas/100.000 chiennes entières/an, celle menée par Dobson au Royaume-Uni en 2002 donne une estimation de 205 cas/100.000 chiens (mâles et femelles) /an (Dorn et al, 1968 ; Dobson et al, 2002). L'incidence rapportée varie selon plusieurs paramètres. Selon les pays, la pratique de la stérilisation chirurgicale précoce peut être très fréquente (90% des chiennes aux Etats-Unis), répandue dans certains pays comme le Royaume-Uni ou la France, très faible en Suède (7%) (Egenvall et al, 2005), voire interdite en Norvège où elle est illégale sauf raison médicale. Le statut stérilisé ou non des chiennes n'est pas toujours connu dans les études épidémiologiques. L'incidence peut également varier en fonction de la population source : population globale ou chiens assurés (restrictions d'âge, couverture des frais médicaux pouvant inciter à une plus grande médicalisation).

2. Facteurs de risque

a. Age

Chez la femme, le premier facteur de risque est l'âge : près de 80% des cancers du sein se développent après 50 ans (Inca, 2017). L'âge médian au diagnostic est de 61 ans (Belot et al, 2008). Aux Etats-Unis, le risque de développer un cancer du sein est de 1 sur 13 pour les femmes âgées de 60 à 79 ans, comparé à 1 sur 24 pour les femmes âgées de 40 à 59 ans et 1 sur 229 pour les femmes de moins de 39 ans (Washbrook et al, 2006).

Chez la chienne, l'âge moyen d'incidence des tumeurs mammaires est de 8 à 10 ans (Schneider, 1970; Chang et al, 2005). Une étude chez le Beagle a montré que le risque devient significatif à 8 ans et augmente ensuite linéairement avec le temps (Taylor et al, 1976). Les tumeurs malignes sont extrêmement rares avant 5 ans (Pérez-Alenza et al, 2000). Les chiennes avec des tumeurs malignes sont significativement plus âgées que celles présentant des tumeurs bénignes : 9,5 ans versus 8,5 ans (Sorenmo et al, 2009). L'âge d'incidence maximal dépend de l'espérance de vie : 6-8 ans pour les plus grandes races, 10-12 ans pour les races moyennes, 13-14 ans pour les petites races, ce qui souligne l'importance de connaître la race des chiens inclus dans une étude (O'Neill et al, 2013).

b. Exposition aux hormones

Chez la femme et la chienne, le risque de développer une tumeur mammaire est associée à l'exposition cumulative d'oestrogènes libres, ce qui suggère l'implication des mêmes mécanismes de tumorigénèse liés aux hormones (Yager et al, 2006).

Chez la femme, certains traitements hormonaux de la ménopause, une puberté précoce, une ménopause tardive, l'âge de la première grossesse et le nombre de grossesse, ainsi que la durée d'allaitement peuvent également avoir une influence sur l'apparition d'un cancer du sein (Washbrook et al, 2006).

Chez la chienne, la stérilisation a un rôle protecteur majeur contre les tumeurs mammaires. L'âge lors de la stérilisation a également une influence prépondérante. D'après

l'étude princeps de Schneider menée en 1969, le risque pour une chienne stérilisée de développer des tumeurs mammaires par rapport à une chienne intacte est de 0,5 % avant les 1^{ères} chaleurs (facteur 200), 8 % entre les 1^{ères} et 2^{ème} chaleurs (facteur 12,5), 26 % entre les 2^{ème} et 3^{ème} chaleurs (facteur 3,8). Après les troisièmes chaleurs, le risque augmente avec le temps (Schneider et al, 1969). L'étude de Beauvais en 2012 indique qu'une stérilisation avant 2,5 ans divise le risque de développer une tumeur mammaire par 10 par rapport aux chiennes entières (Beauvais et al, 2012). Chez la chienne, l'effet protecteur des grossesses n'est pas démontré, et l'effet délétère des lactations de pseudo-gestation est discuté (Donnay et al, 1994). L'administration de progestatifs exogènes multiplie le risque de tumeur mammaire par 2,3 (Stovring et al, 1997).

c. Prédispositions génétiques et antécédents familiaux de cancer du sein

Environ 5 à 10 % des cancers du sein seraient héréditaires. Cette prédisposition est le plus souvent liée à une mutation de deux gènes intervenant dans les mécanismes de réparation de l'ADN : BRCA1 (BREast CAncer gene 1) et BRCA2 (BREast CAncer gene 2). Environ 2 femmes sur 1 000 seraient porteuses d'une mutation de BRCA1 et/ou BRCA2 et en France (Inca, 2016). Les femmes porteuses d'une mutation de BRCA1 et/ou BRCA2 ont un risque plus élevé de développer un premier cancer du sein, surtout à un âge précoce, mais aussi un deuxième cancer du sein (controlatéral ou homolatéral) ou des annexes (ovaires, endomètre). L'âge médian de survenue d'un cancer du sein est 40 ans et le risque cumulé à 70 ans de 51 % à 75 % pour les femmes porteuses de BRCA1, versus 43 ans pour un risque estimé de 33 % à 55 % pour BRCA2 (Kuchenbaecker et al, 2017 ; Antoniou et al, 2003 ; Inca, 2016). Les mutations de BRCA1 s'accompagneraient plus souvent d'un phénotype triple négatif que les cancers sporadiques : 60 à 90% des cancers liés à BRCA1 seraient négatifs aux récepteurs aux oestrogènes (ER) et 50 à 80% aux récepteurs à la progestérone (PR) (Lakhani et al, 2002 ; Musolino et al, 2007).

Ces gènes de susceptibilité ont également été mis en évidence dans les tumeurs mammaires canines (Nieto et al, 2003). Chez les Springers anglais, 36% des femelles entières développent des tumeurs mammaires, et ce risque est 4 fois plus élevé chez les chiennes porteuses d'une mutation de BRCA1/2 (Rivera et al, 2009). De même, 17,2% des Shih-Tzu présentent une surexpression de BRCA1, ce qui est 3 fois supérieur au taux observé dans des races comme les caniches, bichons maltais, ou les yorkshire (Im et al, 2013). La présence de mutations de BRCA1 était associée à des tumeurs de plus haut grade, non hormonodépendantes, comme leur équivalent humain (Im et al, 2013).

d. Prédispositions raciales

Il existe des prédispositions raciales dans l'espèce canine. Les tumeurs mammaires sont globalement plus communes chez les chiens de petit format, qui présentent par ailleurs plus de tumeurs bénignes. Les chiens de race plus fréquemment affectés sont, parmi les petites races, les caniches, chihuahuas, beagles, yorkshires, teckels, bichons maltais, shih tzu et chez les grandes races les springers anglais, setters anglais, épagneul bretons, bergers allemands, pointers, dobermans et boxers (Moe, 2001 ; Sorenmo et al, 2011 ; Rasotto et al, 2017). Il a par ailleurs été montré une susceptibilité familiale pour certaines familles de Beagle, où jusqu'à 71% des femelles développaient des tumeurs mammaires (Schafer et al, 1998 ; Benjamin et al, 1999).

e. Antécédents personnels de maladie

Les femmes qui ont eu un cancer du sein, de l'ovaire ou de l'endomètre ou certaines affections du sein (hyperplasie atypique ou affection proliférative bénigne), ainsi que les femmes ayant des antécédents d'exposition aux radiations médicales avant l'âge de 30 ans (par exemple une radiothérapie du thorax pour le traitement d'un lymphome de Hodgkin) ont un risque plus élevé de cancer du sein que les autres femmes au même âge (Washbrook, 2006 ; Inca b, 2017).

De même, les chiennes avec des lésions précancéreuses histologiques (hyperplasie, carcinome *in situ*) ou des antécédents de tumeurs mammaires malignes ont un risque accru de développer une tumeur mammaire maligne (Stratmann et al, 2008 ; Sorenmo et al, 2009).

f. Facteurs de risque liés au mode de vie

Chez la femme, la consommation d'alcool et de tabac, un surpoids, ou encore pas ou peu d'activité physique, peuvent favoriser l'apparition d'un cancer du sein. 17% des cancers du sein sont attribués à la consommation d'alcool régulière, même modérée (Guérin et al, 2013; Inca, 2017). Après un cancer du sein, pratiquer 3 heures d'activité physique hebdomadaire réduirait les risques de récurrence de 20%, voire 50% au-delà de 9 heures (Holmes et al, 2005).

Chez la chienne, il a été montré dès 1991 que le surpoids à un âge précoce, entre 9 et 12 mois, pouvait mener à un risque plus élevé de tumeurs mammaires, qui serait lié à un haut niveau d'oestrogènes libres (Sonnenchein et al, 1991 ; Pérez-Alenza et al, 1998). Le rôle de la leptine a également été évoqué (Cleary et al, 2013). De même une alimentation ménagère riche en graisse et/ou en viande rouge serait un facteur de risque (Pérez-Alenza et al, 1998 et 2000).

g. Expression de COX-2

Les cyclo-oxygénases (COX) sont des enzymes catalysant la formation de prostaglandine à partir d'acide arachidonique. Les COX existent sous 3 isoformes. COX-2 est impliquée dans différentes étapes de la carcinogenèse : angiogenèse, échappement à l'apoptose, prolifération, immunosuppression et inflammation tumorale (Costa et al, 2002; Regulski et al, 2016). Chez la femme comme chez la chienne, l'expression de COX-2 a été corrélée à l'agressivité tumorale dans les tumeurs mammaires (Denkert et al, 2004 ; Boland et al, 2004 ; Doré et al, 2003 ; Lavalle et al, 2009).

C. Diagnostic et facteurs pronostics

1. Démarche clinique

a. Dépistage

Chez la femme, un dispositif national de dépistage organisé du cancer du sein a été mis en place par les autorités de santé en 2004. Il s'adresse aux femmes de 50 à 74 ans sans autre facteur de risque que l'âge, qui sont invitées tous les deux ans à réaliser une mammographie associée à un examen clinique des seins. Ces examens sont pris en charge à 100% par la caisse d'assurance maladie. Pour les femmes à risque élevé de cancer du sein, une surveillance spécifique est mise en place. Les patientes à risque très élevé de cancer du sein (forme héréditaire, mutations de BRCA1 et BRCA2) sont orientées vers une consultation d'oncogénétique (Inca c, 2017). Le dépistage a pour objectifs de réduire la mortalité liée au cancer du sein et d'améliorer l'information ainsi que la qualité des soins dispensés aux personnes concernées. La mammographie permet de repérer de petites tumeurs localisées avant même qu'elles ne soient palpables, sans atteinte ganglionnaire, au pronostic très favorable. En 2016, le taux brut de participation de la population-cible de ce dépistage était de 50.7% en France. Pour la période 2013-2014, 36 889 cancers ont été enregistrés, soit un taux de 7,4 cancers pour 1 000 femmes dépistées. Sur l'ensemble des cancers détectés, 14,8 % sont des cancers *in situ*. Les études internationales estiment que ces programmes permettent d'éviter entre 15% et 21% des décès par cancer du sein.

Chez la chienne, le dépistage des tumeurs mammaires canines n'existe pas. La découverte d'une ou plusieurs masse(s) mammaire(s) peut se faire soit par le propriétaire, fortuitement ou par palpation des chaînes mammaires chez un propriétaire averti, soit par le vétérinaire lors d'un examen clinique, par exemple à la faveur d'une consultation vaccinale. En conséquence, la découverte des tumeurs mammaires se fait souvent à un stade plus avancé chez la chienne que chez la femme.

b. Suspicion clinique

i. Signes et présentation cliniques

Chez la femme, les premiers signes cliniques sont l'apparition d'une masse, en général non douloureuse, de consistance dure, aux contours irréguliers, plus ou moins fixée. Une ou plusieurs masse(s) dures et indolores à l'aisselle peuvent indiquer une dissémination aux ganglions axillaires. D'autres signes cliniques incluent une modification de la peau (rougeur, œdème ou aspect de peau d'orange), une modification du mamelon (rétraction, changement de coloration, écoulement) ou des changements de forme des seins. Une rougeur, un œdème et une chaleur importante au niveau du sein peuvent être les signes d'un cancer du sein inflammatoire. Si le diagnostic est tardif, des signes cliniques à distance résultant des métastases peuvent être observés (douleurs osseuses, ictère, essoufflement, toux,..) (Inca b, 2017).

Chez la chienne, les symptômes locaux sont également la présence d'une masse ou d'un nodule sous-cutané, ferme, adhérent ou non au plan profond musculaire, avec éventuellement un érythème voire une ulcération cutanée (Figure 9.A). Les animaux atteints sont typiquement des chiennes d'âge moyen ou âgées, non stérilisées ou stérilisées tardivement, avec éventuellement des antécédents de tumeurs mammaires et/ou de lactations de pseudo-gestations. La durée d'évolution de la masse mammaire est souvent longue (plusieurs mois), sauf dans le cas particulier d'un carcinome mammaire inflammatoire (CMI), d'évolution fulgurante. Dans le cas de stade avancé, la chienne pourra également présenter des symptômes généraux (adénomégalies superficielles, perte de poids, boiterie, troubles respiratoires) (Sorenmo et al, 2003). 63% des tumeurs mammaires canines concernent les mamelles M4 et M5, 34% M2 et M3 et seulement 3% M1 (Taylor et al, 1976; Santos et al, 2010). Environ 50% des tumeurs mammaires canines sont malignes (Hampe et al, 1974; Sorenmo et al, 2013) et ont une évolution métastatique dans 25% des cas (Misdorp, 2002). Au moment du diagnostic, 25 à 50% des chiennes présentant une tumeur maligne ont déjà des métastases pulmonaires (Hedlund, 2007). 50 à 70% des chiennes présentent des tumeurs multiples (Figure 9.B), pouvant être de plusieurs types tumoraux (Benjamin et al, 1999; Misdorp, 2002; Sorenmo, 2003; Sorenmo et al, 2009).

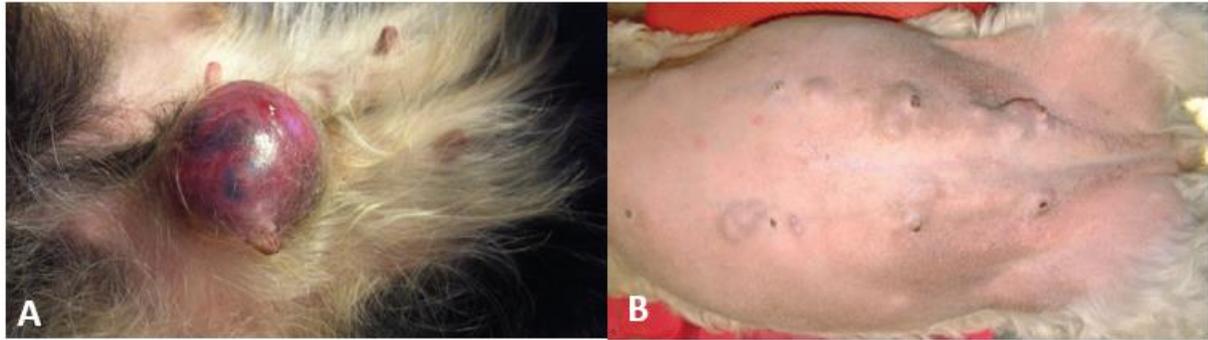


Figure 9. Exemples de tumeurs mammaires canines. A. Tumeur unique de grande taille sur M5 (Photographie: Dr.Franck Floch, Oncovet). **B.** Tumeurs mammaires multiples sur les 2 chaînes mammaires d'une chienne (issu de Sorenmo et al, 2013).

ii. Cas particulier : le carcinome mammaire inflammatoire

Le carcinome mammaire inflammatoire (CMI) est une forme rare et agressive de cancer du sein représentant chez la femme 2,5% des cas de cancers du sein. C'est une entité clinique à part entière, caractérisée par une progression rapide, des métastases locales et à distance, et un âge d'apparition plus précoce. La figure pathognomonique du CMI est la présence de nombreux embolus tumoraux qui obturent les vaisseaux lymphatiques dermiques du ou des seins atteints. Les signes cliniques observés sont des répercussions de la dissémination métastatique (Figure 10.A). Historiquement, le CMI est une maladie mortelle avec moins de 5% de taux de survie à 5 ans, un temps de survie médian inférieur à 15 mois et des taux de récurrence locale de 50% après traitement par chirurgie et éventuellement radiothérapie. Même si les temps de survie ont augmenté grâce aux thérapies multimodales, ils sont toujours inférieurs de 35 à 40% par rapport aux autres types de cancers du sein. De 55 à 85% des patients présentent des métastases aux NL axillaires et supraclaviculaires au moment du diagnostic (Walshe et al, 2005).

Chez la chienne, les CMI représentent 7,6% des tumeurs mammaires. Ils partagent de nombreuses similarités avec la femme (Pérez-Alenza et al, 2001 ; Raposo et al, 2017). Plusieurs types tumoraux de haut grade peuvent être impliqués, comme les comédocarcinomes (30-40% des CMI). La survenue est brutale, l'évolution fulminante, avec des signes cliniques d'inflammation : œdème, douleur, chaleur, érythème (Figure 10.B). La peau est souvent ulcérée (Clemente et al, 2010). Le pronostic est très sombre. Sur une cohorte de 33 cas avec un

traitement palliatif (antibiotiques), la survie était de 4 à 55 jours (Pérez-Alenza et al, 2001). Le temps de survie le plus long jamais décrit est de 337 jours (Simeon et al, 2013).

Les CMI ne doivent pas être confondus avec la carcinomatose, qui correspond à des métastases cutanées des tumeurs mammaires. Elle est due à des embolies lymphatiques qui colonisent le derme par voie rétrograde (Lee et al, 2018 ; Poujol et al, 2005).



Figure 10. A. Signes cliniques d'un CMI chez la femme : inflammation, peau d'orange et éversion du mamelon (issu de PDQ Cancer Information Summaries, National Cancer Institute; 2002). B. CMI en M5 chez une chienne (Photographie: Dr.Franck Floch, Oncovet).

2. Evaluation du stade clinique

a. Stade TNM

Le stade correspond à l'étendue du cancer. Trois critères permettent de l'évaluer :

- Extension locale (T) : taille et infiltration de la tumeur
- Extension régionale (N) : envahissement ou non des NL, nombre et emplacement
- Extension à distance (M) : présence ou non de métastases dans des organes à distance

Ces 3 critères permettent de définir le stade du cancer selon la classification TNM (Tumor, Nodes, Metastasis) de l'Union internationale contre le cancer (UICC) et de l'American Joint Committee on Cancer (Figure 11). L'examen clinique réalisé lors du diagnostic permet de définir un stade pré-thérapeutique ou classification cTNM (c pour clinique). Après la chirurgie,

l'examen histologique de la tumeur et des ganglions prélevés permet de définir un stade anatomopathologique, ou classification pTNM (p pour post-chirurgical) (Inca, 2010).

Chez la chienne, un système TNM adapté est utilisé (Figure 11) (Owen, 1980 ; Sorenmo et al, 2013). Il est moins détaillé que chez la femme et comporte 5 stades au lieu de 4, mais permet d'évaluer le degré d'évolution de la tumeur, la stratégie thérapeutique, et a une valeur pronostique (Sorenmo, 2003; Chang et al, 2005).

Stade TNM chez la femme				Stade TNM chez la chienne			
Stade 0	Tumeur <i>in situ</i>	N0	M0	Stade I	T1	N0	M0
Stade I	T1	N0	M0	Stade II	T2	N0	M0
Stade IIA	T0/T1	N1	M0	Stade III	T3	N0	M0
	T2	N0	M0	Stade IV	Tous T	N1	M0
Stade IIB	T2	N1	M0	Stade V	Tous T	Tous N	M1
	T3	N0	M0				
Stade IIIA	T0/T1/T2	N2	M0				
	T3	N1/N2	M0				
Stade IIIB	T4	N0/N1/N2	M0				
Stade IIIC	Tous T	N3	M0				
Stade IV	Tous T	Tous N	M1				

Tumeur primaire (T)

Tx : Tumeur primitive non évaluable

T0 : Tumeur primitive non palpable

T1 : tumeur ≤ 2 cm

T2 : 2 cm < tumeur ≤ 5 cm

T3 : tumeur > 5 cm

T4 : tumeur, quelle que soit sa taille, avec une extension directe soit à la paroi thoracique (a), soit à la peau (b)

T0 : tumeur primitive non palpable

T1 : tumeur < 3 cm :

T2 : tumeur de 3 à 5 cm

T3 : tumeur de plus de 5 cm

T4 : carcinome inflammatoire

Ganglions lymphatiques régionaux (pN)

Nx : envahissement non évaluable

N0 : absence d'envahissement ganglionnaire régional

N1 : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou/et des ganglions de la chaîne mammaire interne

N2 : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou des ganglions mammaires internes

N3 : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires

+/- des ganglions sous-claviculaires

+/- des ganglions mammaires internes

N0 : Absence de métastase ganglionnaire cytologique ou histologique

N1 : Métastase(s) ganglionnaire(s) cytologique ou histologique

Métastases à distance (M)

Mx : renseignements insuffisants

M0 : absence de métastase à distance

M1 : Métastase(s) à distance

M0 : absence de métastase à distance

M1 : Métastase(s) à distance

Figure 11. Comparaison de l'établissement des stades TNM chez la femme et chez la chienne (D'après Inca, 2010 ; Sorenmo et al, 2013). Chez la chienne, le système TNM adapté est moins détaillé que chez la femme et comporte 5 stades au lieu de 4.

b. Bilan d'extension

Chez la femme, le bilan d'extension régional se fait au cours de la chirurgie. Une exérèse du ganglion sentinelle est indiquée en cas de tumeur infiltrante. Afin de localiser le ou les ganglion(s) sentinelle(s), du colorant bleu patenté et/ou un produit radioactif (Technetium99) sont injectés en périaréolaire ou en péri-tumoral. Ils sont absorbés par les vaisseaux lymphatiques et circulent jusqu'aux ganglions sentinelles en amont de la tumeur. Si le ganglion sentinelle est indemne, le risque que d'autres ganglions axillaires soient infiltrés est faible (inférieur à 5 %), les autres ganglions lymphatiques sont donc laissés en place (Inca b, 2017). Si le ganglion sentinelle est infiltré, 8 à 10 autres ganglions sont retirés pour être analysés. Actuellement, le curage axillaire concerne les niveaux 1 et 2 de Berg (Fitoussi, 2017). Le bilan d'extension n'est pas systématique. Les recommandations internationales actuelles ne préconisent pas d'exams standards à réaliser et sont parfois divergentes. Les recommandations de l'European Society for Medical Oncology (ESMO) de 2011 préconisent un bilan d'extension systématique avec une évaluation viscérale (au choix : radiographie du thorax, échographie abdominale ou scanner thoracique et abdominopelvien) et une évaluation osseuse par scintigraphie au Technetium99 (Inca, 2010 ; Aebi et al, 2011). La tomographie par émission de positons ou TEP-scan au 18F-FDG (fluoro-désoxy-glucose) est un examen de seconde intention (Aebi et al, 2011 ; Carlson et al, 2011 ; Turpin et al, 2014)

Chez la chienne, le bilan d'extension local consiste à évaluer par palpation des deux chaînes mammaires le nombre de masses et leur localisation. Le bilan d'extension régional se fait par palpation du NL sentinelle (axillaire et/ou inguinal). Le vétérinaire peut réaliser une cytoponction du ou des NL macroscopiquement anormaux pour évaluer leur infiltration par des cellules tumorales (Dolka et al, 2018). L'exérèse du NL sentinelle lors de la chirurgie est recommandée en vue d'une analyse anatomopathologique (Figure 12), mais n'est pas toujours réalisée en pratique. Comme chez la femme, la cartographie des NL sentinelles pourrait être amenée à se développer, avec injection péri-tumorale de colorant, échographie à contraste

renforcé ou lympho-scintigraphie (Wells et al, 2006 ; Gelb et al, 2010 ; Pereira et al, 2008; Beserra, 2016 ; Beer et al, 2017).

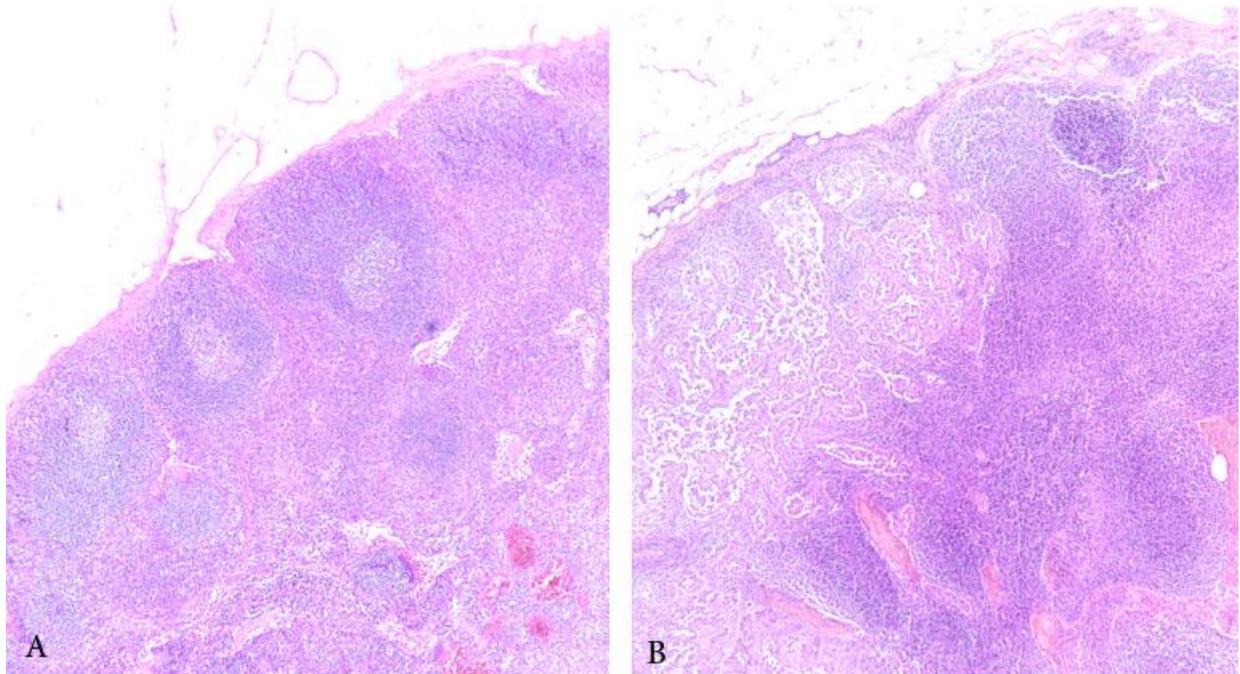


Figure 12. Coupes histologiques de NL inguinaux canins après exérèse chirurgicale d'une tumeur mammaire. A. NL sain B. NL infiltré massivement par des cellules cancéreuses. (Photographies : Bernadette Rogez et Quentin Pascal, OCR)

Le coût des examens est souvent un facteur limitant dans la réalisation d'un bilan d'extension. En routine, le bilan d'extension se limite à la recherche de la présence de métastases pulmonaires par des radiographies thoraciques (Figure 13.A), les poumons étant le lieu d'élection préférentiel des métastases (Rutteman, 2001). Les radiographies thoraciques sont très accessibles, le coût est limité mais la sensibilité est modérée : seules les lésions supérieures à 5 à 7mm de diamètre sont visibles (Sorenmo et al, 2003 ; Otoni et al, 2010). Le scanner thoracique a une accessibilité moindre et un coût plus élevé, et nécessite une anesthésie générale, mais a une meilleure sensibilité avec détection des lésions à partir de 1mm de diamètre (Figure 13.B) (Otoni et al, 2010). L'exploration de la cavité abdominale est peu réalisée en pratique (Sorenmo et al, 2003).

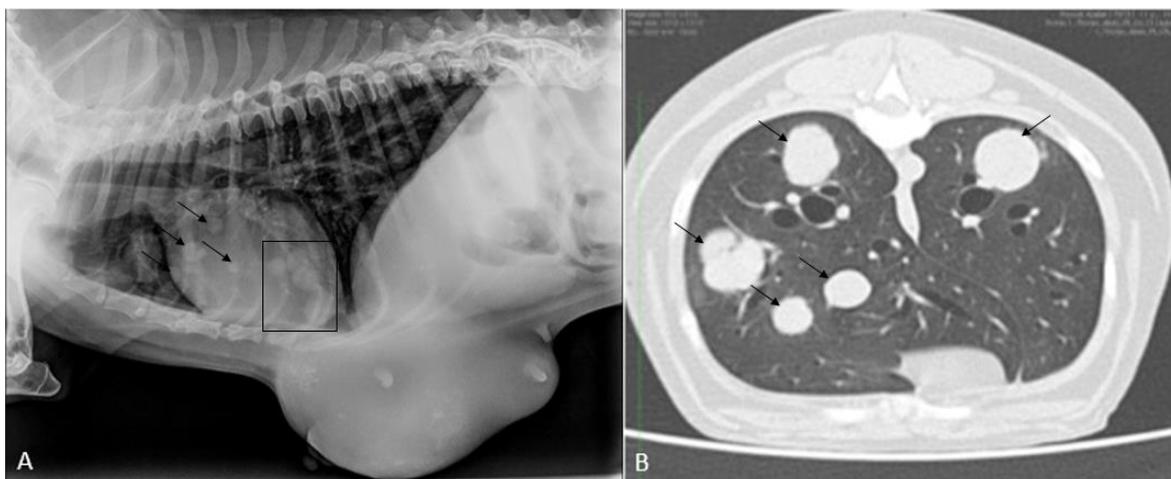


Figure 13. Exemples de bilans d'extensions objectivant des métastases de tumeurs mammaires canines. A. Masse tumorale volumineuse et métastases pulmonaires multiples visibles en radiographie thoracique (indiquées pour certaines par des flèches noires) avec une image caractéristique en lâcher de ballons (encadré) (source : veterostrenen.com). B. Métastases pulmonaires multiples d'un carcinome mammaire de grade III chez une chienne, indiquées par des flèches noires (Image : Dr. Franck Floch, Oncovet).

3. Classification histologique des tumeurs mammaires

a. Classification de l'OMS/WHO

Chez la femme, c'est la classification de l'OMS qui s'applique pour la classification histologique des cancers du sein (Tableau 4.A) (Inca, 2010). Les types histologiques sont globalement séparés en 3 groupes, ayant une forte valeur pronostique.

Les carcinomes *in situ*, qu'ils soient canaux ou lobulaires, sont de cancers pré-invasifs. Par définition ces cancers ne métastasent pas et sont curables par une thérapie locale. Ce sont les cancers de meilleur pronostic. Ils sont classés au stade 0 dans la classification TNM. Les carcinomes micro-invasifs sont des carcinomes invasifs de moins de 1 mm de diamètre. Ils sont capables de métastaser. Les carcinomes invasifs ou infiltrants sont ceux de plus mauvais pronostic. Dans ce groupe, des types spécifiques présentent un risque de dissémination et de mortalité plus faible. Ce sont les carcinomes : mucineux, tubulaire, papillaire, et médullaire (Mousseau et al, 2002). Ils représentent moins de 6% des carcinomes invasifs.

Chez la femme, l'expression des récepteurs ER et PR, ainsi que HER2, font partie intégrante de la classification histologique (cf.paragraphe C.5. Classification moléculaire).

b. Classification de Peña et Clemente

Chez la chienne, la classification histologique de Peña et Clemente est utilisée (Tableau 4.B). Elle est partiellement superposable à la classification chez la femme.

La grande majorité des tumeurs sont de type épithélial : adénomes et adénocarcinomes (80%). Les tumeurs mammaires conjonctives (fibromes, fibrosarcomes, ostéosarcomes, autres sarcomes) sont rares mais la plupart d'entre elles, à l'exception des fibromes, sont de mauvais pronostic (Goldschmidt et al, 2011). Parmi les carcinomes, les carcinomes *in situ* ont le meilleur pronostic. Les tumeurs tubulaires simples et complexes ont un bon pronostic, alors que les tumeurs solides et encore plus les tumeurs anaplasiques sont de mauvais pronostic (Tableau 5) (Misdorp et al, 1999 ; Rasotto et al, 2017). Les CMI ont le pronostic le plus sombre. Lorsque plusieurs tumeurs sont présentes, la plus agressive est prise en compte.

Tumeurs malignes épithéliales	Tumeurs malignes épithéliales	
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome canalaire in situ (CCIS) • Carcinome lobulaire in situ (CLIS) 	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome in situ • Carcinome simple 	
Tumeurs épithéliales infiltrantes	<ul style="list-style-type: none"> Tubuleux Tubulopapillaire Papillaire kystique Cribriforme 	
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome infiltrant canalaire de type non spécifique (canales TNS) 	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome micropapillaire infiltrant • Carcinome solide • Carcinome comédoneux 	
<ul style="list-style-type: none"> De type mixte Pléomorphe À cellules géantes ostéoclastiques A aspect choriocarcinomateux A aspects mélanocytaires 	<ul style="list-style-type: none"> synonymie : Comédocarcinome 	
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome lobulaire infiltrant • Carcinome tubuleux • Carcinome cribriforme infiltrant • Carcinome médullaire • Carcinome produisant de la mucine 	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome anaplasique • Carcinome développé dans un adénome complexe ou une tumeur mixte bénigne • Carcinome complexe • Carcinome et myoépithélioma malin • Carcinome mixte • Carcinome ductulaire 	
<ul style="list-style-type: none"> Mucineux Cystadénocarcinome et carcinome à cellules cylindriques sécrétantes Carcinome à cellules en bague à chaton 	<ul style="list-style-type: none"> contrepartie maligne de l'adénome canalaire 	
Tumeurs neuroendocrines du sein	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome papillaire intracanaire contrepartie maligne de l'adénome papillaire intracanaire 	
<ul style="list-style-type: none"> Carcinome neuroendocrine de type solide Carcinoïde atypique Carcinome à petites cellules Carcinome neuroendocrine à grandes cellules 	Tumeurs malignes épithéliales autres	
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome papillaire infiltrant • Carcinome micropapillaire infiltrant • Carcinome apocrine • Carcinome métaplasique 	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome épidermoïde • Carcinome adénosquameux • Carcinome mucineux • Carcinome à cellules lipidiques 	
<ul style="list-style-type: none"> De type épithélial pur Carcinome épidermoïde Adénocarcinome avec métaplasie à cellules fusiformes Carcinome adénosquameux Carcinome mucoépidermoïde Mixte à composante épithéliale et conjonctive 	<ul style="list-style-type: none"> synonymie : carcinome à cellules riches en lipides 	
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome à cellules riches en lipides • Carcinome sécrétant • Carcinome oncocytique • Carcinome adénoïde kystique • Carcinomes à cellules acineuses • Carcinomes à cellules claires (riches en glycogène) • Carcinome sébacé • Carcinome inflammatoire 	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinomes à cellules fusiformes Myoépithélioma malin Carcinome épidermoïde à cellules fusiformes Carcinome à cellules fusiformes 	
Maladie de Paget du mamelon	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome inflammatoire 	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome inflammatoire
Autres	Tumeurs malignes mésoenchymateuses • Sarcomes	
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome à cellules riches en lipides • Carcinome sécrétant • Carcinome oncocytique • Carcinome adénoïde kystique • Carcinomes à cellules acineuses • Carcinomes à cellules claires (riches en glycogène) • Carcinome sébacé • Carcinome inflammatoire 	<ul style="list-style-type: none"> • Ostéosarcome • Chondrosarcome • Fibrosarcome • Hémangiosarcome • Autres sarcomes 	
Autres	Carcinosarcome	
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome à cellules riches en lipides • Carcinome sécrétant • Carcinome oncocytique • Carcinome adénoïde kystique • Carcinomes à cellules acineuses • Carcinomes à cellules claires (riches en glycogène) • Carcinome sébacé • Carcinome inflammatoire 	Tumeurs bénignes	
Autres	<ul style="list-style-type: none"> • Adénome simple • Adénome papillaire intracanaire synonymie : Papillome ductulaire • Adénome canalaire 	
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome à cellules riches en lipides • Carcinome sécrétant • Carcinome oncocytique • Carcinome adénoïde kystique • Carcinomes à cellules acineuses • Carcinomes à cellules claires (riches en glycogène) • Carcinome sébacé • Carcinome inflammatoire 	<ul style="list-style-type: none"> synonymie : adénome basaloïde +/- à différenciation squameuse (granules de kératohyaline) • Fibroadénome • Myoépithélioma • Adénome complexe • Tumeur mixte bénigne 	
Autres	Hyperplasie • Dysplasie	
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome à cellules riches en lipides • Carcinome sécrétant • Carcinome oncocytique • Carcinome adénoïde kystique • Carcinomes à cellules acineuses • Carcinomes à cellules claires (riches en glycogène) • Carcinome sébacé • Carcinome inflammatoire 	<ul style="list-style-type: none"> • Ectasie canalaire • Hyperplasie mammaire lobulaire type adénose 	
Autres	<ul style="list-style-type: none"> Régulière Avec activité sécrétoire Avec fibrose du tissu interstitiel Avec apparition d'atypies cytonucléaires 	
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome à cellules riches en lipides • Carcinome sécrétant • Carcinome oncocytique • Carcinome adénoïde kystique • Carcinomes à cellules acineuses • Carcinomes à cellules claires (riches en glycogène) • Carcinome sébacé • Carcinome inflammatoire 	<ul style="list-style-type: none"> • Epithéliose • Papillomatose • Lésions fibro-adénomateuses • Gynécomastie 	
Autres	Tumeurs du mamelon	
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome à cellules riches en lipides • Carcinome sécrétant • Carcinome oncocytique • Carcinome adénoïde kystique • Carcinomes à cellules acineuses • Carcinomes à cellules claires (riches en glycogène) • Carcinome sébacé • Carcinome inflammatoire 	<ul style="list-style-type: none"> • Adénome • Carcinome • Carcinome avec infiltration de l'épiderme comme dans la Maladie de Paget 	
Autres	Hyperplasie • Dysplasie du mamelon	
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome à cellules riches en lipides • Carcinome sécrétant • Carcinome oncocytique • Carcinome adénoïde kystique • Carcinomes à cellules acineuses • Carcinomes à cellules claires (riches en glycogène) • Carcinome sébacé • Carcinome inflammatoire 	<ul style="list-style-type: none"> • Mélanose de la peau du mamelon 	

Tableau 4. Classification histologique des tumeurs mammaires. A. Classification histologique des cancers du sein selon l'OMS 2002-2003. **B.** Classification histologique des tumeurs mammaires canines d'après la classification de Peña et Clemente (source : Lapvso.com).

Pronostic	Type histologique
Très mauvais	Sarcomes et CMI (survie médiane 1 mois) Carcinomes anaplasiques (survie médiane 2,5 mois) Ostéosarcomes (survie médiane 3 mois) Carcinosarcomes
Mauvais	Carcinomes solides Comédocarcinomes Carcinomes et myoépithélioma malins Carcinomes à cellules lipidiques Carcinomes adénoquameux Carcinomes micropapillaires infiltrants
Intermédiaire	Carcinomes simple (variable) Carcinomes complexes Carcinomes adénoquameux
Bon	Carcinomes in situ Carcinomes simples tubulaires Carcinomes complexes Carcinomes développés dans une tumeur mixte bénigne et carcinomes canaux

Tableau 5. Type histologique et pronostic dans les tumeurs mammaires canines (D'après Simeon et al, 2014).

Plusieurs spécificités canines existent (Figure 14). Les tumeurs complexes, qu'elles soient bénignes ou malignes, correspondent à une prolifération à la fois des cellules épithéliales tumorales (lobulaires ou canaux) et des cellules myoépithéliales. Les tumeurs mixtes comptent en plus l'existence d'une métaplasie (tissu osseux, cartilagineux ou graisseux) (Misdorp et al, 1999). Les tumeurs mixtes bénignes sont fréquentes (40 à 50% des tumeurs mixtes) (Cassali et al, 2011 et 2012), les tumeurs mixtes malignes sont très rares, et appelées carcinosarcomes. On peut observer une prolifération myoépithéliale dans plus de 20% des tumeurs mammaires canines, alors qu'elles concernent moins de 0,1% des cancers du sein (Liu et al, 2014). Par ailleurs, si les tumeurs mixtes sont très rares dans le sein, elles sont plus fréquentes dans les glandes salivaires chez l'homme (Voz et al, 2000).

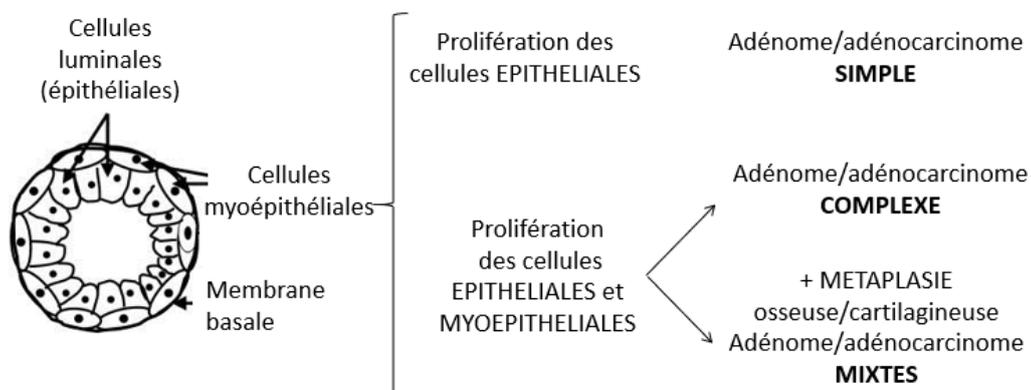


Figure 14. Tumeurs mammaires canines simples, complexes et mixtes. Les tumeurs complexes correspondent à une prolifération à la fois des cellules épithéliales tumorales et des cellules myoépithéliales. Les tumeurs mixtes comptent en plus l'existence d'une métaplasie.

4. Grade histopronostique

a. Chez la femme : grading de Scarff-Bloom-Richardson (SBR)

Le grade histopronostique Scarff-Bloom Richardson (grade SBR), adapté à partir du grade Elston-Ellis (EE), correspond au grade de différenciation du point de vue morphologique des cellules cancéreuses et ne s'applique qu'aux carcinomes (Mousseau et al, 2002). Trois paramètres morphologiques sont évalués lors de l'examen anatomopathologique : l'architecture tumorale via le degré de formation tubulaire, le niveau de pléomorphisme nucléaire (forme et taille de noyau) et l'activité mitotique. Chaque critère est noté de 1 à 3. Un score total de 3 à 5 indique une tumeur de bas grade et bien différenciée (grade I), de 6 à 7 une tumeur de grade intermédiaire modérément différenciée (grade II) et un score de 8 à 9 une tumeur de haut grade, indifférenciée (grade III). Plus le grade est élevé, plus la tumeur est agressive et de mauvais pronostic.

b. Chez la chienne : grading de Peña et Clemente

Chez la chienne, le grading utilisé pour les carcinomes est le même que dans le cancer du sein (Figure 15) (Goldschmidt et al, 2011 ; Peña et al, 2013). La valeur pronostique du grading de Peña et Clemente est reconnue et forte. Dans l'étude de Lagadic de 1995, les taux de survie post-opératoire à 2 ans suivant les différents grades étaient de 86% pour le grade I, 43% pour le grade II, 17% pour le grade III. Les carcinomes de grade I étaient les plus fréquents (Lagadic et al, 1995). Dans l'étude de Peña menée en 2012, la durée moyenne de survie sans progression (DFS ou Disease Free Survival) était de 37,29 mois pour les tumeurs de grade I, 32,68 mois pour les grade II, et 11,39 mois pour les grade III. La durée moyenne de survie globale (OS pour Overall Survival) était de plus de 38 mois pour les tumeurs de grade I, 32,84 mois pour les grade II et 20,36 mois pour les grade III (Peña et al, 2012).

Formation de tubes	Pléomorphisme nucléaire	Nombre de mitose sur 10 champs x400
Elevée (>75% de l'échantillon) : 1 point Modérée (10-75%) : 2 points Faible ou nulle (<10%) : 3 points	Faible : 1 point Modéré : 2 points Intense : 3 points	0 – 9 : 1 point 10 – 19 : 2 points ≥ 20 : 3 points



Score en points	3 – 5	6 – 7	8 – 9
Grade	I	II	III
Malignité	Faible	Modérée	Elevée
Degré de différenciation	Bien différencié	Moyennement différencié	Peu différencié



Grade	I	II	III
Durée moyenne de survie sans progression (mois)	37,29	32,68	11,39
Durée moyenne de survie globale (mois)	> 38 mois	32,84	20,36

Etude de Peña et al, 2012

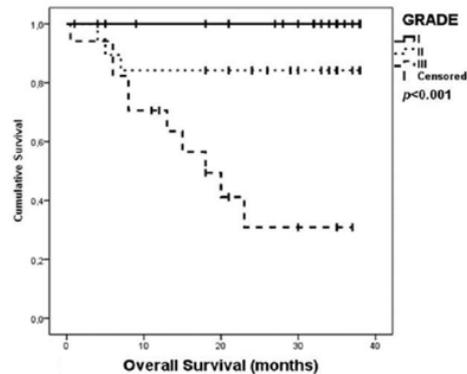


Figure 15. Grading de Peña et Clemente et valeur pronostique chez la chienne (d'après Sorenmo et al, 2013). Trois paramètres sont évalués lors de l'examen anatomopathologique : l'architecture tumorale, le niveau de pléomorphisme nucléaire et l'activité mitotique. Chaque critère est noté de 1 à 3. Un score total de 3 à 5 indique une tumeur de bas grade et bien différenciée (grade I), de 6 à 7 une tumeur de grade intermédiaire modérément différenciée (grade II) et un score de 8 à 9 une tumeur de haut grade, indifférenciée (grade III).

5. Classification moléculaire des cancers mammaires et expression des récepteurs hormonaux

L'analyse des profils d'expression génique à haut débit, par l'utilisation des puces à ADN, a permis l'identification de 5 sous-types moléculaires de cancer du sein biologiquement distincts sur la base de l'expression de groupes de gènes (Perou et al, 2000; Sorlie et al, 2001).

Les résultats obtenus par l'analyse des profils d'expression génique ont été adaptés à la pratique anatomo-pathologique de routine grâce à la mise en évidence de profils protéiques par immunohistochimie définissant les mêmes sous-types phénotypiques que les profils moléculaires (Nielsen et al, 2004; Raica et al, 2009). Le panel utilisé comporte des anticorps dirigés contre les récepteurs hormonaux (RO et RP), et contre HER2, le récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGFR) et les cytokératines (CK) 5/6, associés à la détermination de

l'index Ki67. Ils déterminent les sous-types luminal A, luminal B, surexprimant HER2, triple négatif basal-like et triple négatif non basal-like (Figure 16) (Cheang et al, 2008 ; Cheang et al, 2009).

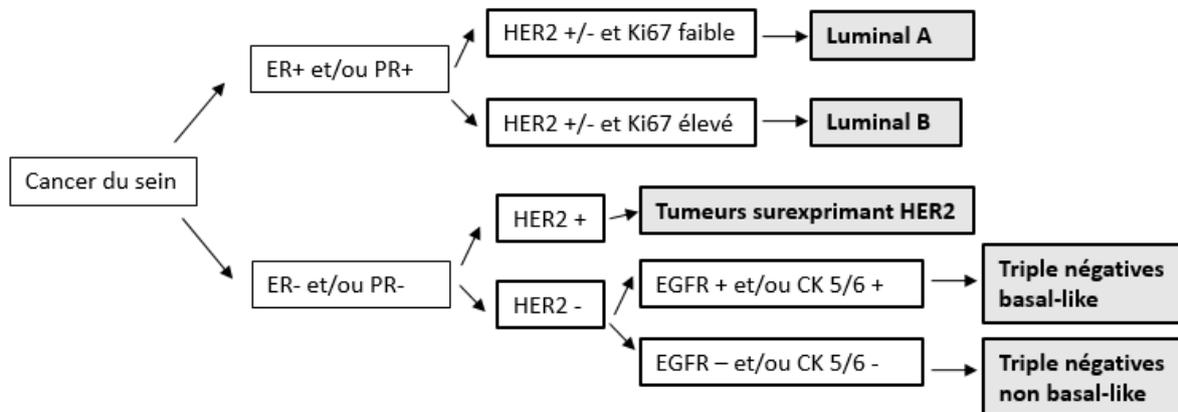


Figure 16. Classification moléculaire des cancers du sein (d'après Nielsen et al, 2004 ; Cheang et al, 2009 ; Abadie et al, 2017). Cette classification définit les sous-types luminal A, luminal B, surexprimant HER2, triple négatif basal-like et triple négatif non basal-like.

Cette caractérisation moléculaire du cancer du sein est capitale dans une prise en charge optimale de chaque patiente. En effet, les différents sous-types moléculaires ont également des caractéristiques propres en termes de pronostic, de survie et de réponse au traitement (Van't Veer et al, 2002; Raica et al, 2009).

Les tumeurs lumineales sont caractérisées par l'expression de récepteurs ER et PR. Elles sont subdivisées en luminal A et luminal B selon l'index de prolifération cellulaire Ki67 (Cheang et al, 2009). Les tumeurs de type luminal A sont positives pour ER (ER+), négatives pour HER-2, ont un Ki-67 bas (<14%) ou intermédiaire (14-19%) et des niveaux de PR élevés (≥20%). Ces tumeurs sont hormonosensibles pures, de bon pronostic et bénéficient très favorablement d'une monothérapie antihormonale (tamoxifène) (Mousseau et al, 2002). Les tumeurs de type luminal B sont, ER+, ont un Ki-67 intermédiaire ou élevé (14-19 ou ≥20%) et un faible niveau de PR (<20%). On distingue parmi les tumeurs de type luminal B les tumeurs HER2 négatives et HER2 positives. Elles ont un pronostic moins favorable et répondent mal aux traitements antihormonaux. (Cheang et al, 2009).

Les tumeurs exprimant fortement la protéine HER2 (marquage immunohistochimique de forte intensité) avec des récepteurs hormonaux négatifs sont classées en tumeurs

surexprimant HER2. Elles peuvent faire l'objet d'une chimiothérapie avec thérapie ciblée par le trastuzumab (Mousseau et al, 2002).

Les tumeurs négatives aux récepteurs hormonaux et n'exprimant pas HER2 à un niveau suffisant sont classées en tumeurs triple négatives, soit « basal-like » si elles expriment les récepteurs de cellules basales (EGFR et/ou CK 5/6), soit « non basal-like » si elles n'expriment aucun de ces marqueurs. Les résultats de la chimiothérapie sur les tumeurs « basal-like » sont peu uniformes et globalement peu satisfaisants. Dans ce contexte, de nouvelles molécules sont envisagées telles que des inhibiteurs de la protéine c-kit ou de PARP-1 (poly [ADP ribose] polymérase-1) (Linn et al, 2009; Raica et al, 2009).

Chez la chienne, plusieurs études ont montré que la classification moléculaire appliquée pour les cancers du sein pouvait également être appliquée pour les tumeurs mammaires canines en utilisant les 5 mêmes sous-types moléculaires (Gama et al, 2008; Sassi et al, 2010; Kim et al, 2013; Im et al, 2014; Abadie et al, 2017). Selon les études, la prévalence des différents sous-types est variable. Il est également à noter que le seuil défini pour considérer une surexpression de HER2+ est variable. Le test Herceptest issu de la médecine humaine définit 3 niveaux d'expression de HER2 (0, 1+,2+,3+), un seuil d'expression à 2+ a parfois été considéré (étude de Gama et al, 2008) ou un seuil à 3+ (étude de Abadie et al, 2017). Dans cette dernière étude, aucune tumeur HER2+ n'avait pu être identifiée.

D. Traitements

Le traitement des cancers du sein repose sur une approche multimodale pouvant associer chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, hormonothérapie, et thérapies ciblées.

Chez la chienne, il n'existe pas de recommandations consensus pour le traitement des tumeurs mammaires, ce qui peut poser des problèmes d'uniformité des traitements administrés pour les études sur les marqueurs pronostics. Le traitement repose essentiellement sur la chirurgie, mais des approches complémentaires comme la chimiothérapie et les traitements anti-COX 2 sont de plus en plus utilisées en routine.

1. Chirurgie

Chez la femme, la chirurgie est souvent le premier traitement réalisé. Le type de chirurgie dépend de la taille de la tumeur par rapport au volume du sein, de la présence d'une lésion unique ou de lésions multiples, d'antécédents éventuels de radiothérapie, si l'on est en présence d'une récurrence, et du caractère inflammatoire de la tumeur. La chirurgie conservatrice ou mastectomie partielle consiste à retirer la tumeur avec une marge de tissus sains tout en conservant la plus grande partie du sein possible. Elle peut être précédée d'une chimiothérapie ou d'une hormonothérapie néoadjuvante. La chirurgie non conservatrice ou mastectomie totale est indiquée lors de tumeur volumineuse, mal localisée ou conformée, ou lors de tumeurs multiples. On y associe toujours en cas de carcinome invasif, une évaluation ganglionnaire sur le même temps opératoire par prélèvement du ganglion sentinelle ou par curage axillaire (mastectomie radicale modifiée) (Inca b, 2017).

Chez la chienne, le traitement chirurgical est le traitement de base des tumeurs mammaires, et est toujours envisagé en priorité. Un diagnostic précis et un bilan d'extension doivent être obtenus avant toute chirurgie, définissant si l'objectif sera curatif ou palliatif. La chirurgie est curative en absence de métastases pour 100% des chiennes présentant des tumeurs bénignes et 50% des chiennes présentant des tumeurs malignes (Straw, 2005). Environ 75% des chiennes avec des tumeurs de la glande mammaire seront donc traitées de façon adéquate par excision chirurgicale seule. En cas de métastases, la chirurgie est uniquement palliative et sera réalisée sur des tumeurs ulcérées, douloureuses ou volumineuses. L'intérêt de la chirurgie est limité en cas de CMI ou de carcinose cutanée. En pratique, l'étendue de l'exérèse chirurgicale est modulée par le vétérinaire en fonction de la situation clinique. Le vétérinaire pourra procéder à une nodulectomie ou mammectomie simple/régionale sur des nodules de petite taille (<1cm), non adhérents et sans adénopathie associée. Cependant, dans l'étude menée par Stratmann en 2008, sur 99 chiennes avec mammectomie régionale, 58% présentaient ensuite une nouvelle tumeur mammaire sur la portion restante de la chaîne mammaire (Stratmann et al, 2008). Par ailleurs, le développement de tumeurs mammaires secondaires a été rapporté chez environ 70% des chiens avec une tumeur maligne traités par nodulectomie (Sorenmo et al,

2013). Les recommandations actuelles sont une exérèse de la chaîne mammaire complète, avec 2 cm de marges latérales, en incluant le fascia musculaire voire les muscles de la paroi abdominale lors d'infiltration plus profonde (Lana et al, 2007; Biller et al, 2016). La nodulectomie peut être un complément intéressant à l'ablation de la chaîne complète controlatérale en cas de tumeurs localisées sur les deux chaînes mammaires. Une ablation des deux chaînes est possible, mais à un mois d'intervalle car cette chirurgie est délabrante.

Dans les deux espèces, suite à l'intervention, un point primordial de l'examen anatomopathologique est l'analyse des marges d'exérèse, qui permettra de déterminer si les marges sont saines, limites ou infiltrées. En cas de marges infiltrées (Figure 17), une réintervention est envisagée. L'analyse des marges pourra mener à la décision d'une reprise chirurgicale en cas de marges infiltrées ou de marges limites sur une tumeur agressive.

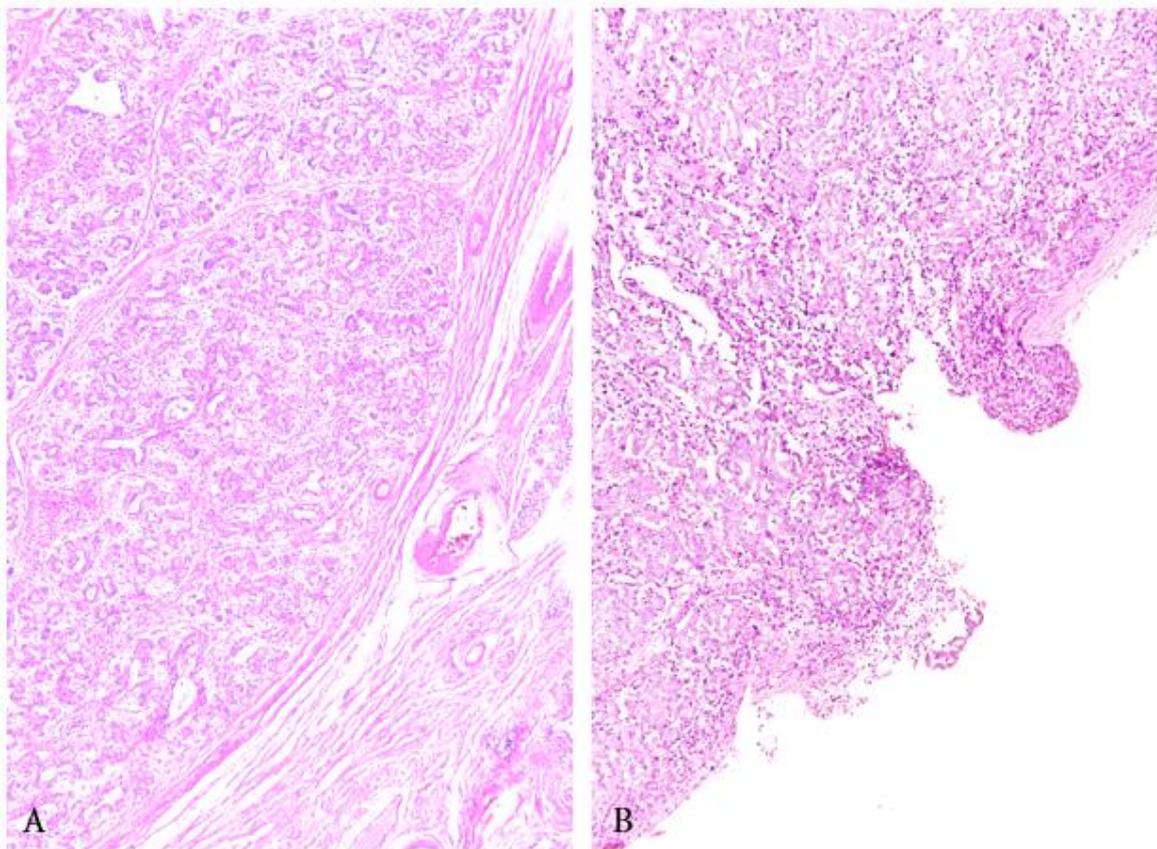


Figure 17. Analyse des marges d'exérèse chirurgicales de tumeurs mammaires canines. A. Marges chirurgicales saines, avec une capsule tumorale intacte et une marge de tissus sains. B. Marges chirurgicales infiltrées avec effraction de cellules cancéreuses hors de la capsule tumorale en marge de la pièce d'exérèse chirurgicale (photographie : Bernadette Rogez et Quentin Pascal, OCR).

2. Radiothérapie

La radiothérapie utilise des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses. Les rayonnements ionisants entraînent l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), responsables de lésions cellulaires au niveau des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Au niveau de l'ADN, l'irradiation provoque des dommages tels que des cassures double-brin (Tutt et al, 2006).

Chez la femme, le but de la radiothérapie est de détruire les cellules cancéreuses résiduelles pour diminuer le risque de récurrence, en traitant la glande mammaire et le lit tumoral après une chirurgie conservatrice, la paroi thoracique en cas de chirurgie non conservatrice, les ganglions de la chaîne mammaire interne et sus-claviculaires quel que soit le type de chirurgie en cas d'atteinte ganglionnaire.

Chez la chienne, la radiothérapie est exceptionnelle dans les tumeurs mammaires : son accessibilité est restreinte (très peu de centres la pratiquent en France), il n'y a pas de protocole établi pour les tumeurs mammaires, elle nécessiterait une anesthésie à chaque séance, et son efficacité n'a pas été démontrée (Sorenmo, 2003).

3. Traitements médicaux

a. Chimiothérapie

Un traitement systémique par chimiothérapie est utilisé comme traitement adjuvant des cancers du sein infiltrants ou comme traitement des cancers du sein métastatiques. La durée totale du traitement et leur mode d'administration (intraveineux (IV) ou par voie orale (PO)) sont variables en fonction des molécules utilisées et de l'objectif de la chimiothérapie. Dans le traitement adjuvant des cancers du sein infiltrants, les principales molécules utilisées par voie IV sont les anthracyclines et les taxanes. Le protocole FEC associe 5-FU (F), épirubicine (E) et cyclophosphamide (C) administrées en 4 à 6 séances de perfusion espacées de 3 semaines. Le plus souvent, la chimiothérapie adjuvante est un protocole séquentiel (anthracyclines suivies des taxanes) avec 3 injections de FEC ou EC suivies de 9 injections de paclitaxel. Pour traiter les

cancers du sein métastatiques ou récidivants, la gemcitabine (en association avec le paclitaxel), la vinorelbine, et la capécitabine sont également utilisés (Inca b, 2017).

Chez la chienne, l'utilisation de chimiothérapie comme traitement adjuvant est peu documentée et controversée. Son administration demande des précautions particulières, et tous les centres vétérinaires ne la pratiquent pas. Les effets secondaires sont moins importants que chez l'homme mais peuvent inclure une toxicité hématologique et cardiaque (doxorubicine). La chimiothérapie est recommandée pour les tumeurs de haut grade ou lors de mise en évidence d'embolies à l'histologie. Les agents principalement utilisés dans ce contexte sont les anthracyclines (doxorubicine et mitoxantrone), le 5-FU, le cyclophosphamide et le carboplatine (Karayannopoulou et al, 2001; Simon et al, 2006; Lavalle et al, 2012; Tran et al, 2014). Son intérêt est à discuter au cas par cas.

b. Hormonothérapie

Chez la femme, 80% des cancers du sein sont hormonosensibles et peuvent bénéficier d'une hormonothérapie, qui consiste à empêcher l'action stimulante des hormones féminines (oestrogènes et progestérone) sur les cellules cancéreuses. L'hormonothérapie est la plupart du temps adjuvante et mise en place après la chimiothérapie et/ou la radiothérapie, exceptionnellement néo-adjuvante pour réduire la taille tumorale ou en cas de CMI. Elle a pour objectifs de réduire le risque de récurrence locale, d'atteinte contralatérale, ou d'évolution métastatique (Inca b, 2017).

Chez la chienne, l'hormonothérapie est inexistante. Le tamoxifène (antagoniste ER) n'est pas toléré et cause fréquemment des pyomètres (Morris et al, 1993 ; Tavares et al, 2010). L'aglépristone (antagoniste PR) ralentirait la prolifération des carcinomes exprimant les récepteurs à la progestérone mais n'est pas utilisée en pratique (Guil-Luna et al, 2011).

c. Anti-COX2

Chez la femme, l'utilisation des anti-COX2 est peu développée.

Chez la chienne, l'utilité des AINS anti-COX2 a été prouvée en tant que traitement palliatif lors de tumeurs non opérables ou à un stade avancé, ou dans le traitement des CMI et aboutissait à un meilleur taux de survie qu'une chirurgie seule (de Souza et al, 2009 ; Lavallo et al., 2012 ; Simeon et al, 2013 ; Arenas et al, 2016). Ils peuvent éventuellement être utilisés en complément d'une chimiothérapie adjuvante. Les principales molécules utilisées sont le firocoxib, le robénacoxib, le méloxicam, le piroxicam et le carprofène, en traitement par voie orale (PO) quotidien. Les anti-COX2 sont à la portée de tous les vétérinaires et d'administration simple à l'animal, et sont appelés à se développer dans le traitement des carcinomes mammaires canins.

d. Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées peuvent être soit des anticorps monoclonaux, soit des inhibiteurs de tyrosine kinase bloquant des mécanismes spécifiques des cellules cancéreuses. Le lapatinib (Tyverb®) est un inhibiteur de la tyrosine kinase et le trastuzumab (Herceptin®) est un anticorps monoclonal, sont deux thérapies ciblées utilisées dans les cancers du sein surexprimant HER2 (Ghosh et al, 2011 ; Vogel et al, 2002). Chez le chien, le trastuzumab a été envisagé comme thérapie potentielle, mais les essais en sont encore à leurs balbutiements (Ressel et al, 2013 ; Fazekas et al, 2016). D'autres thérapies ciblées incluent le bévacizumab (Avastin®), un anticorps monoclonal, se fixant sur le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et bloquant la néo-angiogénèse, et l'everolimus (Afinitor®), un inhibiteur de tyrosines kinases.

e. Médecines non conventionnelles

Chez le chien, deux médicaments non conventionnels peuvent être intégrés et le seront de plus en plus dans les stratégies globales anti-tumorales.

Les extraits de gui fermenté (*Viscum album*) sont utilisés en complément des traitements conventionnels ou de façon alternative quand ceux-ci ne sont pas appropriés ou refusés par les propriétaires. L'amélioration de la qualité de vie est l'élément le plus spécifique

de l'utilisation du *Viscum album* en cancérologie, en plus de ses activités anti-angiogéniques, anti-COX2, et immunostimulantes (Blostin et al, 2017).

Le Versikor[®] 500 (SumLabVet) contient des polysaccharopeptides extraits du mycelium de la souche COV-1 du champignon *Coriolus Versicolor*. Du fait de sa très large utilisation en Asie, le PSP a fait l'objet d'un nombre très important d'études scientifiques chez l'homme. Le PSP contribue au fonctionnement de l'immunité, agit sur les cellules cancéreuses de façon ciblée, et potentialise certaines drogues de chimiothérapie. Il permet une amélioration de la qualité de vie en diminuant les effets paranéoplasiques et les effets indésirables de la chimiothérapie et radiothérapie. Il a déjà été testé avec succès sur des hémangiosarcomes canins (Brown et al, 2012) et devrait s'étendre à d'autres applications en cancérologie vétérinaire dans les années à venir.

4. Perspectives thérapeutiques : l'immunothérapie

Le nombre d'essais cliniques en immunothérapie dans le cancer du sein est en augmentation constante, à la fois dans le cadre métastatique et néo-adjuvant, mais pour l'instant aucune immunothérapie expérimentale n'a eu d'approbations par la FDA.

Les stratégies les plus prometteuses sont les anticorps monoclonaux anti-PD-L1 et PD-1 dans le traitement de patientes avec un cancer du sein triple négatif métastasé. Dans ces études, le taux de réponse (ORR) varie de 12 à 19%. Les objectifs concernant les inhibiteurs de PD-1/PD-L1 consistent désormais à identifier des biomarqueurs prédictifs de la réponse, et à l'utiliser en combinaison avec d'autres agents d'immunothérapie (Polk et al, 2018 ; Monneur et al, 2018). Le blocage de CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) semble peu efficace, les combinaisons de PD-1 et CTLA-4 sont encore à l'étude. Les immunothérapies utilisant des lymphocytes T modifiés appelés Chimeric antigen receptor T cells (CAR T-cells) sont dans les premières phases de développement, et des études randomisés avec des vaccins thérapeutiques chez les patients atteints de cancers du sein locaux ou avancés ont pour l'instant donné des résultats négatifs (Vonderheide et al, 2017).

Conclusion sur les cancers du sein et tumeurs mammaires canines

Il existe des points de divergence et de convergence des tumeurs mammaires chez la femme ou chez la chienne. Les tumeurs mammaires sont le cancer le plus fréquent dans les deux espèces, le carcinome étant le type histologique plus représenté. La femme et la chienne partagent de nombreux autres points communs, incluant des facteurs de risque identiques (âge, exposition aux hormones sexuelles, obésité), les mêmes étapes de tumorigénèse avec un continuum entre lésions bénignes et malignes, les mêmes facteurs pronostiques. Les points de divergence majeurs concernent la différence physiologique de cycles sexuels et donc d'imprégnation hormonale, l'augmentation du risque lié aux lactations de pseudo-gestation chez la chienne, l'existence de carcinomes complexes ou mixtes chez la chienne, des moyens de diagnostic beaucoup plus poussés chez la femme (dépistage et imagerie développée en médecine humaine, diagnostic plus tardif chez la chienne), et enfin des approches thérapeutiques différentes (chez la chienne la radiothérapie est exceptionnelle, la chimiothérapie est basée sur l'empirisme, l'intérêt de l'hormonothérapie est mal défini).

III. Cellules souches

A. Cellules souches normales

1. Mise en évidence

La mise en évidence des cellules souches remonte aux travaux pionniers de James Till et Ernest McCulloch sur les précurseurs hématopoïétiques à l'Ontario Cancer Institute (Toronto, Canada) en 1961. Till et McCulloch ont étudié l'effet des radiations ionisantes sur la souris. Ils ont montré que l'injection de cellules de MO à une souris syngénique préalablement irradiée, ne possédant plus de cellules hématopoïétiques résidentes, permettait de protéger cette souris de la mort par déplétion hématopoïétique (McCulloch et al, 1960). Till et McCulloch ont répété cette expérience en réalisant des autopsies sur les souris 10 jours après injection de MO. Ils ont alors remarqué des nodules spléniques contenant des cellules en division se différenciant dans les trois lignées sanguines majeures : érythroïétique, myéloïétique et mégacaryocytaire. Ainsi, des précurseurs présents dans la MO injectée étaient capables de donner naissance à des colonies myéloérythroïdes dans la rate. Le nombre de nodules (ou colonies) était directement proportionnel au nombre de cellules de MO viables injectées chez les souris irradiées : environ 10.000 cellules de MO pour chaque nodule observé (Till et al, 1961).

Les travaux d'Andrew Becker avec des marqueurs chromosomiques anormaux permirent ensuite d'établir la nature clonale des nodules, formés à partir d'une cellule unique (Becker et al, 1963). Puis, avec Louis Siminovitch, ils mirent en évidence la capacité d'auto-renouvellement de ces précurseurs : ils séparèrent les nodules spléniques en leurs composants cellulaires et les injectèrent à des souris receveuses secondaires irradiées, qui développèrent à leur tour des nodules spléniques (Siminovitch et al, 1963).

En partant du cas des cellules souches hématopoïétiques (CSH), Till et McCulloch ont ainsi défini qu'une cellule souche est une cellule indifférenciée (non spécialisée) multipotente, capable lorsqu'elle est dans un environnement approprié, (i) de s'auto-renouveler indéfiniment par division cellulaire et (ii) de générer d'autres types cellulaires plus spécialisés.

En 1990, Potten et Loeffler apportèrent une nouvelle définition des cellules souches, les définissant comme des cellules indifférenciées capables (1) de prolifération, (2) d'auto-

renouvellement, (3) de production d'un grand nombre de cellules filles fonctionnelles différenciées, (4) de régénération d'un tissu après une blessure et (5) de flexibilité dans ces différentes options (Potten et al, 1990).

2. Propriétés des cellules souches normales

a. Potentialité

La potentialité désigne la capacité d'une cellule à se différencier en donnant des types cellulaires différents. Lorsque que les cellules évoluent depuis l'état de cellule souche jusqu'à leur différenciation terminale, leur potentialité diminue tandis que leur degré de différenciation augmente (Chen et al, 2017). On distingue 4 types de cellules souches selon leur potentialité : les cellules souches totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes (Figure 18).

Les cellules souches totipotentes sont issues des premières divisions de l'oeuf fécondé. Elles peuvent donner naissance à tous les types cellulaires de l'organisme et au tissu extra-embryonnaire (placenta, cordon ombilical). Seules ces cellules peuvent être à l'origine d'un embryon capable de s'implanter dans l'utérus (Mintz et al, 1975 ; Illmensee et al, 1976).

La pluripotence est une propriété transitoire des cellules embryonnaires pendant le développement embryonnaire précoce. Les cellules pluripotentes sont capables de se différencier en chacun des trois feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme) et par extension en tous les types cellulaires à l'origine d'un organisme adulte, mais ne peuvent pas se différencier en tissu extra-embryonnaire (Evans et al, 1981 ; Thomson et al, 1998).

Les cellules souches multipotentes peuvent être des cellules souches embryonnaires ou des cellules souches adultes (ou somatiques). Elles sont capables de générer plusieurs types cellulaires. Chez l'adulte, elles sont impliquées dans la régénération tissulaire, après une lésion ou suite au vieillissement. Des cellules souches somatiques multipotentes sont par exemple les CSH pouvant donner naissance à toutes les lignées sanguines ou les cellules souches neurales, à l'origine des neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Copley et al, 2012).

Les cellules souches unipotentes sont une catégorie de cellules souches somatiques. Elles ne peuvent générer qu'un seul type cellulaire. Les cellules souches des cryptes intestinales, de la

peau, du foie ou du bulbe pileux sont unipotentes (Barker et al, 2012 ; Blanpain et al, 2006 ; Forbes et al, 2002 ; Fuchs et al, 2013).

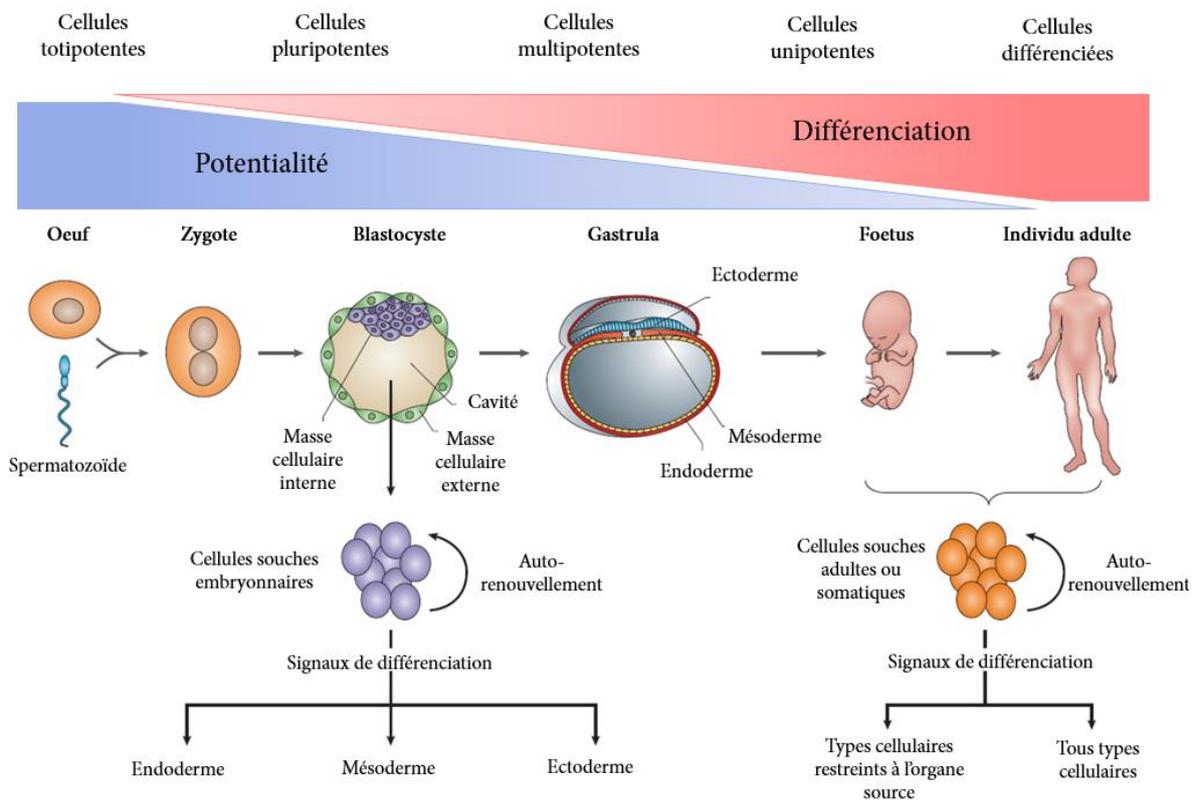


Figure 18. Evolution des cellules souches entre potentialité et différenciation (adapté de O'Connor et al, 2006). Les cellules souches embryonnaires (totipotentes, pluripotentes ou multipotentes) ont une forte potentialité et une faible différenciation alors que les cellules souches adultes ou somatiques (cellules unipotentes) ont une forte différenciation mais une faible potentialité.

b. Capacité d'autorenouvellement

L'auto-renouvellement désigne la capacité des cellules à proliférer tout en maintenant leur pluripotence et leur potentiel régénératif (Fuchs et al, 2013). Pour cela, les cellules doivent être capables d'entrer dans le cycle cellulaire, de se diviser, et de générer au moins une cellule fille avec un potentiel de développement similaire à celui de la cellule mère (He et al, 2009).

La capacité d'auto-renouvellement est essentielle pour les cellules souches qui doivent être capables d'augmenter leur nombre au cours du développement, d'être maintenues dans les tissus adultes, et de restaurer leur pool après une blessure. Cependant, l'auto-renouvellement n'est pas restreint aux cellules souches : des cellules aux potentialités plus restreintes, appelées

cellules progénitrices ou cellules d'amplification transitoire, peuvent également s'auto-renouveler (He et al, 2009), mais uniquement à court terme contrairement aux cellules souches qui peuvent s'autorenouveler à long terme (Fuchs et al, 2013).

La plupart des populations de cellules souches peuvent se diviser de façon symétrique ou asymétrique (Figure 19). Les divisions symétriques produisent deux cellules filles identiques à la cellule souche d'origine, ce qui contribue à l'amplification du compartiment de cellules souches. Ce type de division prédomine lorsque les cellules souches doivent augmenter en nombre, comme pendant le développement ou après une lésion. Les divisions asymétriques génèrent une cellule souche identique à la cellule d'origine et une cellule progénitrice, qui s'engage dans un processus de différenciation spécifique du tissu dans lequel elle se situe (He et al, 2009). Elles permettent de maintenir une balance entre un pool de cellules souches et des cellules différenciées. Elles se caractérisent par la polarisation du plan de clivage et une ségrégation disproportionnée de certains composants dans les cellules filles lors de la mitose. Par exemple, chez la Drosophile, la distribution asymétrique de Numb conduit à la formation de deux cellules filles différentes (Neumüller et al, 2009). De façon similaire, les cellules souches de mammifères peuvent s'auto-renouveler de façon asymétrique dans le système nerveux central, la couche basale de l'épiderme ou le muscle (Huttner et al, 2005; Kuang et al, 2007; Lechler et al, 2005).

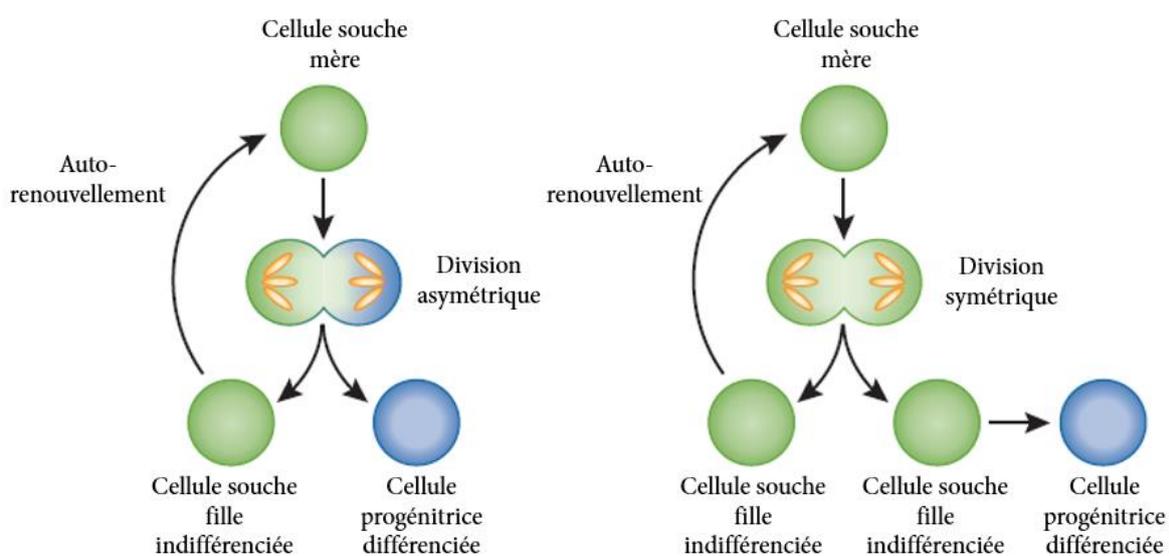


Figure 19. Auto-renouvellement des cellules souches par division symétrique ou asymétrique (d'après Fuchs et al, 2013). Lors de division asymétrique, les facteurs ne sont pas répartis de façon équitable entre les cellules filles.

c. Plasticité : différenciation et reprogrammation

L'évolution des cellules souches jusqu'à leur différenciation finale en cellules spécialisées suit une évolution hiérarchique bien définie mais peut également faire preuve de plasticité cellulaire (Figure 20). Cette plasticité a été démontrée pour la première fois par Martin Eglitis et Eva Mezey en 1997 : en transplantant des cellules souches de MO dans le cerveau de souris adultes et sous l'influence de leur nouvel environnement, celles-ci ont pu générer des astrocytes et des cellules de la microglie (Eglitis et al, 1997). Une cellule souche adulte d'un lignage cellulaire peut donc générer des cellules différenciées issues d'un autre lignage cellulaire. Par ailleurs, des cellules d'un épithélium en différenciation terminale peuvent changer de phénotype à travers l'activation de la TEM, qui permet la transdifférenciation, et la conversion de cellules épithéliales en cellules aux propriétés mésenchymateuses. Ces programmes peuvent être activés en cas de réparation tissulaire et de stress pathologiques (Kalluri et al, 2009).

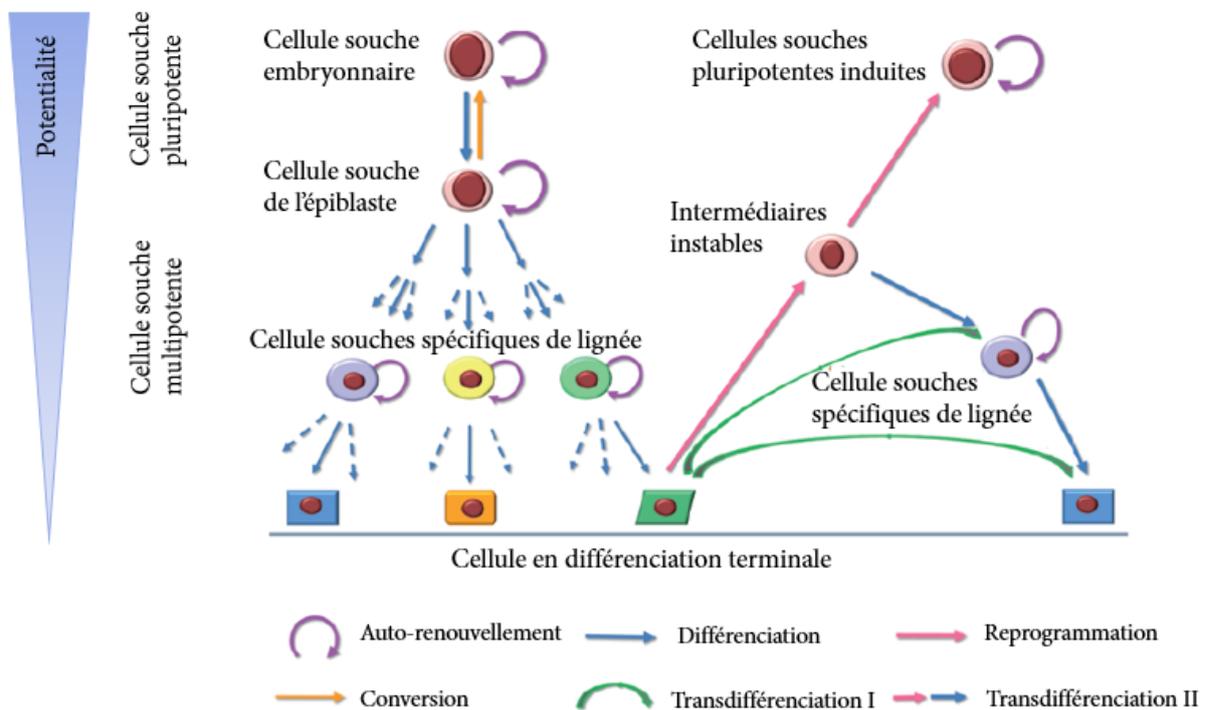


Figure 20. Plasticité des cellules souches, transdifférenciation et reprogrammation. Les cellules souches se différencient progressivement pour devenir des cellules souches spécifiques de lignées puis des cellules différenciées. Ces cellules différenciées peuvent subir une reprogrammation qui aboutit à des cellules souches pluripotentes induites, capables d'autorenouvellement. Les intermédiaires stables ou peuvent à leur tour se différencier en cellules souches spécifiques de lignée et donner naissance à des cellules différenciées d'une lignée différente de la cellule d'origine (d'après Zhang et al, 2012)

La pluripotence peut être induite *in vitro* dans des cellules différenciées/somatiques via plusieurs méthodes, le transfert nucléaire somatique, la fusion cellulaire et la reprogrammation nucléaire directe, regroupées sous le terme de « reprogrammation » (Wu et al, 2016 ; Yamanaka et al, 2010). La reprogrammation nucléaire directe a été créée par des chercheurs de l'université de Kyoto en 2006, sur des fibroblastes murins (Takahashi et al, 2006). Elle permet de former des cellules souches pluripotentes induites (CSPi), qui présentent des caractéristiques comparables à celles des cellules souches embryonnaires (CSE) en termes de morphologie, de prolifération et d'expression de marqueurs de pluripotence, à partir de quasiment tous les types cellulaires (Amabile et al, 2009; Wernig et al, 2007). Elles peuvent être générées par l'introduction via des rétrovirus de 4 gènes codant pour des facteurs de transcription impliqués dans la pluripotence des CSE : Oct-4, sox-2, Klf4 et c-Myc. L'état de pluripotence est maintenu lors des divisions cellulaires, ce qui permet de générer un grand nombre de cellules avec des applications cliniques potentielles.

d. Phénomène de quiescence

Le potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches n'implique pas nécessairement que ces cellules prolifèrent de façon continue en condition physiologique. Au contraire, à chaque instant seule une faible proportion de cellules souches entre en cycle, alors que la majorité demeure en phase G0 du cycle cellulaire, ou phase de quiescence. Dans la plupart des tissus (peau, sang, intestin), l'auto-renouvellement est strictement lié à la régénération tissulaire et au maintien de l'homéostasie cellulaire. La régulation de la balance entre prolifération et quiescence permet d'éviter l'épuisement du pool de cellules souches pour maintenir un stock tout au long de la vie d'un individu (Trumpp et al, 2010). De plus, l'état de quiescence permet de protéger les cellules souches contre les stress génotoxiques (radiations, produits toxiques, stress oxydatif,...) (Alison et al, 2012).

3. Facteurs clés de la pluripotence et de l'autorenouvellement
 - a. Facteurs de transcription

Le maintien de la pluripotence des cellules souches est principalement garanti par un réseau de régulation transcriptionnelle appelé PGRN (Pluripotency Gene Regulatory Network) (Li et al, 2018). L'analyse de la machinerie transcriptionnelle des CSE a révélé que la plupart des gènes responsables du maintien de la pluripotence ou de l'autorenouvellement doivent être activés par au moins cinq facteurs de transcription différents (Kim et al, 2008). Trois d'entre eux, Oct-4 (OCtamer-binding Transcription factor-4), Sox-2 (Sex determining Region Y-box-2) et Nanog, sont considérés comme critiques pour garantir l'autorenouvellement et le maintien de la pluripotence dans les CSE (Chambers et al, 2003; Hay et al, 2004). A cette triade de cœur s'ajoutent c-Myc et Klf4 (Krüppel-like factor 4). L'importance de ces facteurs a été démontrée par les expériences de reprogrammation (Takahashi et al, 2006).

Nanog est un facteur de transcription à homéodomaine (Chambers et al, 2003; Mitsui et al, 2003). Sox-2 est un membre de la famille de facteurs de transcription Sox, capables de lier l'ADN de façon spécifique via leur domaine HMG (High Mobility Group). (Schepers et al, 2002). De façon générale, Sox-2 régule la détermination cellulaire en inhibant l'expression de facteurs de transcription spécifiques aux différents lignages (Sarkar et al, 2013). Oct-4 est codé par le gène POU5f1 (POU domain, class 5, *transcription* factor 1). Il est l'un des facteurs de transcription les plus précocement exprimés au cours du développement embryonnaire. Il peut agir comme répresseur de transcription en recrutant des PcG pour inhiber la transcription de gènes spécifiques de lignages cellulaires (Squazzo et al, 2006). c-Myc est un facteur de transcription impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires (régulation du cycle cellulaire et du métabolisme, maintien de la chromatine, synthèse des ARN et des protéines, différenciation, etc...) en interagissant avec les régions régulatrices de milliers de gènes cibles (Smith et al, 2010). Klf4 appartient à la famille des facteurs de transcription Sp1-like. Il agit à la fois comme activateur et répresseur transcriptionnel. Il joue un rôle dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Le rôle de Klf4 dans le maintien de la pluripotence et de l'autorenouvellement est étroitement connecté à celui de c-Myc (Yamanaka, 2007).

b. Les voies canoniques de signalisation

De nombreuses voies de signalisation régulent la biologie des cellules souches, notamment trois voies du développement très conservées : Wnt, Hedgehog et Notch (Figure 21). Ces trois voies canoniques régulent l'auto-renouvellement à la fois dans les cellules souches embryonnaires et adultes (Lai et al, 2004 ; Polakis et al, 2007 ; Dessaud et al, 2008). Leur activation est très dépendante du contexte cellulaire et peut-être liée à des facteurs présents dans la niche ou à des facteurs intrinsèques, comme les facteurs de transcription liés à la pluripotence (Kléber et al, 2004). Ainsi, les conséquences biologiques de l'activation d'une voie ou une autre peuvent varier du maintien voire de l'expansion de la population de cellules souches à l'induction de leur différenciation (Neumüller et al, 2009).

Les protéines Wnt sont des glycoprotéines solubles. Leur lien aux récepteurs de la famille Frizzled (FZD) entraîne une cascade de signalisation aboutissant à l'accumulation de la β -caténine et à sa translocation dans le noyau. De cette façon, la β -caténine peut former un complexe avec les facteurs de transcription TCF/LEF (TCF : T Cell Factor, LEF : Lymphocyte Enhancer Factor) et moduler l'expression de nombreux gènes impliqués dans la pluri/multipotence (Saito-Diaz et al, 2013).

Les protéines Hedgehog (Hh) – Sonic, Indian et Desert Hedgehog – sont des protéines sécrétées qui se lient aux récepteurs membranaires Patched (PTCH1) et Smoothened (SMO), entraînant l'activation d'une cascade de signalisation qui aboutit alors à la translocation de la forme entière et active du facteur de transcription Gli dans le noyau.

La voie de signalisation Notch est très conservée entre invertébrés et vertébrés. Elle agit de manière paracrine entre deux cellules, et est activée par liaison du récepteur Notch avec un ligand transmembranaire (Delta-1 et Jagged chez les mammifères) appartenant à la cellule voisine. Le récepteur Notch est activé par clivage protéolytique et son domaine intracellulaire (Notch Intracellular Domain ou NICD) est ensuite relocalisé dans le noyau où il va jouer le rôle de facteur de transcription en s'associant avec d'autres protéines (Kopan et al, 2009).

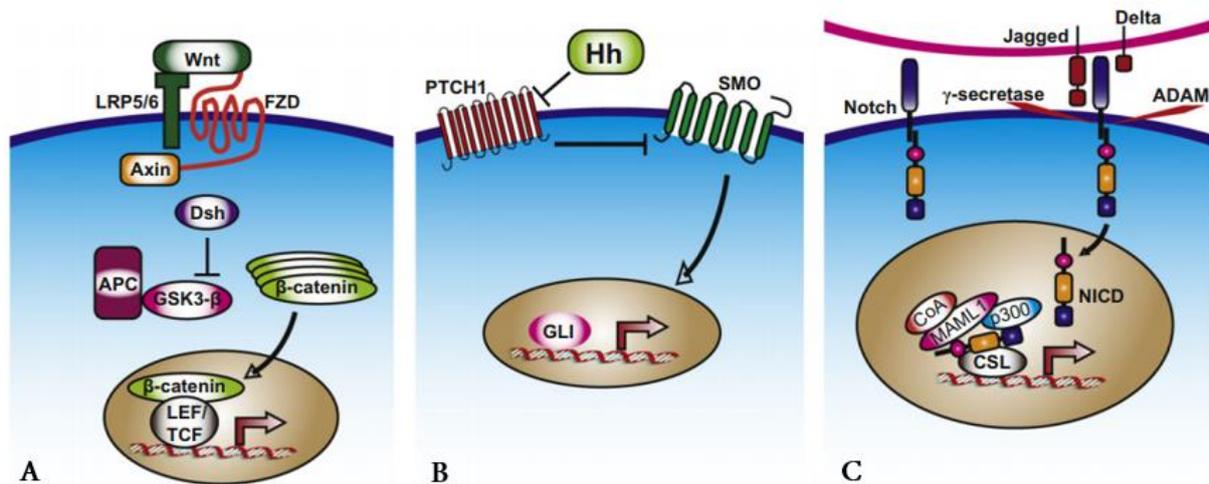


Figure 21. Les voies de signalisation canoniques (d'après Alison et al, 2012). (A) La voie Wnt. Les protéines Wnt se lient aux récepteurs de la famille Frizzled, entraînant une cascade de signalisation aboutissant à l'accumulation de la β -caténine et à sa translocation dans le noyau. (B) La voie Hedgehog. Les protéines Hedgehog se lient aux récepteurs membranaires Patched et Smoothened, entraînant l'activation d'une cascade de signalisation qui aboutit à la translocation de la forme entière et active du facteur de transcription Gli dans le noyau. (C) La voie Notch. Le récepteur Notch subit un clivage protéolytique et son domaine intracellulaire NICD est relocalisé dans le noyau où il va jouer le rôle de facteur de transcription en s'associant avec d'autres protéines.

B. Cellules souches cancéreuses

1. CSC et modèles de tumorigénèse

La théorie de l'évolution clonale, encore appelée modèle stochastique, est l'approche conceptuelle initiale du développement tumoral qui a été soutenue pendant plusieurs dizaines d'années (Nowell, 1976). Selon cette théorie, chaque cellule d'un tissu, même différenciée, est capable de proliférer de façon indéfinie et de former un clone tumoral indépendant à la suite de l'accumulation de mutations acquises de façon aléatoire. Ainsi, toutes les cellules cancéreuses possèderaient un potentiel tumorigène avec la possibilité de régénérer une tumeur par elles-mêmes (Figure 22) (Nowell, 1976 ; Reya et al, 2001). Cependant, certaines observations sont difficilement compatibles avec ce modèle. Les cellules différenciées ont un potentiel de prolifératif très inférieur à celui des cellules souches et sont souvent renouvelées, et la probabilité d'accumuler des mutations est très faible. De plus, la forte hétérogénéité que l'on

retrouve dans les tumeurs, en particulier dans les degrés de différenciation, peut difficilement être obtenue à partir de cellules très différenciées (Shipitsin et al, 2008).

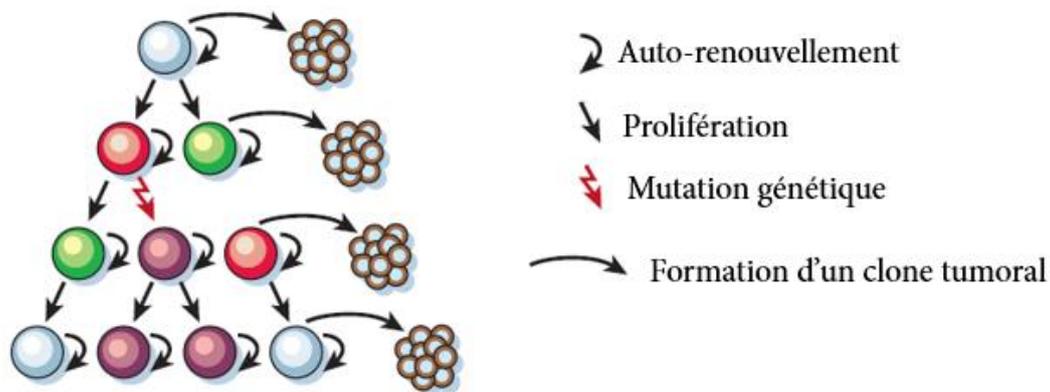


Figure 22. Modèle stochastique de développement tumoral (d'après Reya et al, 2001). Toutes les cellules cancéreuses possèderaient un potentiel tumorigène avec la possibilité de régénérer une tumeur par elles-mêmes.

Ces différentes questions trouvent leur réponse dans le modèle hiérarchique, qui considère les CSC comme le moteur du développement tumoral. Les cellules cancéreuses auraient un potentiel de prolifération limité en dehors d'un petit nombre de cellules cancéreuses, les CSC, qui, quant à elles, auraient la capacité de proliférer de façon infinie et de donner naissance à toutes les autres cellules de la masse tumorale (Figure 23) (Kleinsmith et al, 1964 ; Agliano et al, 2017). Depuis leur découverte par l'équipe de John Dick en 1997 dans les cancers hématopoïétiques (Bonnet et al, 1997), des CSC ont été isolées dans de nombreux cancers solides, tels que les cancers du sein, du colon, du pancréas, de la prostate ou du poumon (Dontu et al, 2003 ; O'Brien et al, 2007 ; Li et al, 2007 ; Ceder et al, 2008 ; Eramo et al, 2008). De même dans l'espèce canine, des CSC ont été isolées dans les ostéosarcomes, lymphomes, glioblastomes, ou encore les tumeurs mammaires (Wilson et al, 2008 ; Ito et al, 2009 ; Stoica et al, 2009 ; Michischita et al, 2011 et 2012).

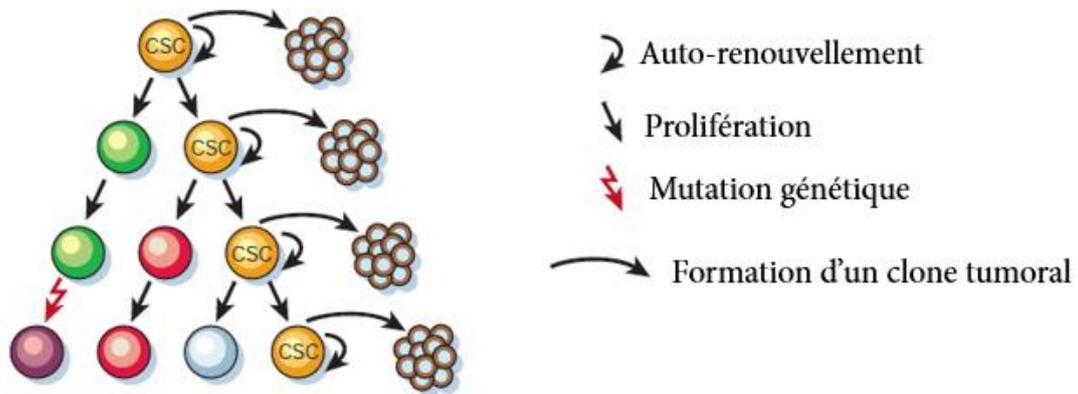


Figure 23. Modèle hiérarchique de développement tumoral (d'après Reya et al, 2001). Les cellules cancéreuses auraient un potentiel de prolifération limité en dehors d'un petit nombre de cellules cancéreuses, les CSC, qui, quant à elles, auraient la capacité de proliférer de façon infinie et de donner naissance à toutes les autres cellules de la masse tumorale.

Ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs et sont au contraire supposés coexister lors du développement tumoral (Figure 24) (Adams et al, 2008 ; Plaks et al, 2015; Cabrera et al, 2015). En effet, les CSC elles-mêmes présentent une évolution clonale et des CSC plus agressives peuvent être sélectionnées lorsqu'une ou plusieurs mutations supplémentaires leur donnent un avantage sélectif au niveau de l'autorenouvellement ou de la prolifération.

Une telle expansion clonale peut suivre une évolution linéaire, où un nouveau clone unique donne naissance à la population entière, générant ainsi une tumeur relativement homogène, ou une évolution ramifiée, où différents sous-clones, soutenus par des CSC génétiquement distinctes, évoluent en parallèle et génèrent des tumeurs plus hétérogènes (Hiley et al, 2014 ; Burrell et al, 2013). L'hétérogénéité intratumorale liée à ce mécanisme d'expansion clonale, serait un des éléments contribuant au développement de résistances acquises aux traitements dans les cancers du sein (Ellsworth et al, 2016). Un autre corollaire est l'hétérogénéité intertumorale, entre patients, qui ne présenteront pas forcément les mêmes clones cellulaires (Burrell et al, 2013).

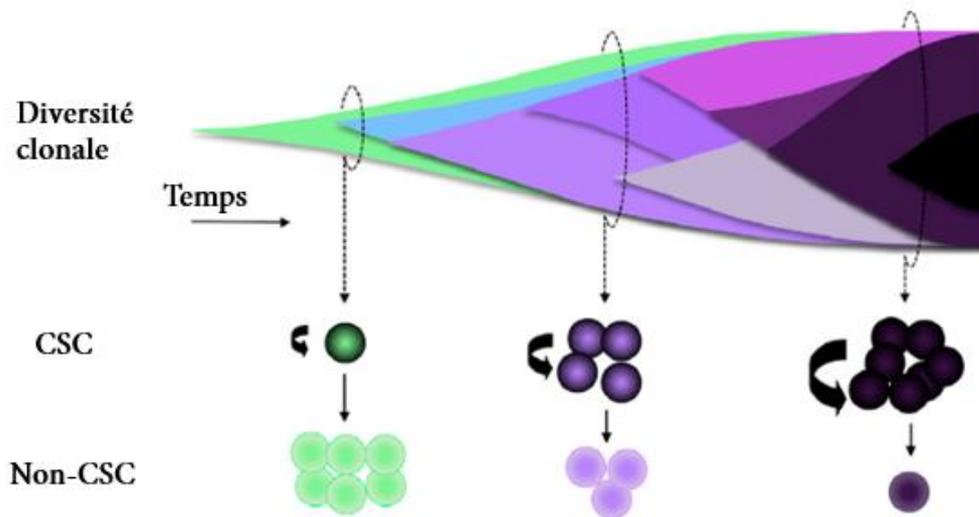


Figure 24. Modèle mixte alliant évolution clonale et CSC (d'après Kreso et al, 2010). Dans ce modèle, les CSC elles-mêmes présentent une évolution clonale. Les plus agressives sont sélectionnées lorsqu'elles présentent un avantage sélectif au niveau de l'autorenouvellement ou de la prolifération.

2. Propriétés des cellules souches cancéreuses

Les CSC sont définies par leur capacité à reformer une tumeur reproduisant l'hétérogénéité phénotypique de la tumeur initiale après inoculation dans des souris hôtes (Lobo et al, 2007). Les CSC présentent de nombreuses caractéristiques communes avec les cellules souches normales, comme la capacité d'autorenouvellement, de différenciation, une durée de vie très longue, une résistance aux drogues et toxines par l'expression des transporteurs ABC, une forte capacité de réparation de l'ADN et une résistance à l'apoptose, auxquelles s'ajoutent d'autres propriétés acquises à la suite des altérations génétiques, comme la prolifération continue et l'autonomie vis-à-vis de leur niche environnementale. Les fonctionnalités qui en découlent sont différentes chez les cellules souches normales et chez les CSC, qui peuvent alors jouer un rôle majeur dans la prolifération tumorale, la résistance aux traitements conventionnels et les métastases (Figure 25).

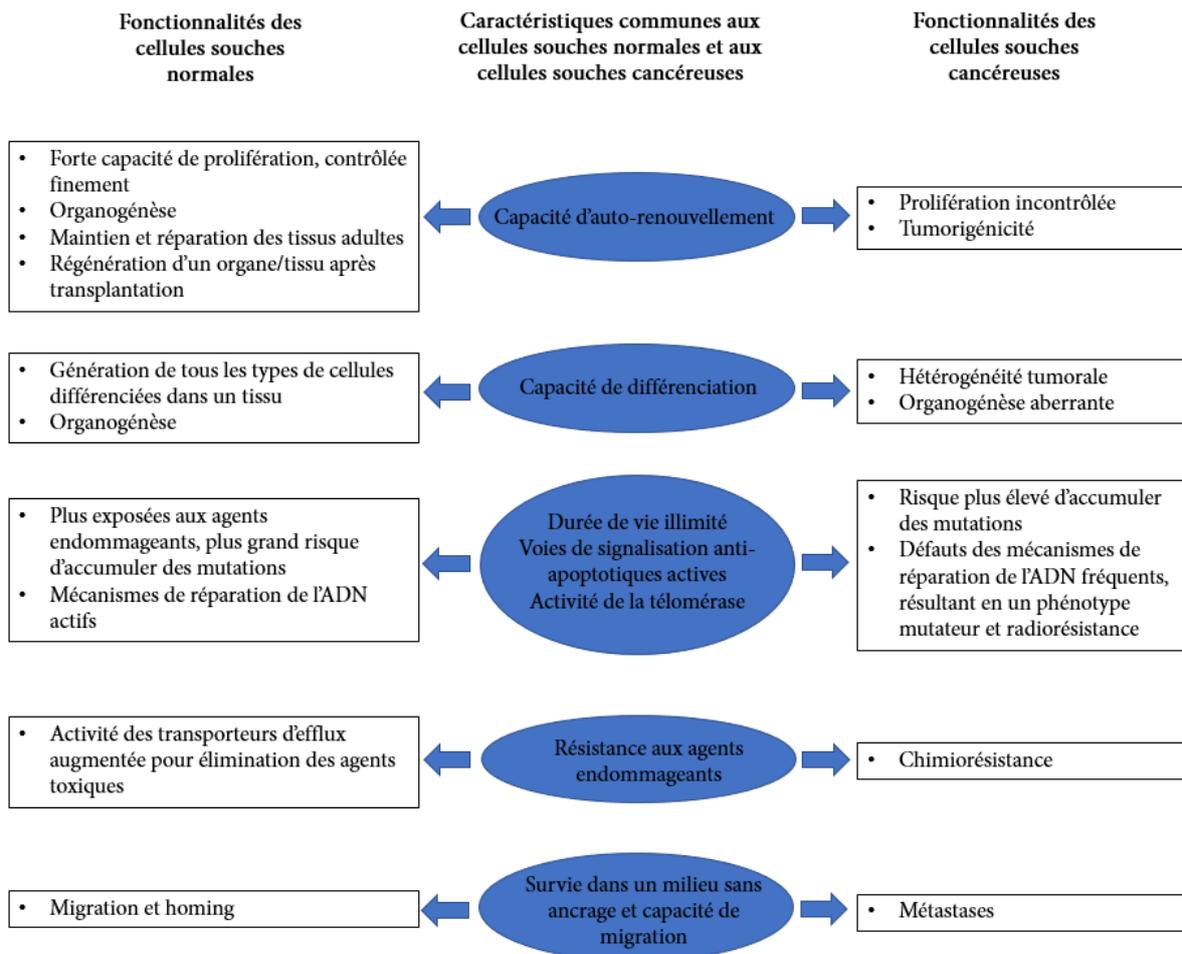


Figure 25. Caractéristiques communes aux cellules souches normales et cancéreuses et fonctionnalités de ces deux types de cellules souches (d'après Dontu et al, 2003). Les fonctionnalités qui en découlent sont différentes chez les cellules souches normales et chez les CSC, qui peuvent alors jouer un rôle majeur dans la prolifération tumorale, la résistance aux traitements conventionnels et les métastases.

Les cellules souches normales et tumorales partagent plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération, l'autorenouvellement et le maintien de l'état indifférencié (Yamanaka et al, 2008). Parmi les principales voies de signalisation concernées, on retrouve les voies canoniques Wnt/ β -caténine, Hedhehog et Notch (Matsui et al, 2016). Dans les CSC, ces voies de signalisation sont souvent altérées. La dérégulation de ces voies facilite la croissance des CSC (Karamboulas et al, 2013), la progression métastatique (Bailey et al, 2007) et la résistance aux drogues (Takebe et al, 2015). Des mutations ou des activations aberrantes de gènes impliqués dans ces voies de signalisation ont fréquemment été trouvées dans les cancers et sont associées au maintien du pool de CSC (Agliano et al, 2017).

Par ailleurs, des études suggèrent un rôle similaire des facteurs de pluripotence Sox-2, Oct-4 et Nanog dans les cellules souches normales et dans les CSC (Lu et al, 2014 ; Wang et al, 2015 ; Leis et al, 2011).

3. Origine des CSC

Une première théorie suggère que les CSC proviennent de cellules souches normales, susceptibles d'accumuler des altérations génétiques à cause de leur longévité, et qui seraient suffisantes avec le temps pour induire des transformations malignes et une croissance tumorale. Dans le cancer du sein, les CSC proviendraient ainsi directement des cellules souches adultes de l'épithélium mammaire qui seraient seules le siège des altérations génétiques tumorales. (Krivstov et al, 2006; Scheel et al, 2011 ; Jordan, 2009).

Une deuxième théorie suggère une transformation dynamique d'un état non-CSC vers un phénotype CSC et vice versa, qui serait régulée par un processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Plaks et al, 2015 ; Pattabiraman et al, 2014 ; Ye et al, 2015). La TEM est un processus dynamique et réversible, au cours duquel des cellules épithéliales adhérentes perdent leurs caractéristiques épithéliales pour acquérir des propriétés mésenchymateuses, leur permettant de migrer et d'envahir la matrice extracellulaire. Ce processus peut promouvoir la migration et l'invasion des cellules cancéreuses, et faciliter la dissémination métastatique (Froni et al, 2012). Au cours de la TEM, des facteurs de transcription tels que Snail, Slug, ZEB 1/2 et Twist sont activés. Ils sont responsables de l'inhibition d'expression de marqueurs des cellules épithéliales (E-cadhérine, cytokératines, laminine) et/ou de la surexpression de marqueurs des cellules mésenchymateuses (N-cadhérine, vimentine, fibronectine) (Figure 26) (Nieto et al, 2012).

Les marqueurs de TEM, généralement absents dans les cellules normales différenciées, sont souvent exprimés dans les cellules cancéreuses aux propriétés métastatiques (Peinado et al, 2007; Yang et al, 2004). Les propriétés mésenchymateuses des cellules cancéreuses leur confèrent des propriétés de cellules souches, comme la protection contre l'apoptose, l'échappement à la réponse immunitaire et la résistance aux chimiothérapies conventionnelles

(Gupta et al, 2009; Puisieux et al, 2006). La relation entre CSC et TEM a également été mise en évidence chez le chien (Pang et al, 2011).

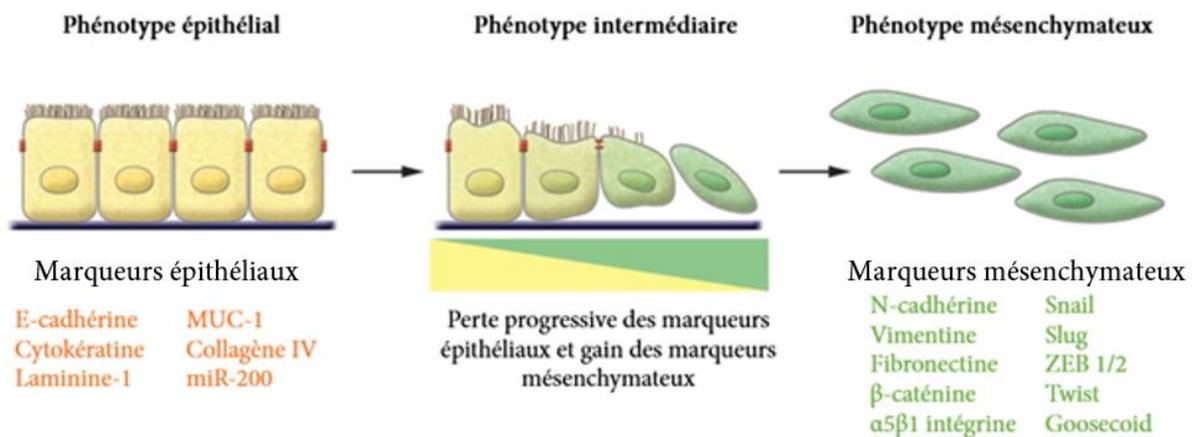


Figure 26. Marqueurs moléculaires associés à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (d'après Kalluri et al, 2009). Au cours de la TEM, des facteurs de transcription tels que Snail, Slug, ZEB 1/2 et Twist sont activés, associés à l'inhibition de marqueurs des cellules épithéliales (E-cadhérine, cytokératines, laminine) et/ou de la surexpression de marqueurs des cellules mésenchymateuses (N-cadhérine, vimentine, fibronectine).

L'interconversion spontanée entre CSC et non-CSC semble être un événement très rare et lent, qui peut être induit par plusieurs facteurs comme l'infiltration de cellules inflammatoires, les cytokines, les chimiokines et l'hypoxie, ce qui souligne encore l'importance de la niche environnementale dans la biologie des CSC (Chen et al, 2016).

4. Relation à la niche environnementale

Des signaux provenant de la niche tumorale peuvent induire et réguler le pool de CSC de la tumeur (Figure 27) (Pattabiraman et al, 2014; Plaks et al, 2015). La présence d'une vascularisation anarchique dans les tumeurs solides induit le développement d'un micro-environnement fréquemment hypoxique. L'hypoxie favorise l'autorenouvellement des cellules souches et le maintien de la multipotence, force la dédifférenciation de cellules cancéreuses en CSC et mène à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans le maintien des phénotypes EMT/CSC (Heddleston et al, 2009 et 2010; Conley et al, 2012; Semenza, 2015) Elle apporte également un avantage sélectif au CSC. L'hypoxie entraîne l'apparition d'espèces

réactives de l'oxygène (ROS), responsables de lésions dans la cellule au niveau des protéines, des lipides et des acides nucléiques (Diehn et al, 2009 ; Cairns et al, 2011). Seules les CSC sont capables de survivre car elles possèdent un système plus efficace de détoxification des ROS via une production accrue de Glutathion (GSH) (Ackerman et al, 2014 ; Agliano et al, 2017).

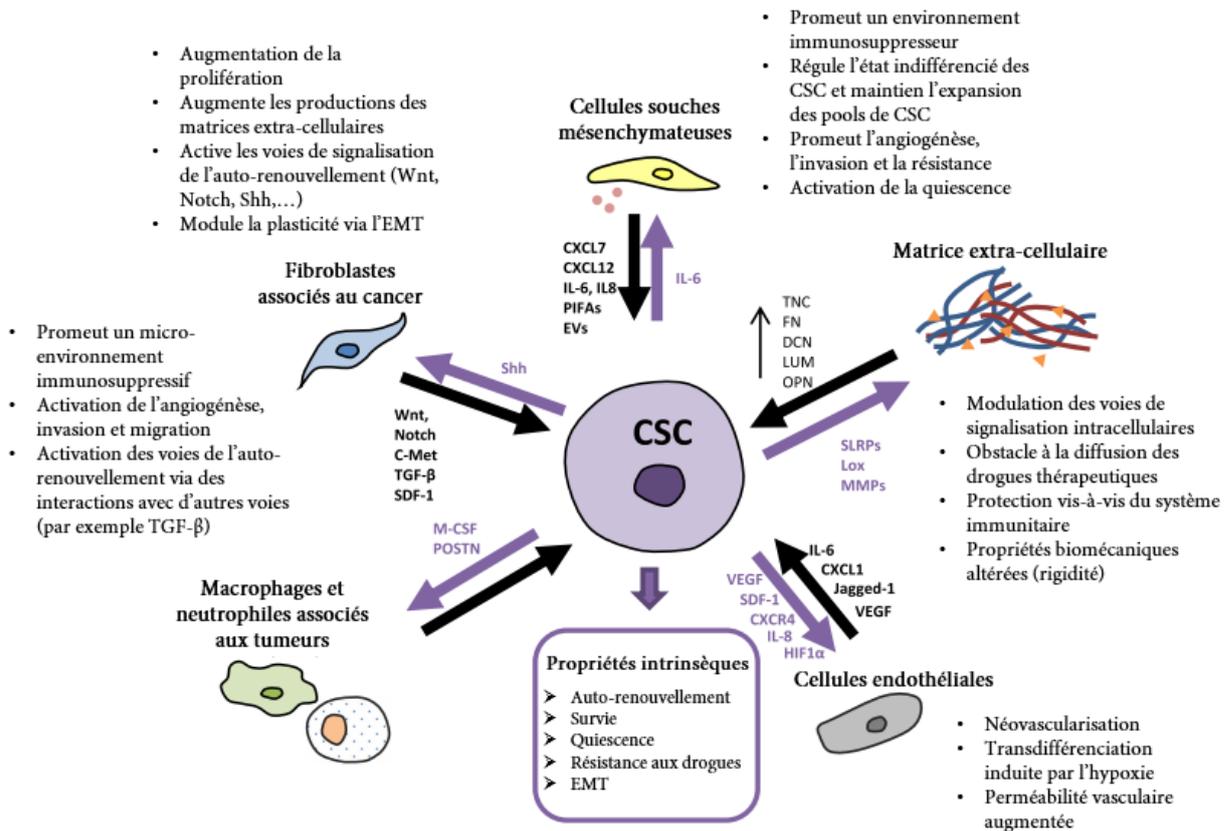


Figure 27. Interactions entre les CSC et les composants de la niche cellulaire (D'après Ayob et al, 2018). Des signaux variés provenant de la niche tumorale peuvent réguler le pool de CSC de la tumeur.

C. Cellules souches cancéreuses mammaires

1. Rôle dans la tumorigénèse mammaire et les métastases

Le cancer du sein est un des premiers cancers solides dans lesquels les CSC ont été identifiées et isolées (Al-Hajj et al, 2003; Owens et al, 2013). Selon les types d'altérations génétiques et le statut hormonal de l'environnement dans lequel elles évoluent, les cellules issues des CSC progressent de façon plus ou moins importante vers un stade différencié. La dichotomie luminal/basal-like des cancers du sein pourrait dériver des progéniteurs luminaux ou myoépithéliaux (Figure 28).

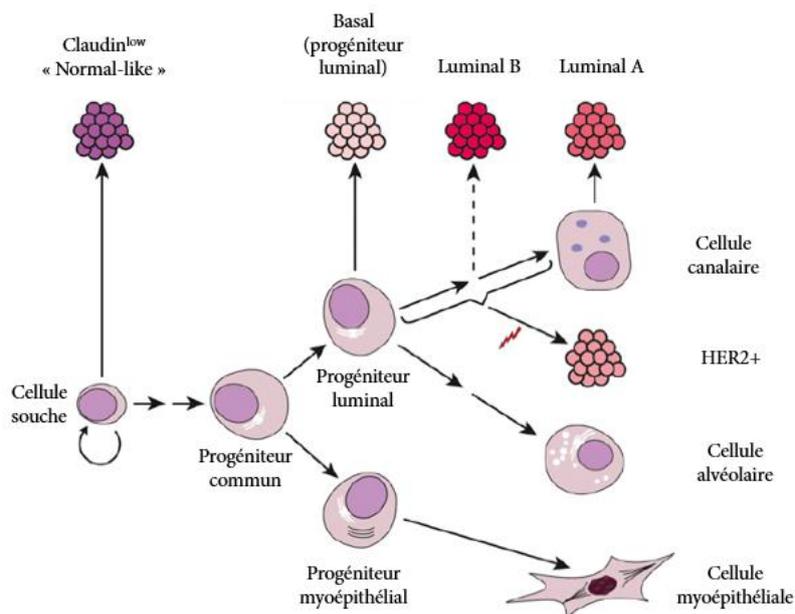


Figure 28. Schéma de la différenciation épithéliale mammaire normale et tumorale (d'après Visvader et al, 2009). Les cellules myoépithéliales ou luminales (canalaires ou alvéolaires) auraient chacune un progéniteur propre (progéniteur luminal ou myoépithélial). Ces deux progéniteurs seraient issus d'un progéniteur commun.

Une population $CD44^+CD24^{-/low}/ESA^+/Lin^-$ a été initialement identifiée comme cellules souches. Il a été démontré que 200 cellules présentant ce phénotype suffisaient pour former des tumeurs après injection dans le coussinet adipeux mammaire de souris immunodéprimés NOD/SCID alors que plusieurs milliers de cellules ne présentant pas ce phénotype ne parvenaient pas à donner naissance à une tumeur (Al-Hajj et al, 2003). En outre, ces cellules étaient capables de reconstituer l'hétérogénéité de la tumeur initiale.

La présence de CSC dans les métastases n'est pas bien définie et est basée en majorité sur des spéculations. Comme vu précédemment, l'inefficacité métastatique suggère que seule une petite sous-population de cellules tumorales peut avec succès accomplir le processus métastatique dans sa totalité pour former des métastases, et cette population serait les CSC (Crocker et al, 2017). Des preuves récentes venant de modèles *in vivo* et *in vitro* ont aidé à élucider le rôle des CSC dans les métastases. Par exemple, chez les patients atteints d'un cancer du sein, Balic et al ont montré que les métastases dans la MO étaient enrichies en cellules $CD44^+/CD24^{low}$ (Balic et al, 2006) qui ont également été trouvées dans les métastases pleurales (Yu et al, 2007). Les CSC de sein ont souvent le même phénotype que les CSC dans les

métastases pulmonaires, qui sont capables de donner naissance à des métastases extra-pulmonaires dans des organes tels que le pancréas ou le foie (Liu et al, 2010 ; Croker et al, 2009). Des populations CSC similaires, capables d'induire une croissance métastatique, ont également été trouvées dans d'autres types tumeurs tels que le cancer pancréatique et le cancer colorectal (Hermann et al, 2007 ; Pang et al, 2010).

2. Identification des CSC mammaires

Les techniques utilisées pour l'isolement des CSC mammaires chez la femme sont l'activité de l'enzyme aldéhyde déshydrogénase (test Aldefluor), la mise en évidence d'une Side Population, la formation de mammosphères, la quiescence ou les marqueurs membranaires (Dontu et al, 2003b; Ponti et al, 2005; Britton et al, 2012; Ginestier et al, 2007; Wu et al, 2008 ; Harmes et al, 2009; Katayama et al, 2009). Il a également été démontré que les CSC de cancer du sein ont une activité faible du protéasome, responsable de la régulation de nombreuses fonctions cellulaires (Vlashi et al, 2009). Les CSC mammaires sont également identifiées par un test *in vivo* en dilution limite.

Une partie de ces techniques ont également été validées dans les tumeurs mammaires canines : c'est le cas pour l'activité de l'ALDH (Michishita et al, 2012), la formation de mammosphères (Cocola et al, 2009 ; Michishita et al, 2011 ; Ferletta et al, 2011), ou les marqueurs membranaires (Magalhaes et al, 2013 ; Im et al, 2015).

a. Le test de formation de sphères

Le test de sphères est une adaptation du test de neurosphères, mis au point par Reynolds et Weiss pour quantifier les cellules souches neurales (Reynolds et al, 1996). Après microdissection de tissu cérébral adulte, les cellules étaient placées dans des conditions non adhérentes, dans un milieu sans sérum, et en présence d'EGF (Epidermal Growth Factor) et/ou de bFGF (Fibroblast Growth Factor) (Pastrana et al, 2011). Dans ces conditions, seules les cellules souches (ou les progéniteurs précoces) étaient capables de proliférer en amas cellulaires

sphériques (appelés neurosphères pour les cellules souches neurales), tandis que les cellules différenciées mouraient.

Dontu et son équipe ont développé un système de culture *in vitro* similaire permettant la sélection et la prolifération des cellules souches ou progénitrices précoces provenant d'autres tissus, en particulier le tissu mammaire (Figure 29) (Dontu et al, 2003 a et b). Ils ont déterminé que le milieu optimal pour la formation de sphères mammaires était un milieu sans sérum contenant de l'EGF et/ou du bFGF à des concentrations saturantes (10-20 ng/mL), supplémenté avec de l'insuline, de l'hydrocortisone et du B27. Les mammosphères formées sont enrichies en cellules progénitrices capables en culture 2D de se différencier dans les 3 lignées de cellules mammaires : cellules luminales, myoépithéliales ou alvéolaires, et en culture 3D de former des structures fonctionnelles alvéolaires et canalaire. Des mammosphères secondaires, générées par digestion des mammosphères primaires et remise en culture des cellules isolées ainsi obtenues, permettent de démontrer la capacité d'autorenouvellement. Les mammosphères secondaires peuvent elles-mêmes être à l'origine de N générations suivantes de mammosphères (Shaw et al, 2012 ; Samanta et al, 2018).

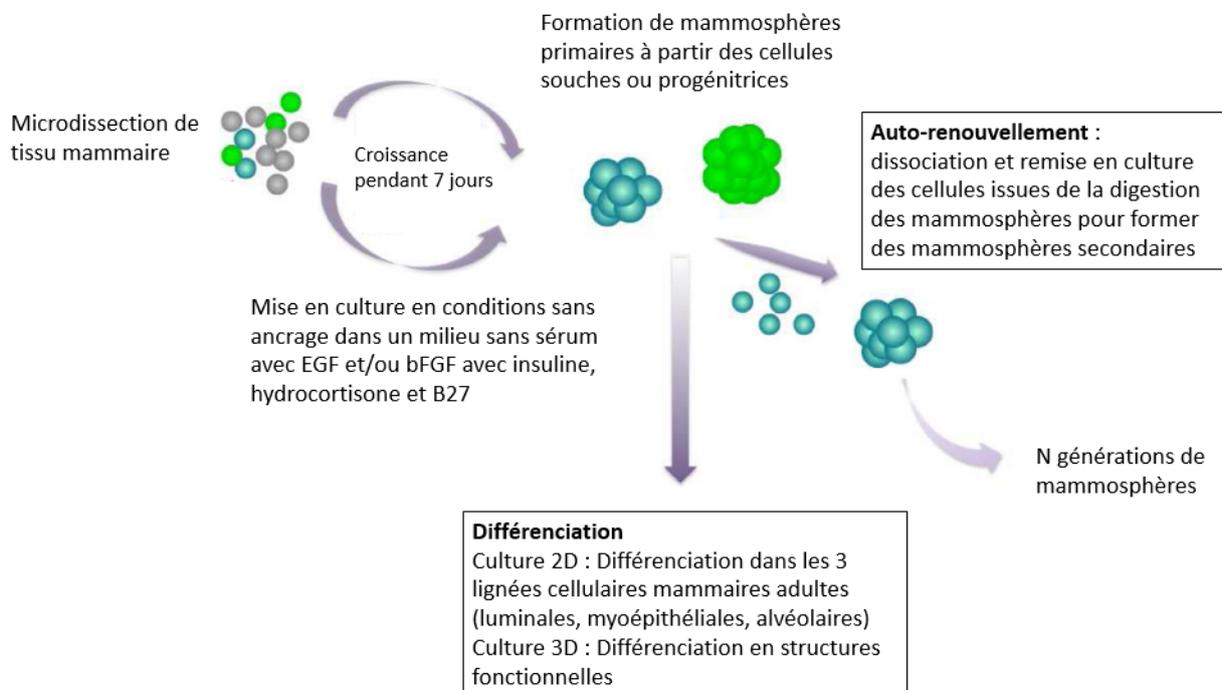


Figure 29. Principe du test de mammosphères (d'après Pastrana et al, 2011 et Dontu et al, 2003). En milieu sans ancrage, seules les cellules souches (ou les progéniteurs précoces) sont capables de proliférer en amas cellulaires sphériques, tandis que les cellules différenciées meurent.

b. Identification des cellules au cycle cellulaire lent

Les cellules souches sont la plupart du temps en état de quiescence. Plusieurs méthodes permettent d'identifier ces cellules avec une prolifération lente. Les techniques d'incorporation de marqueur de l'ADN (thymidine tritiée ou bromodeoxyuridine, BrdU) sont les plus utilisées. Les cellules en phase S du cycle cellulaire au moment de l'injection incorporent le BrdU à leur ADN. Dans les cellules ayant une forte activité proliférative, le marquage est dilué au fur et à mesure des divisions cellulaires, alors que les cellules quiescentes retiennent le marquage. Le même principe est utilisé avec des composés fluorescents comme le DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, un composé lipophile) ou le PKH26 (Tumbar et al, 2004 ; Bombelli et al, 2013).

c. Exclusion de colorants vitaux - Side Population

Une autre façon d'identifier les cellules souches a été découverte par Margaret Goodell : elle a observé que quand des cellules dérivées de MO étaient incubées avec du colorant Hoechst 33342 et ensuite analysées par cytométrie en flux, une petite population de cellules n'accumulait pas ce colorant et était ainsi identifiée comme une « side population » Hoechst^{low}. Cette population était fortement enrichie en CSH (Goodell et al, 1997). Cette exclusion du Hoechst 33342 ou d'autres colorants vitaux comme la Rhodamine 123, est due à la surexpression par les cellules souches de transporteurs membranaires de la famille ABC (ATP Binding Cassettes) et peut être mise à profit pour identifier les cellules souches en cytométrie en flux (Challen et al, 2006; Goodell, 2005; Hadnagy et al, 2006).

d. Activité enzymatique de l'aldéhyde déshydrogénase

Une méthode largement utilisée pour identifier les cellules souches *in vitro* est basée sur l'activité enzymatique de l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ALDH1) (Jones et al, 1995). Cette enzyme intervient dans le métabolisme oxydatif de l'acide rétinoïque en participant à la

transformation d'aldéhydes en acide carboxylique et pourrait ainsi participer à la régulation de la différenciation des cellules souches (Ghiaur et al, 2013). L'activité enzymatique de l'ALDH1 est plus forte dans les cellules souches que dans les cellules non souches. Elle a d'abord été utilisée pour identifier les CSH (Chute et al, 2006). Un test est disponible commercialement, le test ALDEFLUOR™ (StemCell technologies). Il utilise du BIODIPY-aminoacetaldehyde (BAAA), qui se diffuse librement dans les cellules viables et intactes, et en présence d'ALDH1, est converti en un produit fluorescent, le BIODIPY-aminoacetate (BAA), qui est retenu à l'intérieur des cellules. La quantité de BAAA produite et donc de fluorescence est proportionnelle à l'activité de l'ALDH1 dans les cellules et peut être mesurée par cytométrie en flux. Le test peut être utilisé pour isoler une sous-population de cellules qui présente des caractéristiques souches dans des tissus de glande mammaire saine ou tumorale (Ginestier et al, 2007 ; Samanta et al, 2018).

e. Marqueurs cellulaires

L'isolement et la caractérisation des CSC ont pu être réalisés en particulier grâce à l'expression différentielle de marqueurs de surface entre les cellules souches et les cellules non souches (Visvader et al, 2008). Ces marqueurs sont en général tissu-spécifiques et très dépendants de l'état physiologique de la cellule, ce qui rend assez difficiles leur identification et leur classification. Depuis la première identification des CSC dans les leucémies myéloïdes aiguës grâce à un phénotype CD34⁺CD38⁻ (Lapidot et al, 1994), de nombreux autres marqueurs membranaires communs aux CSC et aux cellules souches normales ont été utilisés pour isoler les CSC dans les tumeurs solides. Dans les cancers du sein, l'expression de la protéine de surface CD44 (CD44⁺), combinée à une absence ou une très faible expression de la protéine membranaire CD24 (CD24^{-low}), définit une population cellulaire tumorigène, capable de régénérer des tumeurs *in vivo*, et de reproduire l'hétérogénéité tumorale (Al-Hajj et al, 2003). CD44 représente une famille de glycoprotéines transmembranaires de type I. CD44 est le récepteur de l'acide hyaluronique mais peut aussi être le récepteur du collagène, de la fibronectine et de la chondroïtine sulfate. CD44 agit aussi comme plate-forme de signalisation

qui intègre les signaux des cytokines et des facteurs de croissance pour réguler l'adhésion cellulaire, la migration, la prolifération, la différenciation et la survie (Orian-Rousseau, 2014 ; Aubert et al, 2015 ; Yan et al, 2015). CD24 est une protéine de surface type mucine. CD24 peut augmenter la prolifération des cellules tumorales, leur motilité et leur invasion, ainsi que la croissance tumorale et les métastases *in vivo* (Smith, 2006 ; Bretz et al, 2012 ; Baumann et al, 2005). Le phénotype CD44⁺/CD24⁻ marque les CSC des cancers de sein de type luminal (Fillmore et al, 2008). Dans les cancers et lignées cancéreuses de type basal, la majorité des cellules sont CD44⁺/CD24⁻, et ces marqueurs ne sont pas fiables pour identifier les CSC (Honeth et al, 2008; Park et al, 2010; Klingbeil et al, 2010).

Un autre marqueur couramment utilisé dans le cancer du sein est l'activité élevée des enzymes aldéhydes déshydrogénases dans les CSC (ALDH^{+/high}) (Ginestier et al, 2007). Les cellules ALDH⁺ issues des tumeurs sont jusqu'à mille fois plus tumorigènes que des cellules ALDH⁻ et peuvent reconstituer l'hétérogénéité de la tumeur initiale.

Enfin, CD133, une glycoprotéine transmembranaire d'environ 115-120 kDa aussi appelée prominine, est un marqueur de CSC dans de nombreuses tumeurs et pourrait également identifier les CSC mammaires, particulièrement dans les tumeurs triple-négatives (Wright et al, 2008 ; Liu et al, 2013 ; Collina et al, 2015 ; Tume et al, 2016). CD133 aurait par ailleurs été identifié dans les CTC mammaires (Nadal et al, 2013).

Ces groupes de marqueurs identifient des populations qui se chevauchent mais ne sont pas identiques. Un faible pourcentage de cellules CD44⁺/CD24⁻/ALDH⁺ (0,1-1,2%) a été identifié dans le cancer du sein comme étant extrêmement tumorigène (Charafe-Jauffret et al, 2009). Des lignées cellulaires dérivant des tumeurs mammaires de souris KO pour *Brcal* présentent deux populations avec des caractéristiques de cellules souches, une CD44⁺/CD24⁻ et une CD133⁺, qui ne se superposent pas (Wright et al, 2008). Par ailleurs, comme indiqué précédemment, le pourcentage de CSC dans une tumeur semble fortement corrélé au type moléculaire. En effet, il semble que les tumeurs du type basal-like (plus agressives) présentent une quantité supérieure de CSC par rapport à celles du phénotype luminal (plus différenciées) (Honeth et al, 2008 ; Liu et al, 2013).

f. Test fonctionnel *in vivo*

Le second test, *in vivo*, consiste à évaluer la tumorigénicité d'une population cellulaire caractérisée et isolée en souris immunodéficientes. Cette méthode repose sur la capacité d'un faible nombre de cellules à générer une tumeur sur plusieurs transplantations successives (Figure 30) (O'Brien et al, 2010).

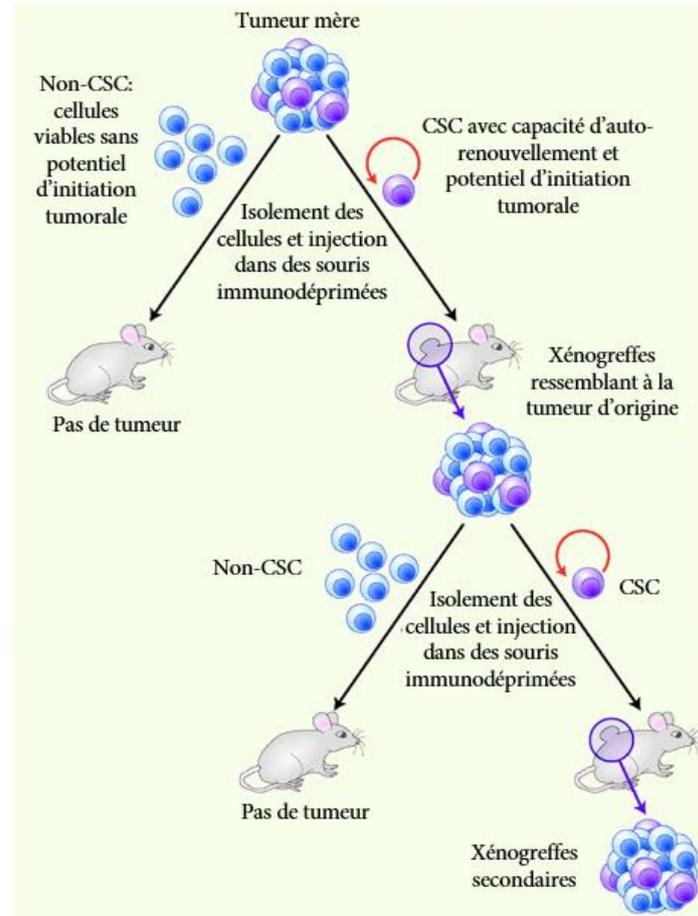


Figure 30. Principe du test *in vivo* en dilution limite. Des cellules sont isolées d'une tumeur mère et sont injectées en faible nombre dans des souris immunodéprimées. Seules les CSC seront capables de recréer une tumeur ressemblant à la tumeur d'origine. Si on répète l'expérience à partir de la xénogreffe primaire, à nouveau seules les CSC en faible nombre permettent d'obtenir des xénogreffes secondaires (d'après O'Brien et al, 2010).

g. Systèmes rapporteurs de CSC

Le développement de systèmes rapporteurs apporte la possibilité d'enrichir rapidement une population en CSC et de façon encore plus importante, de pouvoir traquer ces cellules en

temps réel (Saygin et al, 2016). Les systèmes rapporteurs consistent à mettre un vecteur d'expression, par exemple d'un fluorophore, sous la dépendance d'un promoteur qui a une activité spécifique dans les CSC comparé aux non CSC. Les systèmes les plus utilisés dans le cancer du sein sont le promoteur de l'ALDH1A1 (Gener et al, 2015), le promoteur de Nanog (Buczek et al, 2018 ; Jeter et al, 2011 ; Thiagajaran et al, 2015 ; Zheng et al, 2013), mais aussi le promoteur de Sox-2 (Liang et al, 2013).

D. Implications cliniques des CSC mammaires

1. Phénomènes de résistance aux traitements

Si les CSC sont au coeur du processus d'oncogenèse et de métastase, elles seraient également à l'origine des résistances aux thérapies conventionnelles et ainsi des récives. En effet, les CSC sont plus résistantes à la radiothérapie et à la chimiothérapie que les non-CSC (Dean et al, 2005 ; Rycaj et al, 2014). Les mêmes phénomènes de résistance à la chimiothérapie et radiothérapie ont été mis en évidence dans les tumeurs mammaires canines (Pang et al, 2011 ; Zhou et al, 2018).

La résistance des CSC aux drogues de chimiothérapie est classiquement attribuée à un niveau élevé de pompes d'efflux ATP-dépendantes appartenant à la superfamille des transporteurs ABC (ATP-binding cassettes) telles que ABCB1 (ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1, aussi connu comme la P-glycoprotéine ou MDR1) et ABCG2 (ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2), qui a été initialement identifié dans les cellules résistantes à la mitoxantrone. L'efflux des drogues médié par les transporteurs ABC mène à une accumulation moindre de drogues de chimiothérapies. La capacité d'efflux des drogues a été associée aux cellules souches dérivées de tissus normaux ou néoplasiques (Dean et al, 2005 ; Eramo et al, 2006 ; Patrawala et al, 2005). La résistance aux chimiothérapies est aussi liée à la capacité des CSC d'entrer en quiescence, qui les rend moins accessibles aux drogues anti-cancéreuses ciblant des cellules en division.

La radiothérapie est l'une des principales options thérapeutiques utilisées dans le cancer du sein. Plusieurs études ont démontré en parallèle la radiorésistance des CSC (Phillips et al,

2006 ; Al-Assar et al, 2009). L'équipe de Phillips a montré que les cellules cancéreuses mammaires cultivées en mammosphères résistaient mieux aux rayonnements ionisants que celles cultivées en monocouche. La fraction de cellules survivantes était enrichie en CSC CD44⁺/CD24^{-low}, ALDH⁺, side population et cellules avec faible activité du protéasome (Al-Assar et al, 2009 ; Lagadec et al, 2010; Debeb et al, 2009 ; Diehn et al, 2009). Seules deux études montrent qu'il existe certaines tumeurs ou lignées cancéreuses mammaires pour lesquelles les CSC sont plus radiosensibles que les non-CSC et peuvent ainsi être tuées par un traitement de radiothérapie (Kim et al, 2012 ; Woodward et al, 2007).

Enfin, il a été démontré que la radiothérapie et la chimiothérapie peuvent induire une reprogrammation des non-CSC en CSC. Dans les cancers du sein, des rayonnements ionisants appliqués à des populations cellulaires purgées en CSC induisent l'apparition de nouvelles CSC, appelées CSC induites (Lagadec et al, 2012). Dans le glioblastome, les chimiothérapies sont capables d'induire la dédifférenciation de non-CSC en CSC (Auffinger et al, 2014).

2. Valeur pronostique des marqueurs de CSC

Cliniquement, les CSC ont été associées à des taux plus élevés de récurrences et de métastases (Charafe-Jauffret et al, 2010; Marcatò et al, 2011). Cependant, la valeur pronostique des marqueurs de CSC en IHC reste controversée.

a. CD44⁺/CD24⁻

Chez l'homme, certaines études ont rapporté que le phénotype CD44⁺/CD24⁻ avait un impact négatif sur le pronostic à long terme de patientes atteintes d'un cancer du sein (Seo et al, 2016 ; Rico et al, 2017), d'autres que ce phénotype n'aurait pas de valeur pronostique (Mylona et al, 2008 ; Collina et al, 2015), d'autres encore que le phénotype CD44⁺/CD24⁻ serait associé à un pronostic favorable (Ahmed et al, 2012 ; Kim et al, 2011). Une autre étude a suggéré que les cellules CD44⁺/CD24⁻ n'étaient pas associées au pronostic mais pourraient favoriser les métastases à distance (Abraham et al, 2005).

Chez le chien, la signification clinique du phénotype CD44⁺/CD24⁻ dans les tumeurs mammaires canines a été rapporté par différentes études. L'équipe de Magalhaes a décrit un phénotype CD44⁺/CD24⁻ dans 31% des cas sur une cohorte de 130 tumeurs mammaires mammaires, avec une prépondérance dans les tumeurs de grade 2 et 3 et les métastases lymphatiques (Magalhaes et al, 2013). L'équipe de Im a décrit le phénotype CD44⁺/CD24⁻ dans 30% d'une cohorte de 88 tumeurs mammaires canines. Ce phénotype était associé à des tumeurs de plus haut grade et au type histologique, particulièrement les carcinomes anaplasiques (Im et al, 2015). Une dernière étude menée par l'équipe de Barbieri a indiqué que 46% des tumeurs exprimaient ce phénotype dans une cohorte de 16 tumeurs mammaires canines. Cependant, dans cette étude, aucun tissu ne marquait CD24, nous ne pouvons donc pas parler de phénotype CD44⁺/CD24⁻ proprement dit (Barbieri et al, 2015).

b. ALDH1

Chez la femme, une expression élevée de ALDH1 a été corrélée à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, et a été associé à des récives précoces, au développement de métastases, à une résistance au traitement et à un mauvais pronostic (Ginestier et al, 2007 ; Charafe-Jauffret et al, 2009 et 2010 ; Zhong et al, 2013 ; Kida et al, 2016 ; Miyoshi et al, 2016).

L'isozyme ALDH1A1 a une expression augmentée chez les patients atteintes de cancer du sein qui présentent des NL infiltrés ou sont décédées de leur maladie (Khoury et al, 2012). Son expression est significativement associée à un haut grade histologique, une négativité de ER/PR, une positivité de HER2, et une survie globale moins bonne (Zhou et al, 2010). Une autre étude n'a pas trouvé de lien entre l'expression de l'ADLH1 et la survie (DFS ou OS) (Collina et al, 2015). A l'inverse, Marcato et al ont démontré que l'expression de l'ALDH1A3 (mais pas l'ALDH1A1) dans les tumeurs de patients était significativement corrélée avec le grade tumoral, les métastases, et le stade du cancer (Marcato et al, 2011). Même au sein de la famille ALDH1, des isozymes différents peuvent avoir une valeur pronostique différente (Croker et al, 2017).

Chez la chienne, aucune étude n'a été menée en IHC avec l'ADLH1.

3. Thérapies anti-CSC

Les thérapies conventionnelles permettent de réduire la taille tumorale en tuant un grand nombre de cellules avec un potentiel de prolifération limité, mais n'éliminent pas les CSC, qui pourront être à l'origine des récidives. Une autre stratégie thérapeutique consiste à cibler la sous-population de CSC, ce qui pourrait résulter en une régression tumorale et éviter une récurrence après traitement (Figure 31) (Reya et al, 2001).

En pratique, il est plus probable qu'une combinaison d'agents anti-CSC avec des thérapies conventionnelles (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie, immunothérapie), ciblant la tumeur dans son ensemble, soient plus efficaces lors des essais cliniques. Les traitements conventionnels, en éliminant une grande partie de la masse tumorale, permettront à un agent anti-CSC d'accéder à sa cible, souvent cachée dans le cœur hypoxique de la tumeur.

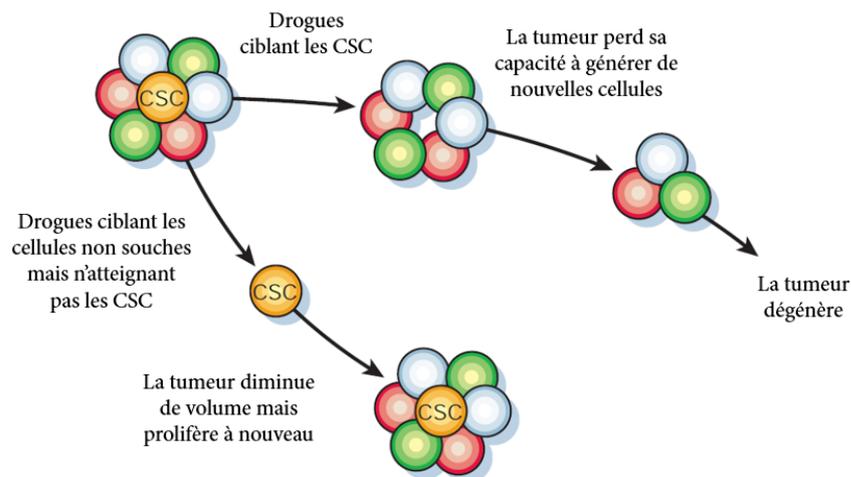


Figure 31. Comparaison de deux stratégies thérapeutiques : stratégie conventionnelle et thérapie ciblant les CSC (issu de Reya et al, 2001). Les thérapies conventionnelles tuent un grand nombre de cellules avec un potentiel de prolifération limité, mais n'éliminent pas les CSC. Les thérapies ciblant les CSC font perdre à la tumeur sa capacité à générer de nouvelles cellules ce qui résulte en une régression tumorale.

L'identification de cibles potentielles sur les CSC représente un défi face au manque de marqueurs spécifiques des CSC et à leur plasticité. Cibler une seule molécule ou voie de signalisation a peu de chance d'avoir un effet thérapeutique (Agliano et al, 2017).

Plusieurs approches thérapeutiques sont en essais précliniques et cliniques. Ces stratégies incluent le ciblage des voies de signalisation Wnt, Notch, Hedgehog, de TGF- β ,

PI3K/Akt et STAT3 avec des petites molécules et/ou des anticorps, l'utilisation de miRNAs perturbant le développement des CSC et/ou la TEM, ou encore de l'immunothérapie avec des vaccins induisant une immunité contre les CSC (Agliano et al, 2017).

Une autre stratégie consiste à réactiver les cellules souches dormantes pour les éliminer plus efficacement. Par exemple, les CSH dormantes peuvent être activées par des cytokines telles que l'interféron- α (IFN- α) et des facteurs de croissance granulocytaires (G-CSF), ce qui les sensibilise à la chimiothérapie (Trumpp et al, 2010).

Les premières preuves pré-cliniques de l'efficacité des thérapies anti-CSC dans le traitement et la prévention des métastases ont été obtenues. Cependant, les cellules cancéreuses injectées en IV chez des souris immunodéficientes sont exposées à des facteurs micro-environnementaux bien différents d'une tumeur spontanée. Ainsi, la sélection de modèles *in vivo* plus appropriés, recréant la complexité du micro-environnement tumoral et du processus métastatique dans son ensemble sont critiques pour une évaluation préclinique des agents anti-CSC (Agliano et al, 2017). Dans ce contexte, le chien est donc un modèle d'étude de choix. Le défi désormais est d'identifier avec certitude ces CSC canines afin d'envisager des essais cliniques ciblant les CSC.

IV. Neurotrophines et récepteurs

A. Les neurotrophines et leurs précurseurs

Chez l'homme, de plus en plus de données soulignent le rôle des neurotrophines dans un grand nombre de tumeurs, dont le cancer du sein. Les neurotrophines sont une famille de facteurs de croissance conservés structurellement, composée du NGF (Nerve Growth Factor), du BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), de NT-3 (neurotrophin 3), NT-4/5 (neurotrophin 4/5), et leurs proneurotrophines associées (proNGF, proBDNF, proNT-3, proNT-4/5), qui peuvent avoir une action biologique par elles-mêmes. L'action des (pro)neurotrophines est médiée par le récepteur de basse affinité $p75^{\text{NTR}}$ ($p75$ neurotrophin receptor), qui peut lier toutes les (pro)neurotrophines, et les récepteurs de haute affinité à activité tyrosine kinase Trk, qui lient spécifiquement une (pro)neurotrophine. Ainsi (pro)NGF se lie à TrkA, (pro)BDNF et NT-4/5 se lient à TrkB et NT-3 se lie spécifiquement à TrkC (Figure 32) (Chao, 2003 ; Reichardt et al, 2006).

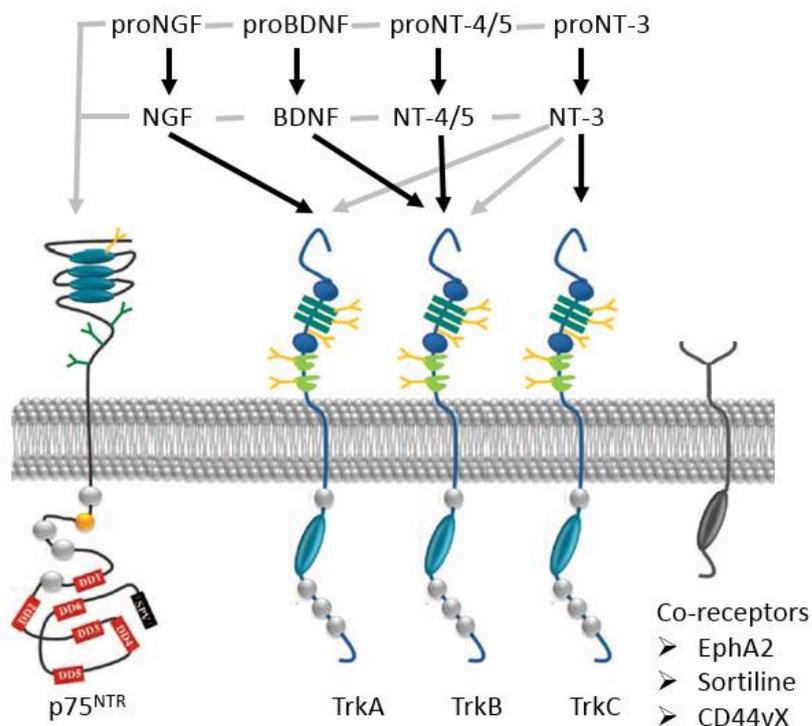


Figure 32. Membres de la famille des neurotrophines et leurs récepteurs. Le (pro)NGF se lie à TrkA, (pro)BDNF et NT-4/5 se lient à TrkB et NT-3 se lie spécifiquement à TrkC. Toutes les (pro)neurotrophines se lient à $p75^{\text{NTR}}$ (d'après Chao et al, 2003).

1. Découverte des neurotrophines

a. Chez l'homme

La découverte du NGF remonte à près de 70 ans, lorsque Rita Levi-Montalcini et Viktor Hamburger ont mis en évidence qu'un sarcome de souris transplanté dans un embryon de poulet était capable de produire un facteur spécifique entraînant la croissance de fibres nerveuses innervant la tumeur (Levi-Montalcini et al, 1951). La substance en question, le NGF, fut isolé en 1954 (Cohen et al, 1954), séquencé en 1971 (Angeletti et al, 1971) et valut le prix Nobel de médecine à Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen en 1986. Les autres neurotrophines ont été identifiées et isolées bien plus tard. En 1982, le BDNF est isolé et purifié à partir d'une tumeur cérébrale de porc (Barde et al, 1982). Puis en 1990, NT-3 et NT-4/5 sont découvertes simultanément par différentes équipes à la fois chez la xénope, le rat et l'homme (Hohn et al, 1990; Jones et al, 1990; Maisonpierre et al, 1990; Rosenthal et al, 1990; Berkemeier et al, 1991; Hallböök et al, 1991; Ip et al, 1992).

b. Etat des lieux des connaissances chez le chien

A l'heure actuelle, les neurotrophines et leurs récepteurs ont été peu étudiés chez le chien. Le NGF a été étudié chez le chien principalement dans le traitement de la douleur arthrosique (Gearing et al, 2013; Lascelles et al, 2015). L'expression de BDNF, p75^{NTR}, TrkA et TrkB a été étudiée dans l'hippocampe canin (Xu et al, 2015) et le BDNF dans le développement de la rétine (Avila-García et al, 2012). Le récepteur le plus étudié est p75^{NTR} : son expression et son rôle ont été décrits dans le cerveau canin (Tremere et al, 2000; Insua et al, 2012) et dans les cellules de Schwann, en lien avec la maladie de Carré (Imbschweiler et al, 2012; Lempp et al, 2014; Kegler et al, 2015; Spitzbarth et al, 2016). Les seules études ayant porté sur le rôle des neurotrophines et de leurs récepteurs en oncologie concernaient p75^{NTR} dans les tumeurs des gaines nerveuses périphériques et les sarcomes des tissus mous (Chijiwa et al, 2004), ainsi que l'expression de TrkA dans les ostéosarcomes appendiculaires (Fan et al, 2008).

2. Structure des (pro)neurotrophines

Les gènes des neurotrophines (NGF, BDNF, NT-3 et NT-4/5) sont issus de la duplication d'un gène ancestral et sont très conservés. Leur synthèse aboutit à des précurseurs protéiques de tailles et poids moléculaires similaires (240-260 acides aminés), avec une forte homologie de séquence. Les neurotrophines sont toutes synthétisées et maturées selon le même processus. Elles sont d'abord générées sous forme de pré-pro-neurotrophines d'environ 30 kDa (Figure 33), qui débutent leur maturation par l'élimination du prédomaine ou peptide signal, au niveau du réticulum endoplasmique.

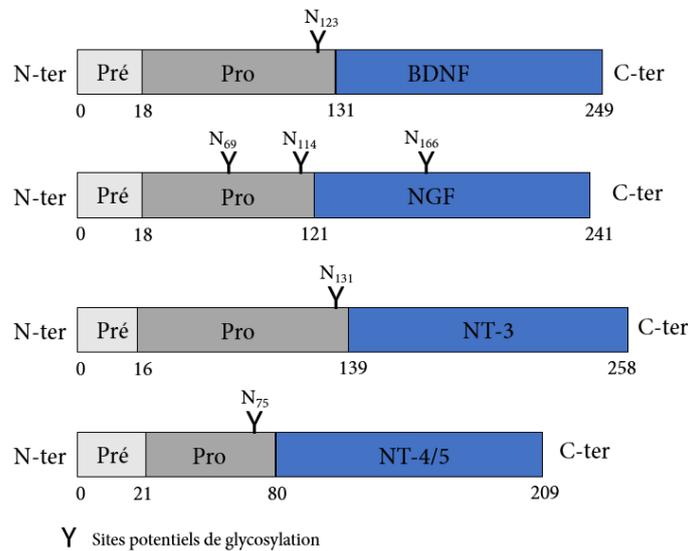


Figure 33. Composition des prépro-neurotrophines (d'après Lessmann et al, 2003). Les neurotrophines sont d'abord générées sous forme de pré-pro-neurotrophines d'environ 30 kDa.

Les proneurotrophines ainsi produites (Figure 34) subissent ensuite une coupure protéolytique au niveau des résidus d'acides aminés dibasiques pour donner des neurotrophines matures, d'environ 14 kDa ou 120 acides aminés (Suter et al, 1991). Cette coupure protéolytique peut être réalisée dans le cytoplasme, par des protéases intracellulaires telles que la furine ou des proconvertases (Bresnahan et al, 1990; Seidah et al, 1996) ou après sécrétion, par des protéases extracellulaires comme la plasmine et certaines métalloprotéases (MMP-3 et MMP-7) (Gray et al, 2008; Lee et al, 2001; Mowla et al, 2001). Des sites de glycosylation situés au niveau des prodomaines interviennent dans la régulation du trafic endomembranaire et la sécrétion des neurotrophines (Suter et al, 1991).

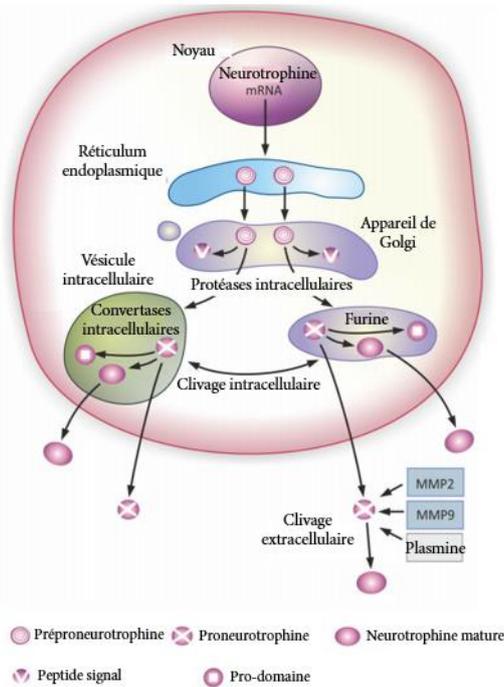


Figure 34. Synthèse des neurotrophines (d'après Kowianski et al, 2018). Les pré-pro-neurotrophines subissent une élimination du peptide signal au niveau du réticulum endoplasmique. Puis les proneurotrophines subissent une coupure protéolytique dans le cytoplasme ou après sécrétion pour donner les neurotrophines matures.

Les neurotrophines s'homodimérisent de façon non covalente en complexes de 28 kDa grâce à 6 résidus cystéines, conservés dans chaque neurotrophine, et formant trois ponts disulfures. Les ponts disulfures et les résidus connectés constituent un nœud de cystéine (cystine knot) et fournissent sa rigidité à la structure (McDonald et al, 1993). Dans un homodimère, deux protomères parallèles sont orientés en tête à tête autour d'un axe (Figure 35) (Bradshaw et al, 1994).

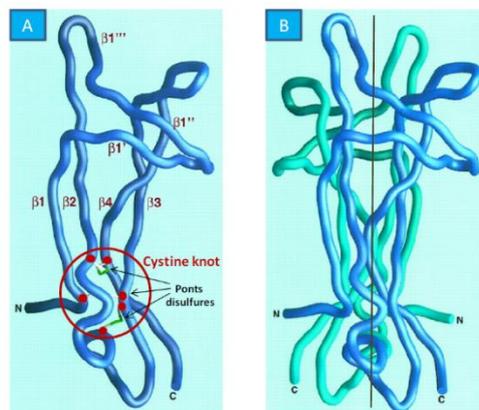


Figure 35. Structure du proNGF. A. Protomère de NGF. B. Dimère de NGF (d'après Bradshaw et al, 1994; Mc Donald et al, 1995).

3. Rôles physiologiques des (pro)neurotrophines

a. Les neurotrophines : des facteurs de croissance multifonctionnels

Les neurotrophines ont d'abord été étudiées dans le système nerveux. Elles ont été identifiées comme promoteurs de la survie des neurones, mais sont aussi impliqués dans de nombreux aspects du développement et des fonctions neuronales, comme la formation des synapses et la plasticité cérébrale (Levi-Montalcini, 1987; Reichardt et al, 2006). Comme facteurs de croissance multifonctionnels, ils peuvent aussi avoir un effet sur des tissus non nerveux comme le rein, le thymus, les nœuds lymphatiques, la peau, les ovaires, les glandes salivaires ou la glande mammaire (Caroleo et al, 2014; Vega et al, 2004; Garcia-Suarez et al, 1997; Pincelli, 2017; Streiter et al, 2016; Naesse et al, 2013; Colitti et al, 2015).

b. Les proneurotrophines : plus que de simples précurseurs protéiques

Pendant de nombreuses années, les proneurotrophines ont été considérées comme une simple forme intermédiaire dans la synthèse des neurotrophines matures, sans rôle particulier et dont le clivage était systématique. Ce n'est qu'au début des années 2000 que les effets de proneurotrophines ont été démontrés : Lee et ses collaborateurs ont montré que le proNGF et le proBDNF peuvent être sécrétés et avoir une action pro-apoptotique sur les neurones, là où les formes matures induisent la survie et la différenciation cellulaire (Lee et al, 2001). D'une manière générale il existe une dualité fonctionnelle entre les proneurotrophines qui ont une activité pro-apoptotique notamment via leur interaction avec le récepteur p75^{NTR}, et les neurotrophines matures qui ont une activité pro-survie via leur liaison aux récepteurs Trk.

B. Les récepteurs des neurotrophines

Pour déclencher une signalisation cellulaire, les neurotrophines doivent se fixer sous forme d'homodimères à des récepteurs spécifiques, classés en 2 grandes familles : les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) et le récepteur p75^{NTR}.

1. Récepteurs à activité tyrosine kinase : TrkA, TrkB et TrkC

a. Découverte

La première description du gène codant pour le récepteur TrkA, NTRK1 (Neurotrophin Receptor Kinase) remonte à 1986 (Martin-Zanca et al, 1986). En 1991, ce récepteur a été caractérisé comme récepteur spécifique au NGF (Kaplan et al, 1991). Quelques années plus tard, les gènes des récepteurs TrkB (NTRK2) et TrkC (NTRK3) ont été identifiés (Nakagawara et al, 1995 ; McGregor et al, 1994).

b. Structure

Les récepteurs de la famille Trk, dits de haute affinité pour les neurotrophines matures, présentent un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. Trois variants sont retrouvés – TrkA, TrkB et TrkC – fixant chacun un ligand spécifique : le NGF pour TrkA, principalement le BDNF mais aussi NT4/5 pour TrkB et NT3 pour TrkC. En absence de ligand spécifique, le récepteur peut lier d'autres neurotrophines. Par exemple, NT-3 peut interagir avec TrkA et TrkB et activer une signalisation intracellulaire (Rydén et al, 1996). Lors de son activation par le ligand, le récepteur s'homodimérise, ce qui entraîne une transphosphorylation des régions intracytoplasmiques (Friedman et al, 1999).

Les RTK présentent une très forte homologie de structure (Figure 47). Leur domaine N-terminal extracellulaire permet la fixation du ligand et est spécifique de celui-ci. Il est constitué de trois régions riches en leucines encadrées de deux régions riches en cystéines (Urfer et al, 1995). La partie juxtamembranaire est constituée de deux domaines de type immunoglobuline-like (Ig-C). C'est à leur niveau que le récepteur va lier son ligand (Holden et al, 1997; Wiesmann et al, 1999). Les domaines Ig-C participent à la bonne conformation du récepteur et stabilisent les formes monomériques de Trk, empêchant leur dimérisation spontanée et leur activation en absence de neurotrophines (Arévalo et al, 2006). La partie extracellulaire comporte de nombreux sites de glycosylations, essentielles pour l'adressage du récepteur à la membrane,

pour sa signalisation et pour prévenir son activation en absence de neurotrophine (Friedman et al, 1999; Watson et al, 1999).

Les récepteurs Trk présentent un domaine transmembranaire unique, constitué d'une vingtaine d'acides aminés hydrophobes. La partie intracellulaire du récepteur, très conservée entre les différents récepteurs, contient le domaine à activité tyrosine kinase (Patapoutian et al, 2001). Elle présente des résidus tyrosines, cibles de l'autophosphorylation, qui enclenchent la suite de la signalisation (Segal et al, 1996; Stephens et al, 1994).

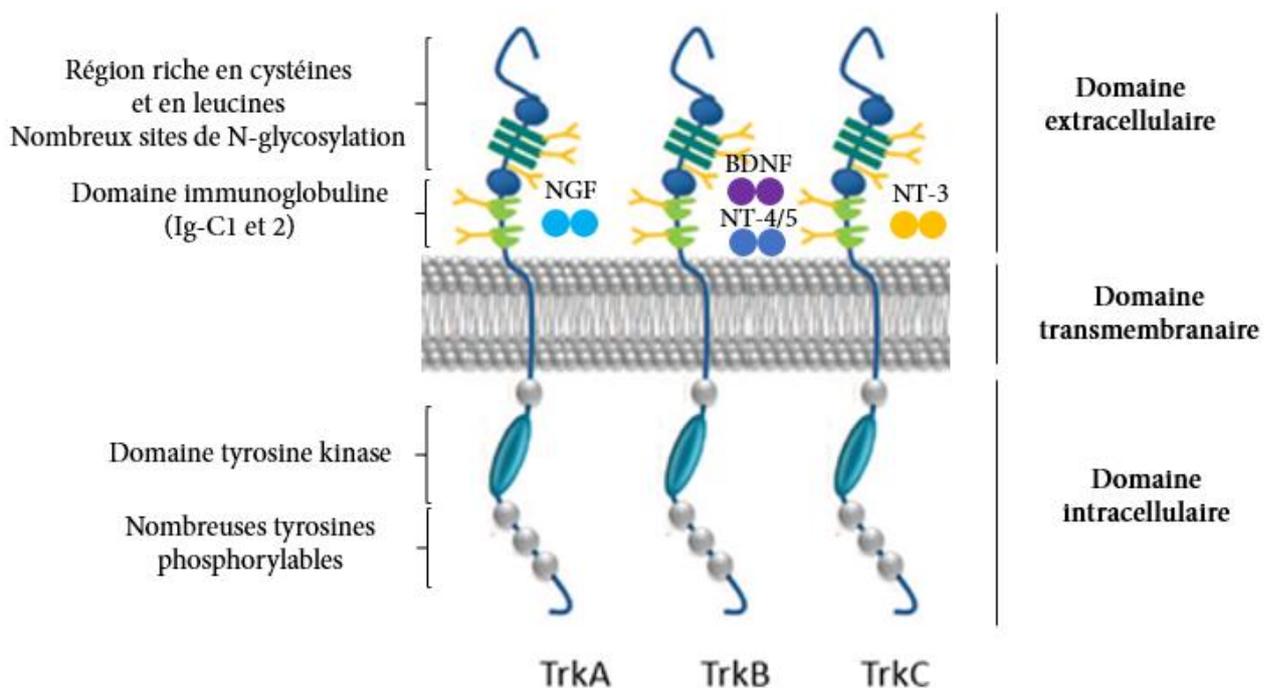


Figure 36. Représentation schématique des récepteurs Trk. Les récepteurs de la famille Trk présentent un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase, un domaine transmembranaire unique et un domaine extracellulaire permettant la fixation du ligand spécifique (d'après Arévalo et al, 2006).

c. Isoformes des récepteurs Trk

Les RTK sont soumis à un épissage alternatif qui conduit à de nombreux isoformes de fonctions biologiques diverses. Nous nous intéressons ici uniquement aux isoformes de TrkA et TrkB.

i. Isoformes de TrkA

Il existe trois isoformes de TrkA, résultants d'un épissage alternatif du gène NTRK1 (Kaplan et al, 1991). TrkA-I est issu de l'épissage de l'exon 9. Ce récepteur est majoritairement retrouvé dans des tissus non neuronaux. Il est incapable de lier la NT3. TrkA-II résulte de l'expression de l'intégralité du gène. C'est la forme la plus longue de la famille. Elle est majoritairement retrouvée au sein des tissus neuronaux. TrkA-III est l'isoforme la plus courte car elle provient de l'épissage des exons 6, 7 et 9. Son expression constitue un facteur de très mauvais pronostic, car il possède la capacité de pouvoir s'autophosphoryler seul, sans la présence de son ligand, et il serait capable de favoriser la résistance aux stress dans les lignées cellulaires (Tacconelli et al, 2005).

ii. Isoformes de TrkB

Les transcrits du gène NTRK2 étant fortement soumis au phénomène d'épissage alternatif, plus de 100 isoformes d'ARNm de TrkB ont été retrouvées. Parmi les 10 isoformes protéiques codées, 3 d'entre elles sont majoritaires chez l'homme (Stoilov et al, 2002; Thiele et al, 2009).

La forme entière du récepteur TrkB est aussi appelée Full Length ou TrkB-FL. Cette isoforme est produite par un transcrit épissé de l'exon 16 et de l'exon 19. Il possède l'intégralité des domaines extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire (activité tyrosine kinase) (Barbacid, 1995; Patapoutian et al, 2001). Il s'agit de la forme « classique » et fonctionnelle du récepteur qui a un poids moléculaire de 145kDa.

La forme tronquée est l'isoforme la plus courte des TrkB aussi appelée TrkB-T1. Ce récepteur n'est pas issu d'un épissage du gène, mais le transcrit contient un codon stop dans l'exon 16 ; la protéine qui en résulte a un poids moléculaire de 95kDa et a la particularité d'être tronqué de toute la partie intracellulaire (domaine à activité tyrosine kinase) essentielle pour conduire une signalisation et une réponse cellulaire. Il est en revanche doté intégralement du domaine extracellulaire de liaison aux ligands et capable de lier BDNF et NT-4/5 (Biffo et al,

1995). Cette forme est potentiellement capable d'induire ou non une signalisation, mais son rôle reste un sujet controversé et mal connu (Luberg et al, 2010).

La troisième forme couramment retrouvée correspond au récepteur TrkB-T-Shc. Cette forme est issue d'un transcrit épissé de l'exon 16 et contenant un codon stop dans l'exon 19. Ce récepteur présente un domaine intracellulaire avec la particularité de posséder un domaine de liaison Shc (protéines d'adaptation). Cette forme du récepteur est principalement retrouvée dans le système nerveux (Brodeur et al, 2009).

En dehors du système nerveux, les récepteurs TrkB sont exprimés majoritairement sous la forme tronquée TrkB-T1 (Luberg et al, 2010). Or, le rôle de ce récepteur demeure mal compris. Il pourrait jouer un rôle de dominant négatif en provoquant l'internalisation du récepteur TrkB-FL par endocytose (Biffo et al, 1995). En effet, après dimérisation des formes TrkB-FL et TrkB-T1 et fixation du BDNF, l'ensemble du complexe est endocyté empêchant la fonction signalisatrice du récepteur TrkB-FL. Une autre étude laisse penser que TrkB-T1 serait capable de former un hétérodimère avec le récepteur TrkB-FL entraînant ainsi son inactivation puisque le complexe formé devient inactif (transphosphorylation du récepteur impossible) (Eide et al, 1996). Enfin, TrkB-T1 serait capable de séquestrer et de transloquer le BDNF (Alderson et al, 2000). Ces rôles hypothétiques pourraient conduire à l'inhibition de l'effet du TrkB-FL et ainsi à son rôle dans la prolifération et la survie cellulaire.

b. Signalisation

Comme dans l'ensemble des RTK, l'activation des Trk par leurs ligands induit une dimérisation du récepteur, initiant l'activation du domaine kinase et la trans-autophosphorylation de résidus tyrosine au niveau du domaine intracellulaire (Lemmon et al, 2010 ; Schlessinger, 2000). Les récepteurs Trk entraînent l'activation de voies intracellulaires impliquées dans la survie cellulaire, la différenciation, la croissance et la plasticité synaptique dans le cas des cellules neuronales (Arévalo et al, 2006). Lors de la fixation du ligand (neurotrophine) sur le récepteur (Trk), l'activation de 3 voies majeures de survies est déclenchée (Figure 37) (Stoilov et al, 2002 ; Huang et al, 2003) :

- la voie PI3K/AKT (Phosphatidyl Inositol 3 kinase) possède un rôle anti-apoptotique et un rôle pro-survie direct, par l'activation de facteurs de transcription comme NFκB ou FoxO.
- la voie des MAPK (Mitogen Associated Protein Kinases) est impliquée dans la différenciation neuronale et la prolifération cellulaire
- la voie de la PLCγ (Phospholipase C γ) est impliquée dans la plasticité synaptique neuronale et la croissance des neurites (Matsumoto et al, 2001).

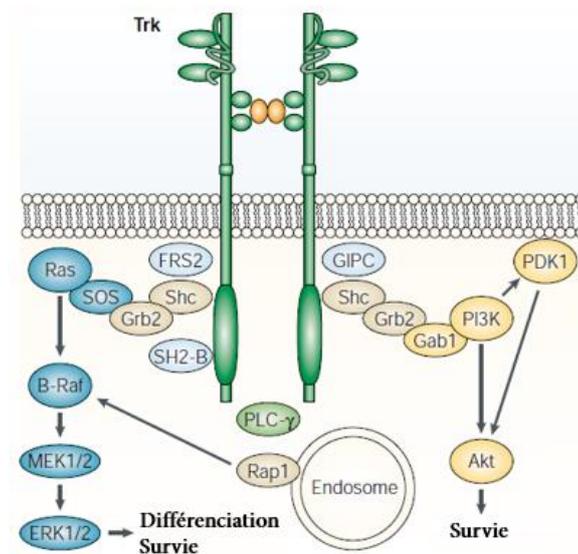


Figure 37. Signalisation des Trk (d'après Chao et al, 2003). Lors de la fixation du ligand (neurotrophine) sur le récepteur (Trk), l'activation de 3 voies majeures de survies est déclenchée : la voie PI3K/AKT, la voie des MAPK, la voie de la PLCγ.

c. Corécepteurs des Trk : CD44 et EphA2

L'action des Trk peut dépendre également de co-récepteurs tels que CD44 et EphA2. Le laboratoire INSERM U908 a ainsi montré que l'effet pro-invasif du proNGF nécessite l'action de TrkA et de la sortiline (Demont et al, 2012), et que les effets pro-tumoraux du NGF résultent du recrutement de CD44 par TrkA, aboutissant à l'activation de la voie p115RhoGEF/RhoA/ROCK1 indépendamment de la phosphorylation de TrkA (Aubert et al, 2015). De même, le laboratoire U908 a montré que le proNGF permet la formation d'un complexe sortiline/TrkA à l'origine du recrutement du récepteur tyrosine kinase EphA2 dans les cellules cancéreuses de sein, l'effet pro-invasif du proNGF étant dépendant de l'activation de Src par EphA2.

2. Récepteur p75^{NTR}

a. Découverte

La protéine p75^{NTR} fut identifiée en 1973 en tant que récepteur du NGF, ce qui lui valut initialement le nom de NGFR (NGF Receptor) (Herrup et al, 1973). Puis suite à la découverte de sa faible affinité pour le NGF ($K_d=10^{-9}$ M), il fut renommé LNGFR (pour low affinity NGFR) (Chao et al, 1986; Johnson et al, 1986; Radeke et al, 1987). Son nom a finalement évolué en p75^{NTR} (p75 Neurotrophin Receptor) après la découverte de sa capacité à lier les autres membres de la famille de neurotrophines (BDNF, NT-3 et NT-4/5) avec la même affinité dans la plupart des types cellulaires ($K_d=10^{-9}$ M) (Rodríguez-Tébar et al, 1990 et 1992). Le récepteur p75^{NTR} appartenant à la famille des récepteurs TNF (Tumor Necrosis Factor), est dit de « faible affinité » pour les neurotrophines matures, alors qu'il possède une forte affinité pour les proneurotrophines (Arévalo et al, 2006).

b. Structure

P75^{NTR} est un récepteur de 399 acides aminés répartis en un domaine extracellulaire (222 aa), un domaine transmembranaire (19 aa) et un domaine intracellulaire (158 aa), pour un poids moléculaire de 75 kDa (Figure 38).

Son domaine extracellulaire (N-terminal) contient des régions riches en cystéines qui, comme pour les Trk, permet la fixation des (pro)neurotrophines (Baldwin et al, 1992; Yan et al, 1991). P75^{NTR} présente également des sites de N et O-glycosylations dans la région juxtamembranaire, impliqués dans l'adressage du récepteur à la membrane et dans la liaison de ses ligands (Breuza et al, 2002 ; Gong et al, 2008).

Le domaine transmembranaire est composé d'une hélice α unique, dans laquelle la cystéine 257 est hautement conservée entre les espèces. Elle joue un rôle primordial dans la dimérisation du récepteur, dans le changement conformationnel induit par la liaison du ligand et dans la transduction du signal (Vilar et al, 2009).

Le domaine intracellulaire de $p75^{NTR}$ ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque et doit sa signalisation à son association avec des protéines adaptatrices cytoplasmiques qui peuvent se fixer sur différentes régions, notamment le domaine de mort et le domaine Chopper.

Le domaine de mort (DD pour Death Domain) est une structure globulaire d'environ 80 acides aminés comprenant 6 hélices α et phosphorylé sur des résidus sérines et thréonines. (Roux et al, 2002). Le domaine juxtamembranaire, également appelé domaine Chopper, est une petite région de 29 acides aminés qui est aussi capable de lier des protéines adaptatrices (Coulson et al, 2000).

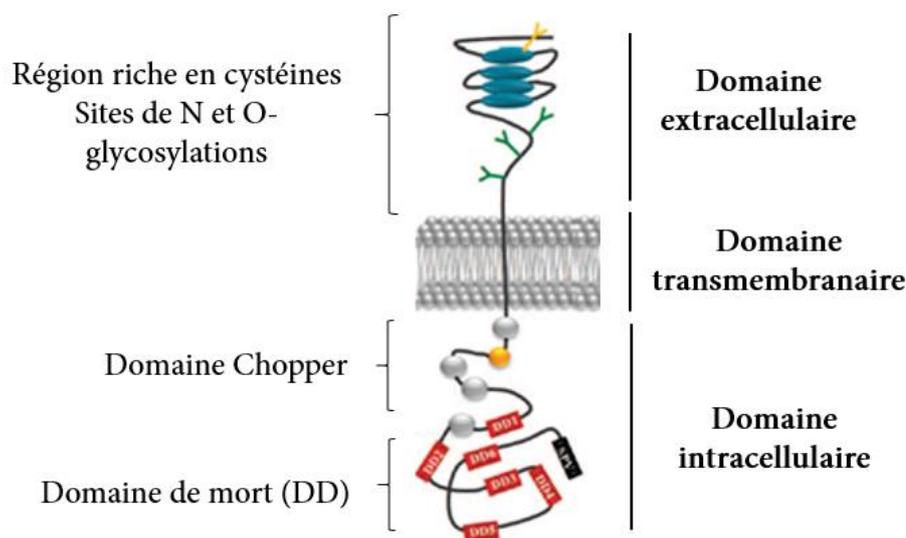


Figure 38. Structure du récepteur $p75^{NTR}$. Son domaine extracellulaire (N-terminal) contient des régions riches en cystéines qui, comme pour les Trk, permet la fixation des (pro)neurotrophines. Le domaine transmembranaire est composé d'une hélice α unique. Le domaine intracellulaire de $p75^{NTR}$ ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque mais possède un domaine de mort et un domaine Chopper.

c. Différentes formes de $p75^{NTR}$

De la même manière que pour les récepteurs de la famille Trk, le récepteur $p75^{NTR}$ présente différentes formes, qui peuvent être dues à un épissage alternatif ou à un mécanisme de protéolyse directe du récepteur (Figure 39).

L'épissage alternatif de l'exon 3 du gène NGFR conduit à la formation d'une forme tronquée du récepteur $p75^{NTR}$, qui possède un domaine extracellulaire très court composé du seul CRD. La forme tronquée de $p75^{NTR}$ ne peut plus lier les neurotrophines suite à la perte de

la partie extracellulaire riche en cystéines. Sa fonction reste actuellement inconnue (Dechant et al, 1997).

La forme complète de p75^{NTR} peut subir une protéolyse par une série de deux clivages successifs. Le premier clivage par la métalloprotéase ADAM17/TACE libère un fragment soluble correspondant à la partie extracellulaire du récepteur (p75^{NTR}-ECD) et une partie ancrée à la membrane (p75^{NTR}-CTF). Le deuxième clivage par le complexe γ -sécrétase a lieu dans la partie transmembranaire du fragment CTF et libère dans le cytoplasme la partie intracellulaire (p75^{NTR}-ICD), capable de se transloquer dans le noyau (Bronfman, 2007 ; Powell et al, 2009).

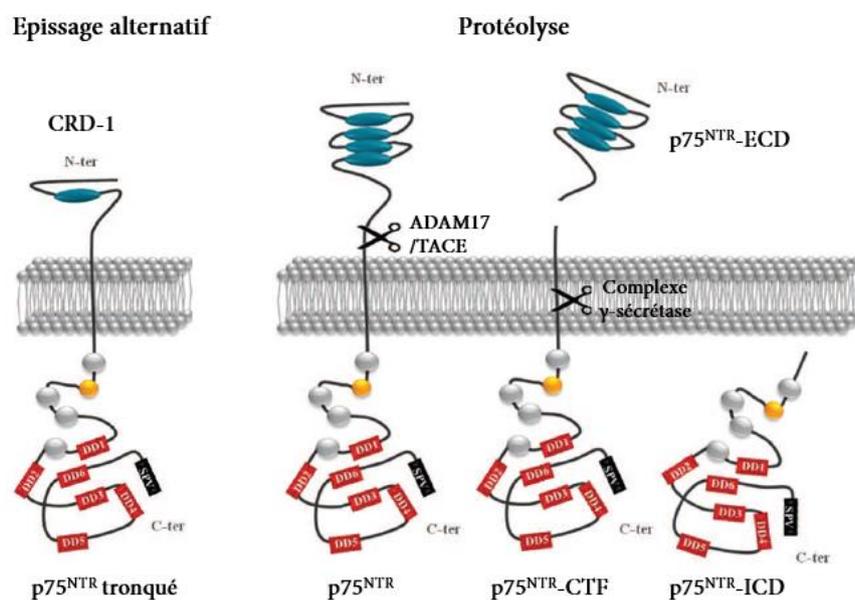


Figure 39. Les différentes formes du récepteur p75^{NTR} (d'après Chao et al, 2003). L'épissage alternatif de l'exon 3 du gène NGFR conduit à la formation d'une forme tronquée du récepteur p75^{NTR}, qui possède un domaine extracellulaire très court composé du seul CRD. La forme complète de p75^{NTR} peut subir une protéolyse par deux clivages enzymatiques successifs.

d. Signalisation de p75^{NTR}

Contrairement aux Trk, le récepteur p75^{NTR} est incapable de transphosphorylation sur son domaine cytoplasmique, et doit sa signalisation à son interaction avec d'autres récepteurs, au recrutement de partenaires protéiques au niveau de ses domaines intracellulaires et à sa protéolyse. Les multiples voies de signalisation activées par p75^{NTR} aboutissent, selon le contexte cellulaire, à la survie, la mort par apoptose, la régulation du cycle cellulaire ou la neurogénèse (Figure 40) (Roux et al, 2002). Ces rôles antagonistes sont dépendants du ligand fixé. Lorsqu'il

fixe des neurotrophines matures, le récepteur p75^{NTR} peut engager une signalisation de survie cellulaire, de différenciation ou de prolifération, mais lorsqu'il lie les proneurotrophines, il induit une mort par apoptose (Arévalo et al, 2006).

La survie cellulaire et la croissance axonale sont liés à l'activation du facteur de transcription NFκB mais aussi la voie PI3K/Akt (Roux et al, 2001 ; Arévalo et al, 2006; Nykjaer et al, 2005). En parallèle, les voies pro-apoptotiques mettent principalement en jeu l'activation de la voie JNK (c-Jun N-terminal Kinase) consécutivement au recrutement de la protéine adaptatrice Rac1 (Bhakar et al, 2003; Nykjaer et al, 2005). Le domaine de mort est capable de déclencher la cascade des caspases par l'activité d'effecteurs comme RIP2 et RhoA. Le domaine Chopper est capable de lier des protéines de la famille TRAF (TNF Receptor Associated Factor), entraînant l'apoptose. D'autres protéines adaptatrices comme SC-1, NRAGE, NRIF, NADE sont également impliquées. (Chao et al, 2003 ; Arévalo et al, 2006).

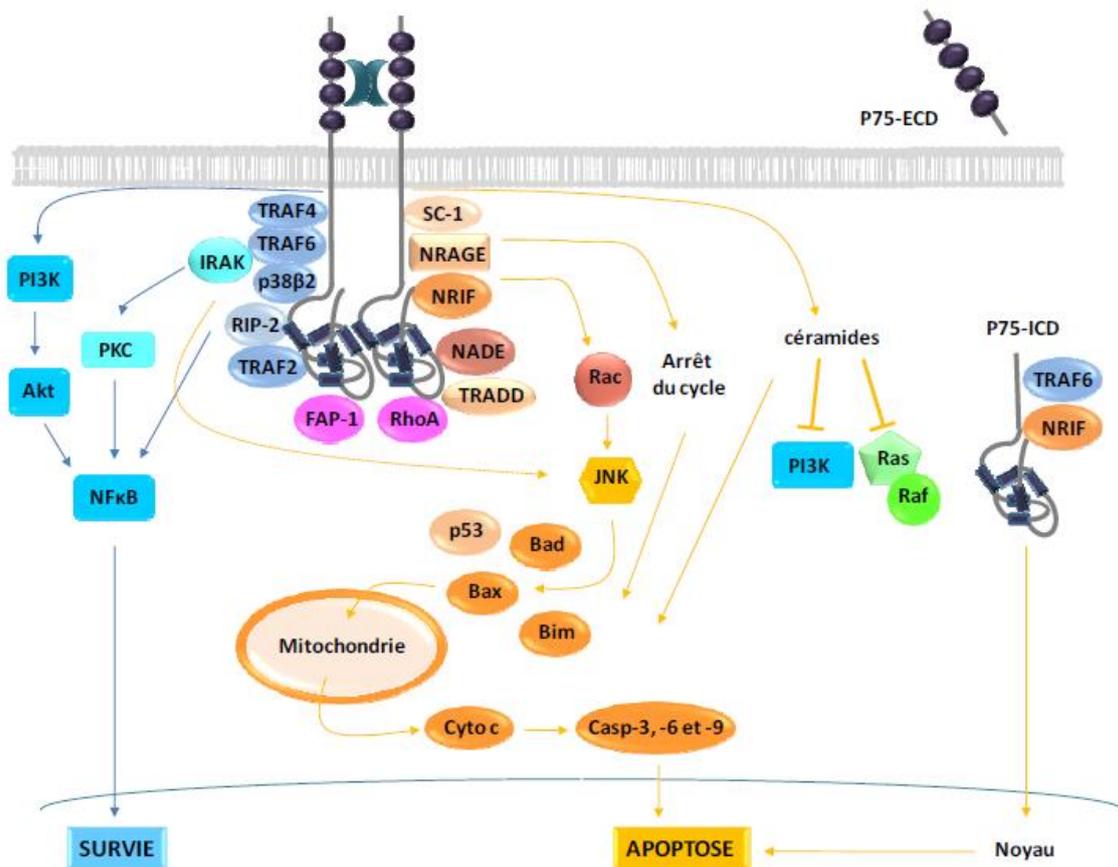


Figure 40. Signalisation du récepteur p75^{NTR}. Les multiples voies de signalisation activées par p75^{NTR} aboutissent, selon le contexte cellulaire, à la survie, la mort par apoptose, la régulation du cycle cellulaire ou la neurogénèse.

e. Corécepteurs de p75^{NTR}

Les effets induits par le récepteur p75^{NTR} sont très divers et un des mécanismes contribuant à cette diversité est la capacité de p75^{NTR} à coopérer avec d'autres récepteurs pour former des complexes multimériques : la famille des Trk, la sortiline et les récepteurs Nogo et LINGO-1 (LRR and Ig domain-containing Nogo receptor-interacting protein).

i. Famille des Trk

P75^{NTR} a la possibilité de se dimériser avec un récepteur de la famille Trk. La formation du complexe p75^{NTR}/Trk permet d'améliorer l'affinité et la spécificité de chaque neurotrophine pour son récepteur Trk ($K_d=10^{-11}$ M) et engage des voies de signalisation intracellulaire pro-survie principalement dans un contexte de survie cellulaire (Figure 41) (Chao et al, 1995; Esposito et al, 2001). Il semble que ce soit le récepteur Trk qui induise la sélectivité du ligand. En effet, l'association TrkA / p75^{NTR} ne peut lier que le NGF. De même le complexe TrkB/p75^{NTR} ne peut lier que le BDNF et TrkC/p75^{NTR} ne peut fixer que la NT3 (Yano et al, 2000). En conséquence, en absence de Trk, p75^{NTR} devient médiateur de mort cellulaire ou d'apoptose, et en présence de récepteur Trk, médiateur de survie cellulaire.

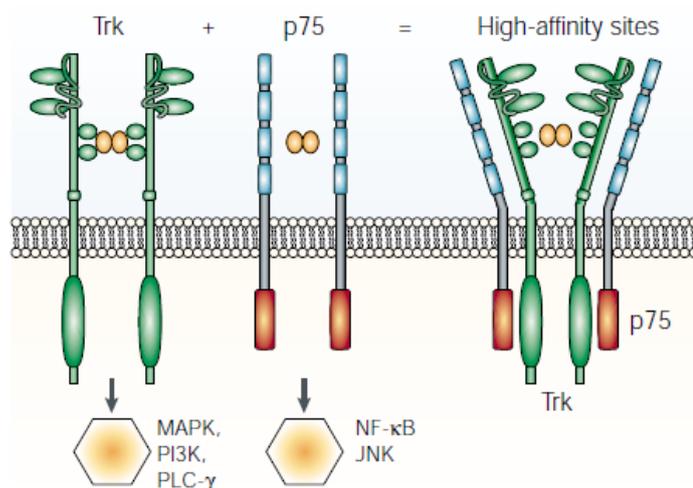


Figure 41. Formation du complexe p75^{NTR}/Trk (issu de Chao et al, 2003). Ce complexe permettant d'améliorer l'affinité et la spécificité de chaque neurotrophine pour son récepteur Trk et qui engage des voies de signalisation intracellulaire pro-survie principalement dans un contexte de survie cellulaire.

ii. Sortiline

La sortiline (ou récepteur NTSR3), est un des récepteurs à la neurotensine. Comme dans le cas des neurotrophines, la sortiline a été initialement retrouvée au niveau du système nerveux central, mais a été ultérieurement identifiée dans de nombreux autres organes comme le pancréas, les muscles ou l'intestin (Petersen et al, 1997). La sortiline présente un domaine extracellulaire riche en cystéines ainsi qu'une région peptide signal et un pro peptide. Comme pour la famille Trk et p75^{NTR}, le domaine transmembranaire est court et unique. Le domaine intracytoplasmique est relativement court et composé d'une séquence hexapeptidique d'internalisation. Ce domaine interne ne possède pas d'activité catalytique. Par conséquent, la sortiline seule ne peut pas induire l'activation de voies de signalisation, elle doit s'associer à un partenaire pour cela. L'association p75^{NTR}/sortiline permet la fixation des proneurotrophines, en particulier le proNGF et le proBDNF. Ils se fixent simultanément sur la sortiline par son prodomaine et sur p75^{NTR} par l'intermédiaire de sa partie mature, formant ainsi un complexe ternaire dont chacun des membres est nécessaire à l'induction de l'apoptose (Figure 42) (Nykjaer et al, 2004; Kowianski et al, 2018).

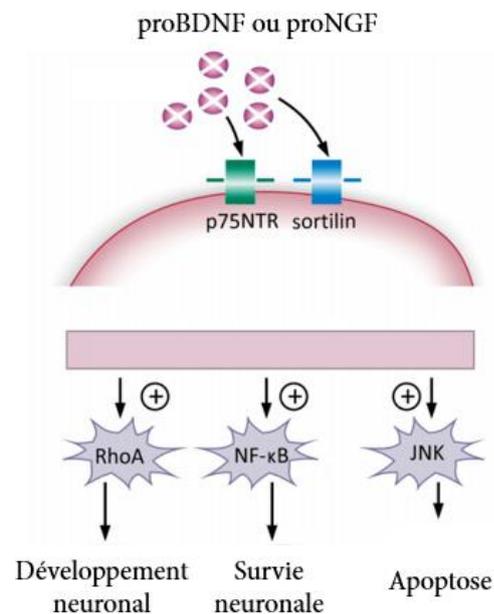


Figure 42. Signalisation du complexe p75^{NTR}/sortiline. Les signalisations intracellulaires induites par la liaison du proNGF ou du proBDNF sur le complexe p75^{NTR}/sortiline aboutissent à l'induction de l'apoptose (d'après Kowianski et al, 2018).

iii. Nogo et LINGO-1

La formation du complexe trimérique p75^{NTR}/NogoR/LINGO-1 est impliquée dans l'inhibition de la croissance neuronale (Mi et al, 2004).

C. Rôles des (pro)neurotrophines et de leurs récepteurs dans le cancer

Un nombre croissant d'études montre que les neurotrophines sont exprimées par des cellules non-neuronales et peuvent avoir un effet sur le développement tumoral, que cet effet soit pro ou anti-tumoral.

1. Néoplasies autres que mammaires
 - a. Effets pro-tumoraux

Le plus souvent, l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs contribue à la progression tumorale en favorisant la prolifération des cellules cancéreuses, l'apparition des métastases et l'angiogénèse, ainsi que la résistance aux traitements.

TrkB est décrit pour son action pro-tumorale dans les neuroblastomes, les gliomes, les tumeurs de Wilm's, les cancers de la prostate et du pancréas, les myélomes et les lymphomes hodgkiniens (Xiong et al, 2013; Eggert et al, 2001 ; Dionne et al, 1998 ; Sclabas et al, 2005 ; Renné et al, 2008). La dérégulation de son expression engage la progression tumorale dans les cancers épithéliaux en stimulant la prolifération, la survie cellulaire et l'angiogénèse puis agit sur leur dissémination en augmentant l'invasion et en inhibant l'anoïkis (Douma et al, 2004). L'interaction TrkB/BDNF est associée à un mauvais pronostic dans les neuroblastomes, les cancers de la vessie, du poumon, ou les cancers colorectaux (Yu et al, 2010 ; Lai et al, 2010 ; Okamura et al, 2012 ; Fan et al, 2014). Elle est fortement incriminée dans l'apparition de métastases, la résistance aux traitements ou l'angiogénèse dans les neuroblastomes et le cancer colorectal (Smit et al, 2009 ; Middlemas et al, 1999 ; Nakamura et al, 2006 ; Fan et al, 2014 ; de Farias et al, 2012).

L'activation du récepteur TrkA par le NGF est corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers de l'ovaire, de la thyroïde, de la prostate, ou du pancréas (Odegaard et al, 2007 ; Pierotti et al, 2006 ; Arrighi et al, 2010 ; Ma et al, 2008). Dans les carcinomes ovariens, l'observation *in vivo* de la co-expression du NGF, de phospho-TrkA et de molécules angiogéniques suggère un rôle de l'axe NGF/TrkA dans l'angiogenèse tumorale (Davidson et al, 2003).

La surexpression de p75^{NTR} a un effet pro-tumoral dans le mélanome ou dans les cancers des cellules squameuses (Chan et al, 2010 ; Søland et al., 2008).

L'implication des proneurotrophines dans les cancers est peu détaillée. Une intervention potentielle du proNGF dans la progression tumorale a été mise en évidence dans le cancer de la prostate, du pancréas et dans le mélanome (Delsite et al, 1999; Truzzi et al, 2008; Zhu et al, 2002). Le proBDNF, via sa liaison au p75^{NTR}, promeut la survie cellulaire et la migration dans les carcinomes rénaux à cellules claires (De la Cruz-Morcillo et al, 2016).

b. Effets anti-tumoraux

L'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs peut également avoir un effet anti-tumoral. Cet effet est généralement lié à l'expression du récepteur p75^{NTR}, qui a été identifié comme un suppresseur de tumeur dans les cancers gastriques, hépatiques, prostatiques, de la vessie et du pancréas (Jin et al, 2007; Yuanlong et al, 2008 ; Khwaja et al, 2006; Khwaja et al, 2003 ; Dang et al, 2006). Dans ces cancers, la surexpression de p75^{NTR} inhibe la croissance *in vitro* et *in vivo* en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1. Dans les cancers gastriques et prostatiques p75^{NTR}, inhibe la migration et l'invasion *in vitro* et la formation de métastases *in vivo*, par la diminution de la voie NFkB et de MMP-9 (Jin et al, 2007; Nalbandian et al, 2006). P75^{NTR} peut également induire l'apoptose dans le cancer de la vessie et de la prostate par la régulation des protéines impliquées dans la voie mitochondriale de l'apoptose (Khwaja et al, 2006; Tabassum et al, 2003).

Dans le neuroblastome le récepteur TrkA est associé à un bon pronostic et il induit la différenciation des cellules cancéreuses sous l'effet du NGF, bien que l'isoforme TrkA-III soit capable d'augmenter la tumorigenèse et l'angiogenèse *in vivo* (Nakagawara et al, 1997 ;

Tacconelli et al, 2004). Dans le carcinome médullaire de la thyroïde, la surexpression de TrkB dans les cellules hyperplasiques C inhibe la néoangiogénèse et limite la croissance tumorale (McGregor et al, 1999).

2. Rôles dans le cancer du sein

Le rôle des neurotrophines et de leurs récepteurs dans les cancers du sein a été très étudié au cours des dix dernières années. Comme dans les autres types tumoraux, leurs effets peuvent être pro ou anti-tumoraux.

In vitro et *in vivo*, la triade NGF/TrkA/p75^{NTR} stimulerait la survie et la prolifération des cellules cancéreuses de sein (Descamps et al, 1998; Adriaenssens et al, 2008; Lagadec et al, 2009; Verbeke et al, 2010; Verbeke et al, 2013). La régulation de l'expression de p75^{NTR} médiée par le NGF contribue à la résistance à la chimiothérapie dans les cellules de cancers du sein triple négatifs (Chakravarthy et al, 2016). *In vivo*, le proNGF favoriserait les métastases des cellules cancéreuses de sein via TrkA et la sortiline (Demont et al, 2012).

BDNF/TrkB joue des rôles importants dans le processus de métastase tumorale et est reconnu comme une cible thérapeutique potentielle dans le traitement du cancer du sein (Desmet et al, 2006 ; Roesler et al, 2011; Patani et al, 2011 ; Tajbakhsh et al, 2017). La surexpression de BDNF/ TrkB est associée à un pronostic sombre dans les cancers du sein, en particulier en favorisant des récives précoces dans les cancers du sein triple négatifs (Vanhecke et al, 2011 ; Tajbakhsh et al, 2017 ; Tsai et al, 2017). Une boucle de stimulation autocrine de BDNF et NT-4/5, médiée par p75^{NTR} et TrkB.T1, la forme tronquée de TrkB, résulte en la stimulation de la survie des cellules cancéreuses de sein, et la résistance à l'apoptose (Vanhecke et al, 2011).

Des études sur des lignées cellulaires cancéreuses de sein ont montré que p75^{NTR} pouvait induire une survie des cellules cancéreuses de sein (Descamps et al, 2001; El-Yazidi-Belkoura et al, 2003 ; Verbeke et al, 2010). D'un autre côté, l'expression de p75^{NTR} a été associée à un pronostic favorable dans les cancers du sein (Aragona et al, 2001; Reis-Filho, 2006; Sakamoto et al, 2001). Il est à noter que chez la femme, p75^{NTR} est un marqueur des cellules myoépithéliales

mammaires (Popnikolov et al, 2005), qui sont elles-mêmes reconnues comme un suppresseur de tumeur naturel (Sternlicht et al, 1997).

3. Rôle des neurotrophines sur les CSC

Le couple BDNF/TrkB pourrait favoriser le maintien des CSC de gliomes (Lawn, 2015). Les neurotrophines et leurs récepteurs seraient également impliqués dans la régulation des CSC mammaires. Les CSC TrkB⁺ seraient responsables des récurrences post-chimiothérapie dans les cancers du sein triple-négatifs (Yin et al, 2015). Par ailleurs le laboratoire U908, via les travaux d'Elisa Tomellini, a montré que le proNGF pouvait enrichir le pool de CSC dans des lignées cancéreuses de sein *in vitro* (Tomellini et al, 2015).

4. Potentialités thérapeutiques : inhibiteurs de Trk

Dans ce contexte, les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) et plus spécifiquement des inhibiteurs des récepteurs Trk ont émergé comme de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, dans le cancer du sein mais aussi d'autres néoplasies comme le cancer colorectal ou le cancer du poumon (Meldolesi, 2017; Demir et al, 2016; Russo et al, 2016; Rolfo et Racz, 2017). Plusieurs inhibiteurs de Trk sont actuellement en développement clinique. Deux d'entre eux, l'entrectinib et LOXO-101, sont actuellement en essais de phase 2, et d'autres inhibiteurs de Trk comme MGCD516, PLX7486, DS-6051b et TSR-011 sont actuellement en essais de phase 1 (Landman et al, 2017; Khotenskaya, 2017).

L'application des ITK en médecine vétérinaire est relativement récente. Seuls deux ITK ont été approuvés par la FDA pour le traitement des mastocytomes canins : le tocéranib (Palladia; Zoetis, Madison, NJ, USA) et le masitinib (Kinavet; Catalent Pharma Solutions, Somerset, NJ, USA) (Hahn et al, 2008; London et al, 2009). L'étude des ITK et spécifiquement des inhibiteurs de Trk chez les chiens pourraient s'avérer être un modèle de choix pour étudier la validité de ces nouveaux agents thérapeutiques (Altamura, 2017).

Objectifs de la thèse

Dans le cancer du sein, le laboratoire INSERM U908 a mis en évidence que les neurotrophines telles que le NGF stimulent la croissance des cellules cancéreuses *in vitro*, et favorisent la tumorigénèse *in vivo* (Dollé et al, 2003 ; Adriaenssens et al, 2008). Récemment, il a été démontré que le NGF et son précurseur le proNGF sont capables d'enrichir plusieurs lignées épithéliales cancéreuses de sein en CSC (Tomellini et al, 2015). L'objectif de mon projet de thèse était de comprendre le rôle des neurotrophines dans la régulation des CSC de sein, et d'évaluer si les mécanismes similaires pouvaient être observés dans le modèle canin de carcinogénèse mammaire spontanée.

La première partie de mon travail a donc consisté à identifier les modes d'action des neurotrophines aboutissant à l'enrichissement en CSC. Au cours de ma première année de thèse, j'ai ainsi cherché à déterminer quels membres des neurotrophines sont plus efficaces pour augmenter la population de CSC. J'ai ensuite cherché les voies de transduction impliquées, que ce soit au niveau de l'implication des différents (co)récepteurs ou au niveau des signalisations intracellulaires modulées par les neurotrophines dans les CSC.

La deuxième partie de mon travail de thèse a consisté à mettre en évidence puis valider les marqueurs de CSC (CD44 et CD24) et les cibles identifiées comme pertinentes (les neurotrophines BDNF et proNGF, et les récepteurs TrkA, TrkB et p75^{NTR}) dans le modèle canin de carcinogénèse mammaire spontanée. Quelques études ont prouvé l'existence des CSC dans les tumeurs canines, y compris les tumeurs mammaires (Michishita et al, 2011 et 2012) et ont montré qu'il était possible de détecter la présence de cellules présentant le phénotype CD44⁺/CD24⁻ par immunohistochimie (IHC) dans des échantillons de tumeurs mammaires canines fixées en blocs de paraffine (Magalhaes et al, 2013 ; Im et al, 2015). Très peu d'études ont été conduites pour l'instant sur la présence de neurotrophines et de leurs récepteurs chez le chien, et aucune ne concernant la présence de neurotrophines dans les tumeurs mammaires canines. Sur une cohorte de 96 tumeurs mammaires canines issues de la biobanque d'OCR (Oncovet Clinical Research), j'ai ainsi réalisé des marquages IHC avec des anticorps ciblant les marqueurs potentiels de CSC mammaires canines CD44 et CD24, les neurotrophines proNGF et BDNF et leurs récepteurs TrkA, TrkB et p75^{NTR}. J'ai ensuite corrélié les résultats obtenus en IHC avec la survie à 2 ans de 84 des animaux inclus dans l'étude. Ce travail a été réalisé en

collaboration avec Audrey Bobillier, de l'école vétérinaire de Lyon, qui s'est chargée du recueil des données de suivi des animaux.

Matériels et Méthodes

I. Culture cellulaire

A. Lignées cellulaires

Afin de préciser le rôle des neurotrophines sur les CSC d'une majorité de cancers de sein, nous avons décidé de tester l'impact des neurotrophines sur un panel de lignées cellulaires (Tableau 6) représentatif des différents types moléculaires de cancers du sein. Ces lignées sont de type luminal A (MCF-7 et T-47D), luminal B (BT-474), surexprimant HER2 (HCC1954) ou triple négatives basal-like (MDA-MB-231, SUM-159PT, HCC70 et BT-20). Les lignées cellulaires utilisées proviennent en majorité de l'American Type Culture Collection (ATCC), sauf pour les SUM-159PT qui proviennent d'Asterand Bioscience.

Lignée cellulaire	Fournisseur, Référence	Type moléculaire	ER	PR	HER2	Source du prélèvement	Type de tumeur
BT-20	ATCC® HTB-19™	Triple-négative basal-like	-	-	-	Tumeur primaire	Carcinome canalaire invasif
BT-474	ATCC® HTB-20™	Luminal B	+	+	+	Tumeur primaire	Carcinome canalaire invasif
HCC1954	ATCC® CRL-2338™	HER2+	-	-	+	Tumeur primaire	Carcinome canalaire
HCC70	ATCC® CRL-2315™	Triple-négative basal-like	-	-	-	Tumeur primaire	Carcinome canalaire
MCF-7	ATCC® HTB-22™	Luminal A	+	+	-	Epanchement pleural	Carcinome canalaire invasif
MDA-MB-231	ATCC® HTB-26™	Triple-négative basal-like	-	-	-	Epanchement pleural	Adénocarcinome
SUM-159PT	Asterand Bioscience Inc, CS-08-r03bt	Triple-négative basal-like	-	-	-	Tumeur primaire	Carcinome anaplasique
T-47D	ATCC® HTB-133™	Luminal A	+	+	-	Epanchement pleural	Carcinome canalaire invasif

Tableau 6. Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées (d'après Neve et al, 2006).

B. Conditions de culture et de conservation

1. Milieux de culture

Les références des différents milieux de culture utilisés pour l'entretien des cellules ou pour la création de milieux définis (milieu sphère, milieu de transfection ou milieu pour tests en agar mou) sont regroupées dans le Tableau 7, et les suppléments utilisés regroupés dans le Tableau 8. La composition des milieux de culture pour l'entretien des lignées est présentée dans le Tableau 9.

Milieux de culture	Fabricant	Distributeur	Référence
DMEM/F-12 (1X) No phenol red	Gibco	Life Technologies	11039-021/-047
DMEM (1X)	Gibco	Life Technologies	42430-025/-082
DMEM (1X) + Glutamax	Gibco	Life Technologies	21885-025/-108
F-12 Nut Mix (Ham) 1X	Gibco	Life Technologies	21765-029/-037
MEM (1X)	Gibco	Life Technologies	31095-029/-052
MEM (10X)	Gibco	Life Technologies	21430-020
Opti-MEM(1X) + Glutamax	Gibco	Life Technologies	51985-026/-042
RPMI Medium 1640 (1X)	Gibco	Life Technologies	31870-025
RPMI Medium 1640 + Glutamax	Gibco	Life Technologies	61870-010/-044

Tableau 7. Milieux de culture utilisés pour l'entretien des cellules ou entrant dans la composition de milieux définis.

Suppléments	Fabricant	Distributeur	Référence	Concentration stock
HEPES Buffer Solution (1M)	Gibco	Life Technologies	15630-056/-122	1M
Sodium Bicarbonate Solution 7,5%	Gibco	Life Technologies	25080-060/-102	7,5%
MEM-NEAA Non Essential amino acids (100X)	Gibco	Life Technologies	11140-050/35	100X
Insulin Solution Human	Sigma	Sigma	I9278-5mL	10mg/mL
BSA Solution 30%	Sigma	Sigma	A9576-50mL	30%
Pénicilline-Streptomycine (10000U/mL)	Gibco	Life Technologies	15140-122/-163	10000U/mL
Heparin Sodium salt from porcine intestinal mucosa	Sigma	Sigma	H3393-100KU	100mg/mL
FBS (SVF)	Hyclone	Thermo	SV 30160-03	100%
L-Glutamine (200mM)	Gibco	Life Technologies	25030024	200mM
Hydrocortisone	Sigma	Sigma	H6909	50 µM

Tableau 8. Suppléments utilisés pour l'entretien des cellules ou entrant dans la composition de milieux définis.

Lignée cellulaire	Milieu de base	SVF	Insuline	NEAA	HEPES	Hydrocortisone	Pénicilline - Streptomycine
BT-20	DMEM+Glutamax	10%	-	1%	-	-	0,4%
BT-474	RPMI 1640	10%	-	1%	-	-	0,4%
HCC1954	RPMI 1640	10%	-	1%	-	-	0,4%
HCC70	RPMI 1640	10%	-	1%	-	-	0,4%
MCF-7	DMEM ou MEM	10%	10 µg/mL	1%	-	-	0,4%
MDA-MB-231	MEM	10%	-	1%	-	-	0,4%
SUM-159PT	F-12 Nut Mix (Ham)	5%	5 µg/mL	-	10mM	1µg/mL	0,4%
T-47D	RPMI 1640+Glutamax	10%	-	1%	-	-	0,4%

Tableau 9. Composition des milieux de culture pour l'entretien des lignées cellulaires.

2. Entretien des cultures

Toutes les lignées cellulaires sont incubées en normoxie (21 % d'O₂ et 5% de CO₂) à 37°C sous atmosphère humide. Les cellules sont cultivées dans des flasques de 75 cm² (Falcon) avec 10 ml de milieu complet. Lorsque les cellules sont à 80% de confluence, elles sont rincées

au PBS 1X (Phosphate Buffer Saline, Gibco) puis décollées à l'aide de 1 ml de trypsine-EDTA 0,05% (Gibco) pendant quelques minutes à 37°C. La trypsine est ensuite inactivée par ajout de milieu supplémenté en SVF. Les cellules sont centrifugées à 300 g pendant 5min à température ambiante. Le surnageant est retiré et les cellules du culot sont comptées sur une lame de Malassez et remises en culture en flasques de 75 cm² pour l'amplification et le maintien en culture ou dans des supports adéquats pour les expérimentations. Le milieu de culture est changé tous les deux jours sauf pour les HCC70 qui nécessitent un changement de milieu quotidien. Les passages se font du 1/3 au 1/6^e pour les HCC70 au temps de doublement très long (environ 96h), du 8^e au 1/12^e pour les autres lignées, et jusqu'au 1/16^e pour les MDA-MB-231 qui ont le temps de doublement le plus court (environ 20h). Après une vingtaine de passages successifs, et dès qu'une série d'expériences est menée à son terme, un nouvel aliquot de cellules est décongelé pour repartir du même nombre de passages initial.

L'aspect des différentes lignées en culture est présenté dans la Figure 43.

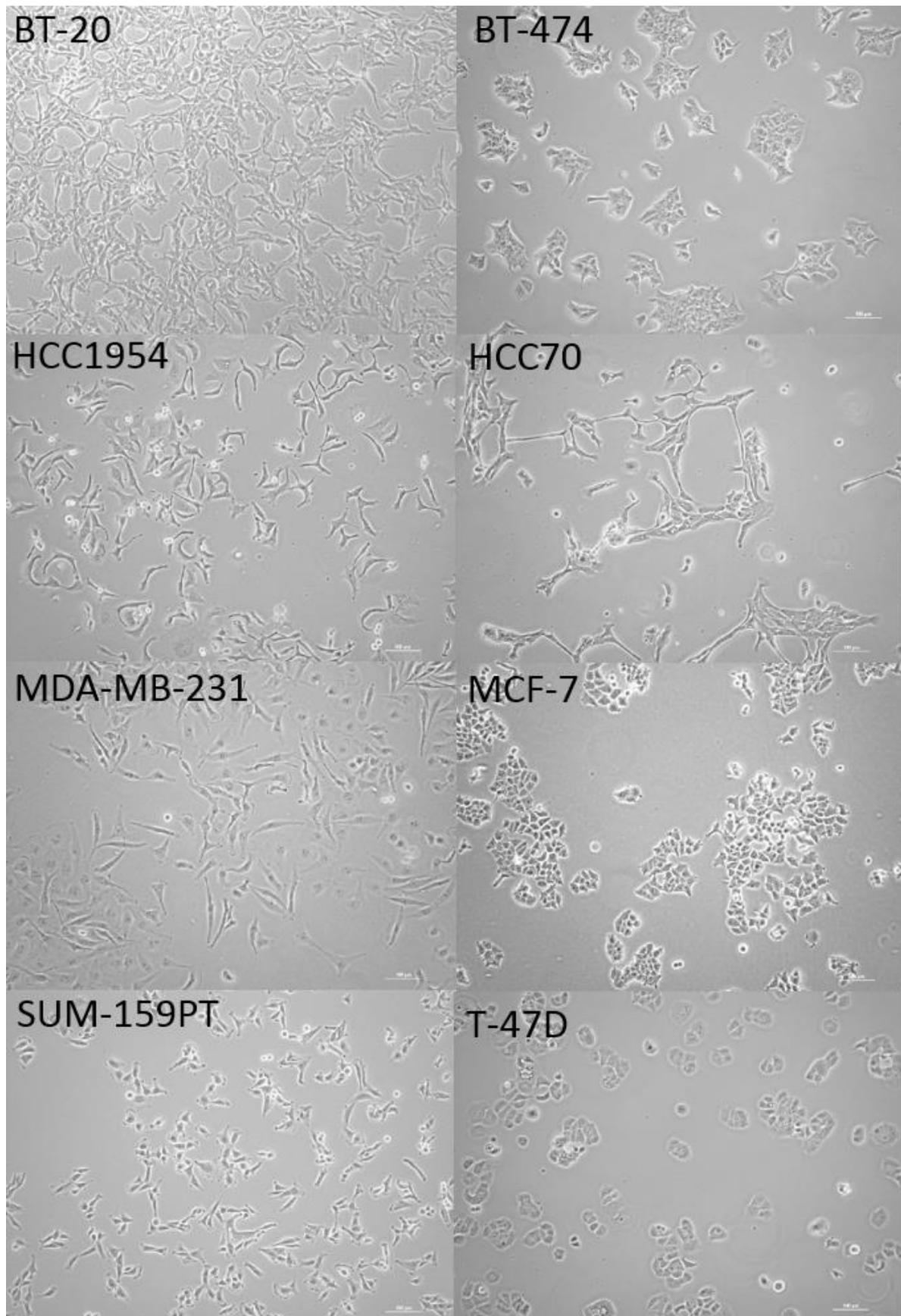


Figure 43. Aspect des différentes lignées cellulaires utilisées en culture d'entretien, à densité moyenne pour les BT-20 et faible pour les autres lignées.

C. Traitements des cellules par les neurotrophines

1. Molécules utilisées pour les traitements

Toutes les neurotrophines et proneurotrophines proviennent de Alomone Labs (Tableau 10). Les références de proBDNF et proNGF choisies sont des formes résistantes au clivage. Sur la lignée HCC1954 surexprimant HER2 et présentant de hauts niveaux d'EGFR, des traitements ont également été réalisés avec du trastuzumab (Herceptin®, Roche) et du cetuximab (Erbix® , Merck Biopharma), à une dose de 50 µg/mL.

(pro)neurotrophine	Fournisseur, références	Source	Poids moléculaire (monomère)
NGF	Alomone Labs, N-245	Recombinant, E.Coli	13,5 kDa
proNGF	Alomone Labs, N-285	Recombinant, E.Coli	25 kDa
BDNF	Alomone Labs, B-250	Recombinant, E.Coli	13,5 kDa
proBDNF	Alomone Labs, B-256	Recombinant, E.Coli	25,7 kDa

Tableau 10. Références des (pro)neurotrophines utilisées pour le traitement des cellules.

2. Types de traitement

Nous avons utilisé deux types de protocoles de traitements par les neurotrophines. Les deux protocoles permettent d'étudier des phénomènes différents et d'obtenir des informations complémentaires sur les mécanismes d'enrichissement du compartiment des CSC sous l'effet des neurotrophines.

a. Traitement continu

De précédentes expériences menées dans l'unité INSERM U908 (thèse d'Elisa Tomellini) ont montré que le NGF et son précurseur le proNGF sont capables d'enrichir plusieurs lignées épithéliales cancéreuses de sein en CSC (BT-20, MCF-7, T-47D). Dans ces expériences, les cellules placées en conditions non adhérentes étaient soumises à un traitement continu par les neurotrophines. Cette modalité de traitement permet d'évaluer l'effet des neurotrophines sur la division des CSC et de leurs progénitrices déjà présentes dans la

population. Les modalités du traitement continu par les neurotrophines sont présentées dans la Figure 44.

Dans le cas du traitement continu, les cellules sontensemencées en plaques 6 puits puis laissées en culture pendant 48 ou 96 heures selon leur temps de doublement, le but étant d'obtenir une confluence de 80% maximum. Au terme de cette période, les cellules sontensemencées en plaques 96 puits non adhérentes, en présence des neurotrophines, selon les modalités définies au paragraphe V.B. (Test de mammosphères). Au terme des 7 jours, les sphères sont comptées.

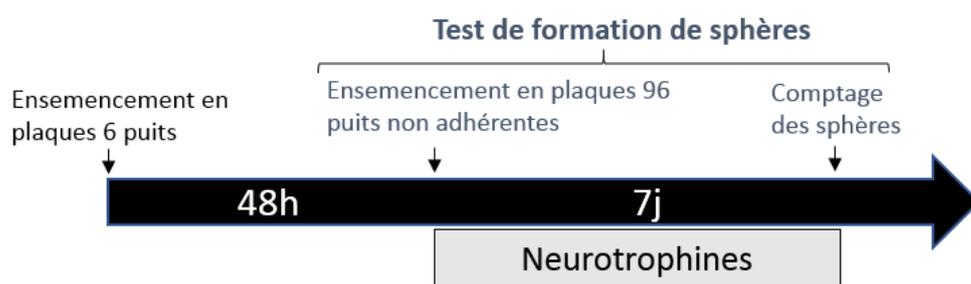


Figure 44. Traitement continu par les neurotrophines avant test de formation de sphères.

b. Pré-traitement

Nous avons également choisi de réaliser un pré-traitement des cellules cultivées en monocouche avec les neurotrophines afin d'évaluer si l'augmentation du nombre de CSC induite par les neurotrophines est due à une augmentation des divisions des CSC et/ou à la reprogrammation de non CSC en CSC. Afin que l'action des facteurs de croissance présents dans le sérum du milieu de culture cellulaire n'interfère pas avec l'action des neurotrophines, les cellules sont placées dans un milieu réduit en sérum (0,5 à 1% selon la résistance des lignées à ce pseudo-sevrage) pendant toute la durée du traitement aux neurotrophines. Un test préalable de résistance au sevrage a été réalisé sur toutes les lignées. Après 24 ou 48h de traitement, les cellules sont soumises au test de formation de mammosphères en conditions non adhérentes afin d'évaluer le pool de CSC et de progénitrices dans la population ainsi traitée. Les modalités du pré-traitement sont présentées dans la figure 3.

Dans le cas de la lignée HCC1954 surexprimant HER2 et l'EGFR, un traitement au trastuzumab (Herceptin®, Roche) ou au cetuximab (Erbix®, Merck Biopharma) a parfois été ajouté en même temps que les neurotrophines, à des doses de 50 µg/mL et sur la même durée d'exposition que les neurotrophines (24h).

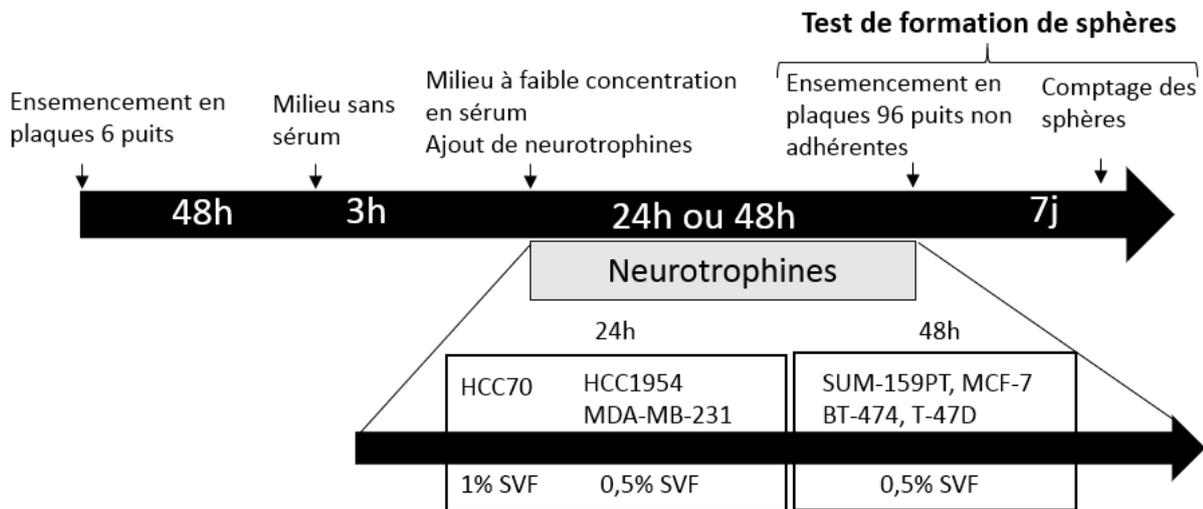


Figure 45. Pré-traitement par les neurotrophines avant test de formation de sphères. Les lignées sont soumises à un pseudo-sevrage à 0,5% ou 1% de SVF pendant 24 à 48h.

II. Transfection cellulaire

A. Expériences d'ARN interférence

Les expériences d'ARN interférence sont réalisées en utilisant l'INTERFERin® siRNA Transfection Reagent (Cat n°409-10, Polyplus Transfection®). Le milieu de transfection sans sérum utilisé est l'Opti-MEM(1X) + Glutamax (Gibco, Life Technologies) ou du milieu de culture propre à la lignée transfectée sans sérum.

1. Reconstitution des siRNA

Les siRNA (Tableau 11) proviennent d'Eurogentec, et sont reçus sous forme lyophilisée. Le tube de poudre est centrifugé à 300 g pendant 1 minute. Le siRNA Buffer stérile RNase et DNase free 1X est ajouté de façon à obtenir une concentration de 20 µM. Le tube est ensuite placé en agitation à température ambiante pendant 30 minutes sur une roue, puis centrifugé

brièvement. Le siRNA est aliquoté dans des tubes Eppendorf de 500 μ L autoclavés et conservé à -20°C. Le siRNA contrôle utilisé est le siGENOME Non-targeting siRNA #1 (Réf. D-001210-01-05) de Dharmacon.

Cible		Séquence des siRNA
TrkA	FW	GCU-GCA-GUG-UCA-UGG-GCA-A55
	REV	UUG-CCC-AUG-ACA-CUG-CAG-C55
p75 ^{NTR}	FW	AUG-CCU-CCU-UGG-CAC-CUC-C55
	REV	GGA-GGU-GCC-AAG-GAG-GCA-U55
EphrineA2	FW	AAU-GAC-AUG-CCG-AUC-UAC-AUG-55
	REV	CAU-GUA-GAU-CGG-CAU-GUC-AUU-55

Tableau 11. Séquences des siRNA utilisés pour les expériences d'ARN interférence.

2. Protocole de transfection

Dans le cas où les cellules traitées sont en boîtes de Petri Ø100, pour chaque condition, 1 μ L de siRNA à 20 μ M est ajouté dans 500 μ L d'opti-MEM, vortexé pendant 10 secondes, et centrifugé rapidement. Puis, 20 μ L d'INTERFERin® sont ajoutés dans chaque tube, sans aspirer/refouler pour ne pas casser le complexe siRNA/agent de transfection. Les tubes sont vortexés chacun pendant 10 secondes et laissés à reposer à température ambiante pendant 10 min. Les boîtes de Petri Ø100 contenant les cellules sont rincées 2 fois au PBS1X à température ambiante, et le milieu de culture est remplacé par 5mL d'opti-MEM. Les 500 μ L de mix de transfection sont alors ajoutés directement dans les boîtes de culture goutte à goutte en répartissant sur toute la surface. Après 6h de transfection, 5mL de milieu à 10% de SVF sont ajoutés par-dessus. L'efficacité maximale d'inhibition des siRNA est observée après 24h d'incubation. Dans le cas où les cellules sont traitées en plaques 6 puits, toutes les quantités sont à diviser par 5.

B. Création de clones stables MDA-MB-231 pNanog-mNeptune et pNanog-GFP

Les systèmes rapporteurs consistent à mettre un fluorophore sous la dépendance d'un promoteur qui a une activité spécifique dans les CSC comparé aux non CSC. Nous avons ainsi créé des clones stables MDA-MB-231 pNanog-mNeptune et pNanog-GFP dans le but d'identifier et d'isoler une population enrichie en CSC. La mise au point des vecteurs fait partie du travail de thèse de Nadège Bidan (INSERM U908).

1. Méthode de création des vecteurs

Les vecteurs sont créés avec la technologie e-Zyvec (brevet De Bettignies *et al.*, PCT/FR2016/050305), qui permet de produire des vecteurs d'expression circulaires sans utiliser de vecteur d'entrée préconçu. Le principe est d'assembler plusieurs fragments d'ADN linéaires considérés comme des briques fonctionnelles en une seule réaction enzymatique (Figure 46). L'utilisation d'adaptateurs nucléotidiques placés de part et d'autre des briques fonctionnelles permet d'agencer les briques fonctionnelles selon l'ordre souhaité : chaque adaptateur est complémentaire de l'adaptateur présent sur la brique fonctionnelle adjacente. Ces adaptateurs sont éliminés lors de la réaction enzymatique. Seules des sutures nucléotidiques faisant partie intégrante des séquences voulues subsistent : le vecteur produit ne contient donc que les séquences fonctionnelles souhaitées.

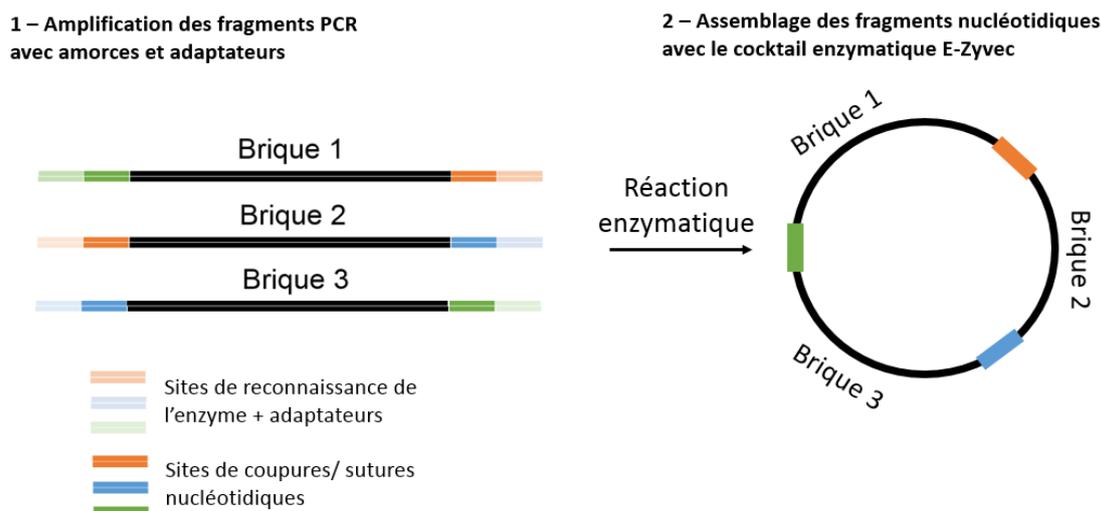


Figure 46. Représentation schématique des étapes de construction d'un vecteur avec la technologie E-Zyvec. Les briques fonctionnelles sont amplifiées par PCR en utilisant des amorces contenant des adaptateurs complémentaires. Les fragments nucléotidiques sont ensuite assemblés avec le cocktail enzymatique E-Zyvec.

Les briques fonctionnelles flanquées des adaptateurs nucléotidiques sont créés par amplification par PCR, en utilisant des amorces contenant des adaptateurs complémentaires. Les fragments PCR sont ensuite purifiés avec le kit Clean up System de Promega selon les instructions du fabricant et dosés avec un Nanodrop Multiskan Go (ThermoFisher). L'assemblage des briques fonctionnelles pour former le vecteur circulaire est réalisé dans un volume réactionnel de 10 μ L contenant les différentes briques diluées ainsi que le cocktail réactionnel breveté. Les vecteurs sont ensuite amplifiés via une transformation bactérienne, réalisée sur des bactéries compétentes (*E. coli*) du kit One shot® TOP10 Competent Cells (Invitrogen). Les plasmides sont alors extraits des bactéries à l'aide du kit d'extraction QIAprep Spin (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Les plasmides sont enfin séquencés. Chaque amorce utilisée pour le séquençage est séparément mélangée avec le plasmide d'intérêt et les mélanges sont envoyés à la société GATC (Constance, Allemagne) pour séquençage par la méthode de Sanger. La reconstitution de la séquence complète est réalisée grâce au logiciel SerialCloner, puis comparée aux séquences initiales des matrices.

2. Vecteurs utilisés

Le système de rapporteurs repose sur l'expression spécifique des promoteurs dans les CSC par rapport aux non CSC. Nous avons sélectionné le promoteur sélectionné Nanog, un facteur de pluripotence au rôle essentiel dans le maintien du phénotype des CSC, déjà utilisé comme système rapporteur dans les CSC de sein (Buczek et al, 2018).

Plusieurs vecteurs ont été utilisés : trois vecteurs pNanog-mNeptune et un vecteur pNanog-GFP. En se basant sur les données de la littérature, trois versions de chaque promoteur de Nanog, correspondant à 3 séquences de différentes longueurs, ont été clonées (Figure 47). La lignée SUM-159PT étant celle initialement utilisée au laboratoire U908, les vecteurs ont été clonés à partir de l'ADN génomique des cellules SUM-159PT. Les séquences correspondantes sont quasiment identiques à celles des MDA-MB-231.

D'après la littérature, un site consensus de fixation du complexe oct-4/sox-2 sur le promoteur de Nanog est indispensable à l'expression du gène (Kuroda et al, 2005). Les séquences de promoteurs contenaient donc a minima ce site consensus. La séquence minimale mesurait 498 nucléotides (séquence B6), la deuxième séquence était 2 fois plus longue (1123 nt, B7) et la dernière 3 fois plus longue (1529 nt, B9) (Thiagarajan et al, 2015 ; Kuroda et al, 2005). Le vecteur pNanog-GFP est un vecteur B7, de taille intermédiaire, composé de 1125 paires de base. Les vecteurs se composent des promoteurs, de la séquence codant mNeptune ou mGFP, d'une séquence codant la résistance à la kanamycine/néomycine et de l'origine de réplication bactérienne ColE1 (séquences nommées Ori-Neo/Kana).

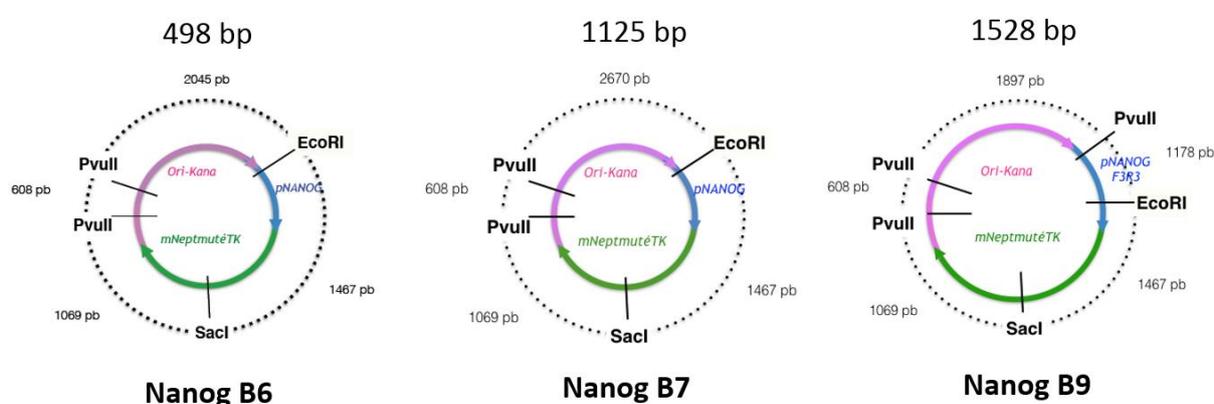


Figure 47. Structure des vecteurs pNanog-mNeptune. Le vecteur B6 comporte 498 paires de bases, B7 comporte 1125 paires de bases et B9 comporte 1528 paires de bases.

3. Nucléofection en lignée cancéreuse de sein et sélection

Les vecteurs extraits sont transfectés dans les cellules d'intérêt (MDA-MB-231) par nucléofection (principe d'électroporation). Les cellules sont menées à 75-80% de confluence maximum, puis trypsinisées et comptées. Un million de cellules sont mises en suspension dans un tampon de nucléofection spécifique, et un microgramme du plasmide d'intérêt est ajouté. La nucléofection est réalisée en utilisant l'appareil Amaxa (Lonza) selon les instructions du fabricant, et en choisissant un programme adapté à ce type cellulaire. Après la nucléofection, les cellules sont immédiatement transférées dans du milieu de culture contenant du SVF, et incubées 24h à 37°C. Pour l'obtention de lignées stables, les cellules sont ensuite sélectionnées avec de la généticine (1 mg/ml) pendant deux à trois semaines afin d'obtenir une population exprimant stablement les vecteurs rapporteurs de CSC (mNeptune ou mGFP sous la dépendance de pNanog ou pALDH1A1).

III. Analyse transcriptomique

A. Extraction des ARN totaux

Le tampon de lyse est constitué d'un mix de 350 μ L de tampon RLT et de 3,5 μ L de β -mercaptoéthanol (Sigma). Les cellules sont lysées soit en culot cellulaire, soit directement en boîtes de Petri \varnothing 100 mm. Dans le premier cas, le culot est resolubilisé dans le tampon de lyse sous sorbonne, et laissé une nuit à -80°C pour associer une lyse mécanique à la lyse chimique. Dans le second cas, le tampon de lyse est ajouté directement sur les cellules platées en boîte de Petri \varnothing 100 mm, après rinçage au PBS 1X. Les cellules sont laissées une nuit à -80°C entourées de parafilm puis raclées le lendemain sous sorbonne. L'extraction des ARN totaux est alors réalisée avec le RNeasy® Mini Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant. L'ARN est élué dans 40 μ L d'H₂O MQ. Le dosage des ARN totaux obtenus est réalisé grâce à un Nanodrop Multiskan Go (Thermofisher). S'ils ne sont pas utilisés de façon extemporanée, les ARN sont conservés à -20°C.

B. Transcription inverse des ARN

Les transcriptions inverses sont réalisées sur un Mastercycler® Personal 5332 eppendorf, avec le kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System pour RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies). Dans un volume total de 10 µL, 2 µg d'ARN sont mélangés à 0,3 µL d'amorces aléatoires et 1 µL de dNTPmix à 10mM. Le mélange est incubé 5 minutes à 65°C pour hybridation des amorces sur l'ARN et élimination des structures tertiaires. Puis, 12 µL de mélange pour synthèse de cDNA sont ajoutés, composés de 4 µL de 5XRT Buffer, 4µL de MgCl₂ à 25mM, 2µL de DTT à 0,1M, 1µL de RNase OUT à 40U/µL, et 1µL de Superscript IIIRT à 200U/µL. Cette dernière est remplacée par de l'H₂O MQ pour les contrôles négatifs. Le tout est incubé pendant 10 minutes à 25°C, 50 minutes à 50°C et 5 minutes à 85°C. Le cDNA est stocké à -20°C pour une utilisation ultérieure.

C. PCR quantitative (qPCR)

1. Protocole de qPCR

Pour les PCR quantitatives, les ADNc sont dilués au 1/2 dans de l'eau RNase free. La réaction de PCR quantitative est réalisée en utilisant le kit Quantifast® SYBR® Green avec 2 µL d'ADNc (1µg) et 1 µM d'amorces. Les amorces sens et antisens de nos différents gènes d'intérêt proviennent toutes d'Eurogentec (Tableau 12).

Cible		Amorces
TrkA	FW	GAACCCACAATACTTCAGTG
	REV	TCCTTCAGTGCCTTGACAG
TrkB	FW	AGCATGAGCACATCGTCAAG
	REV	ATATGCAGCATCTGCGACTG
TrkB-T1	FW	TAAAACCGGTCGGGAACATC
	REV	ACCCATCCAGTGGGATCTTA
NGF	FW	CAACAGGACTCACAGGAGCA
	REV	ACCTCTCCCAACACCATCAC
p75NTR	FW	CGACAACCTCATCCCTGTCT
	REV	TTGTTCTGCTTGCAGCTGTT
Sortiline	FW	CCGTCCTATCAATGTGATTAAG
	REV	CCATATGGTATAGTCCTTCTC
EphrineA2	FW	TGGACTACGGCACCAACTTC
	REV	TAGAAGCCTTTGCGGGTGAG
CD44 covX	FW	CGTCTCAAATACCATCTCAGC
	REV	TCATCAATGCCTGATCCAGA
BDNF	FW	TGGCTGACACTTTCGAACAC
	REV	CCTCATGGACATGTTTGCAG
Beta2-microglobuline	FW	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC
	REV	GATGCTGCTTACATGTCTCG

Tableau 12. Séquences des différentes amorces utilisées lors des réactions de PCR quantitatives.

Les réactions de PCR quantitatives sont réalisées avec l'appareil C1000 Touch™ Thermal cycler (BIO-RAD). Le programme utilisé consiste en une étape de dénaturation à 95°C pendant 5 minutes (pour activer la Taq Hot Start polymérase) suivie de 40 cycles composés chacun d'une dénaturation à 95°C pendant 10 secondes puis d'une hybridation des amorces à 55 ou 59°C pendant 30 secondes permettant l'élongation. La température d'hybridation utilisée est de 59°C pour toutes les cibles d'intérêt sauf TrkA, qui a une température d'hybridation de 55°C.

Le gène de ménage utilisé est la microglobuline. Chaque gène d'intérêt est répété en triplicats et les contrôles consistent en une ligne NTC (Non Transcrit Control) contenant uniquement les amorces sans ADN, permettant de vérifier la formation de dimères d'amorces, ainsi qu'un puits RT- pour chaque lignée avec les amorces du gène de ménage.

2. Interprétation des données

Les données obtenues sont analysées grâce au logiciel Summit 4.3. L'émission de fluorescence du SyBR Green permet de déterminer un « cycle seuil » ou Ct (Cycle threshold) correspondant au nombre de cycles de PCR nécessaires pour détecter la fluorescence pour un gène d'intérêt. Cette valeur est à la base des calculs pour quantifier l'ADN amplifié. Les résultats sont exprimés en quantité relative ou Relative Quantities (RQ). Le ΔCt correspond au Ct du gène étudié auquel on soustrait le Ct du gène de référence. Le $\Delta\Delta Ct$ correspond au ΔCt de la condition contrôle auquel on soustrait le ΔCt de la condition étudiée. Enfin la quantité relative ou RQ correspond à $2^{-\Delta\Delta Ct}$

IV. Analyse protéique

A. Extraction des protéines en condition dénaturante

1. Extraction protéique

L'extraction protéique est réalisée soit sur des culots cellulaires (conservés à -80°C), soit sur des cellules platées en boîte de Petri $\varnothing 100\text{mm}$, avec un tampon de lyse « maison » pour récepteurs membranaires. Ce tampon de lyse est composé d'une base commune, qui peut se conserver plusieurs mois, et de réactifs ajoutés de façon extemporanée pour obtenir le tampon de lyse final (Tableau 13).

Les boîtes de Petri contenant les cellules à lyser sont placées sur glace. Le milieu est éliminé, et les cellules rincées 2 fois avec 5mL de PBS 1x à 4°C , puis 100 μL de tampon de lyse sont ajoutés goutte à goutte et répartis sur toute la surface des boîtes de Petri. L'incubation se déroule pendant 10 à 20 minutes sur glace. Pour améliorer l'efficacité du tampon de lyse, les boîtes de Petri sont laissées une nuit à -20°C ou -80°C , entourées de parafilm, afin d'entraîner une lyse mécanique des cellules par les cristaux de glace. Les cellules sont ensuite raclées et le lysat obtenu est récupéré et centrifugé pendant 10 minutes à 14000G et $+4^{\circ}\text{C}$. Le surnageant est récupéré et utilisé immédiatement ou conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

Réactif	Quantité	Rôle
Base commune		
HEPES 1M pH 7,5	200 µL	Solution tampon pour stabiliser le pH
EDTA 10mM pH 8.0	500 µL	Inhibiteur de protéases cations divalents-dépendantes
NaCl 5M	120 µL	Provoque un choc osmotique des cellules
NaPPi 0,1M	500 µL	Inhibiteur de phosphatases
Triton X-100	50 µL	Détergent doux
H2O MQ	3,33 mL	
Réactifs ajoutés de façon extemporanée pour obtenir le tampon de lyse final		
SDS 20%	5 µL/mL	Détergent
NaF 1M	50 µL/mL	Inhibiteur des Ser/Thr phosphatases
Glycérol 10%	100 µL/mL	Stabilise les conformations protéiques
Na3VO4 100mM	15 µL/mL	Inhibiteur des Tyr phosphatases
PMSF 0,1M	10 µL/mL	Inhibiteur de protéases
PIC au 1/100e	10 µL/mL	Inhibiteur de protéases

Tableau 13. Composition du tampon de lyse pour protéines membranaires. Le tampon est formé à partir d'une base commune et de réactifs ajoutés de façon extemporanée pour obtenir le tampon de lyse final (ajout dans un premier temps des composés grisés : SDS, NaF et glycérol puis dans un deuxième temps du Na₃VO₄, du PMSF et du PIC).

2. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées sur un Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific) grâce à un test au BCA (BiCinchoninic Acid Assay), en référence à une gamme étalon contenant de la BSA (Bovine Serum Albumine). La lecture de DO s'effectue à 562 nm. Ce test se base sur la réduction du Cu²⁺ en Cu¹⁺ par les protéines dans un milieu alcalin. Le Cu¹⁺ est ensuite mis en évidence par l'acide bicinchoninique.

B. Protein arrays

1. Principe

Les protein arrays ou biopuces à protéines sont utilisées pour détecter l'expression de protéines dans un échantillon complexe selon le principe d'une interaction antigène/anticorps. La protéine se fixe sur un anticorps préalablement déposé sur une membrane de nitrocellulose

et est détectée de façon immunologique (par un deuxième anticorps) ou de façon chimique (liaison à un fluorophore) (Figure 48). Cette méthode permet la détection en parallèle de plusieurs protéines par support en analysant un seul échantillon ou en comparant deux échantillons protéiques marqués différemment. Cette technique est à rapprocher de la technique Elisa (enzyme-linked immunoabsorbent assay) qui s'appuie aussi sur la réalisation d'un sandwich immunologique entre une protéine et deux anticorps dirigés contre des épitopes différents de cette protéine. L'avantage de la technique de biopuce à protéines est de pouvoir étudier différentes protéines en un seul dépôt d'échantillon.

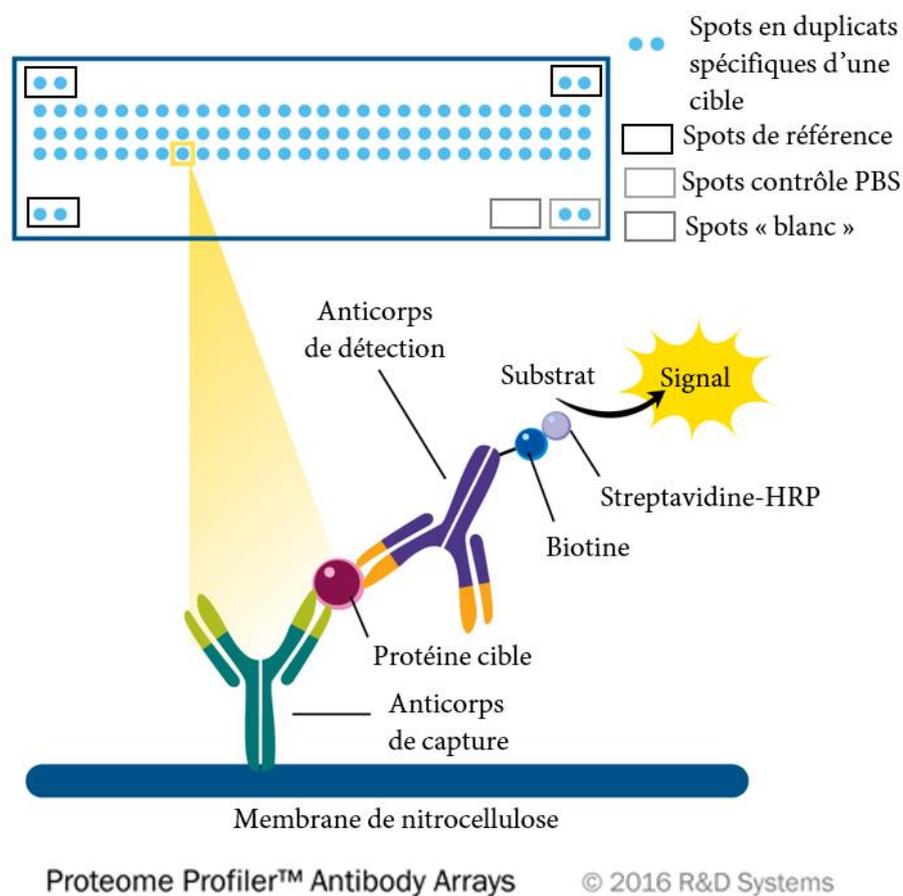


Figure 48. Principe des Proteome Profiler™ Antibody Arrays. La protéine se fixe sur un anticorps préalablement déposé sur une membrane de nitrocellulose et est détectée de façon immunologique (par un deuxième anticorps) ou de façon chimique (liaison à un fluorophore).

Les kits Proteome Profiler™ Antibody Arrays permettent de réaliser une étude analytique sur lysats cellulaires ayant subi différents traitements ou à différents temps en déposant ces échantillons sur une membrane de nitrocellulose et en les hybridant avec différents

anticorps. Les anticorps contrôle et de capture sont disposés en duplicats sur les membranes de nitrocellulose. La révélation après incubation avec l'échantillon testé s'effectue par chimioluminescence. Les avantages d'une telle méthode par rapport aux méthodes classiques sont de pouvoir étudier rapidement et en parallèle plusieurs protéines préalablement choisies pour leur implication dans certaines voies de signalisation. Les Protein Arrays permettent également de détecter les niveaux relatifs de phosphorylation de nombreuses kinases.

2. Kits utilisés

Différents kits Proteome Profiler™ Antibody Arrays (R&D systems) ont été utilisés, l'un d'entre eux permettant l'identification des marqueurs de CSC et les trois autres kits s'intéressant aux kinases et à leur phosphorylation :

- Human Pluripotent Stem Cell Array Kit (reference ARY010)
- Human Phospho-RTK Array Kit (Référence ARY001B)
- Human Phospho-kinase Array Kit (Référence ARY003B)
- Human Phospho-MAPK Array (Référence ARY002B)

Le kit Human Pluripotent Stem Cells permet de détecter les niveaux d'expression relatifs de 15 marqueurs de CSC dont les facteurs de pluripotence Oct-3/4, Nanog, Sox-2, et les marqueurs de TEM : E-cadherin, Goosecoid (GSC) et Snail.

Le kit phospho-RTK permet de screener 49 RTKs humaines phosphorylées dont l'EGFR, ErBB2, FGF, TrkA, TrkB, TrkC, EphA2. Le kit phospho-kinase permet quant à lui de détecter le niveau de phosphorylation relatif de 43 kinases et 2 protéines liées. Enfin, le kit human Phospho-MAPK array permettait d'analyser le statut de phosphorylation de 26 kinases faisant partie des trois familles majeures de Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) (9 cibles), les Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK1/2), les c-Jun N-terminal Kinases (JNK1-3) et différentes isoformes de p38 ($\alpha/\beta/\delta/\gamma$), ainsi que d'autres protéines intracellulaires telles que Akt, GSK-3, la kinase p70S6, TOR, p53 et CREB, qui sont d'importants régulateurs additionnels de transduction du signal médiant le développement et la prolifération cellulaire.

C. Protocoles

1. Conditions testées

Les MDA-MB-231 sont ensemencées en boîtes de Petri Ø100mm, à raison de 150.000C par boîte et de 4 boîtes par condition testée. Après 48h, le milieu à 10% SVF est remplacé par du milieu à 0,5% SVF pendant 3h. Pour les Protein Arrays Human Pluripotent Stem Cells, les cellules sont ensuite traitées pendant 24h, toujours en milieu à 0,5% de SVF, soit avec de l'EGF/bFGF, du NGF à 16nM ou du proNGF à 0,5nM. Pour les Protein Arrays RTK, MAPK et phospho-kinase, les cellules sont ensuite traitées à l'EGF/bFGF pendant 10min, au proNGF pendant 5min ou 10min. Cette faible durée d'exposition se base sur des expériences réalisées au sein du laboratoire U908, indiquant une cinétique d'action très rapide du proNGF. Dans chaque expérience, un pool de cellules n'était pas traité (condition 0).

Après ce laps de temps (5minutes, 10minutes ou 24h), le milieu est aspiré, les cellules rincées deux fois rapidement au PBS chaud et 75 µL de tampon de lyse sont ajoutés dans chaque boîte de Petri pour stopper les réactions. Les boîtes de Petri sont laissées 30 minutes sur glace puis toute la nuit à -80°C avant raclage et dosage des protéines selon les modalités définies plus tôt.

Les tests MAPK et phospho-kinase ont été réalisés une seule fois, le test Human Pluripotent Stem cell a été réalisé deux fois, et le test RTK a été réalisé 3 fois.

2. Principe d'utilisation des membranes

Pour les kits Human Pluripotent Stem Cells, phospho-kinase et phospho-MAPK array, les lysats cellulaires sont dilués dans le tampon spécifique du kit, mélangés à un cocktail d'anticorps de détection biotinylés, et incubés sur la nuit avec les membranes de nitrocellulose. Chaque complexe protéine/anticorps de détection est lié à son anticorps de capture correspondant immobilisé sur la membrane. Les membranes sont ensuite lavées pour éliminer le matériel non fixé. Les membranes sont incubées pendant 30 minutes avec de la Streptavidine-HRP (HorseRadish Peroxidase). Le signal est détecté par chimioluminescence avec un mélange

de peroxyde d'hydrogène et de luminol. L'intensité du signal produit à chaque spot de capture est proportionnelle, selon le kit, à la quantité de protéines (kit Human Pluripotent Stem Cells), de cytokines (kit phospho-kinase) ou de protéines phosphorylées (kit phospho-MAPK array) fixées.

Pour le kit phospho-RTK array, les lysats cellulaires sont dilués et incubés avec les membranes. Les anticorps de capture fixent le domaine extracellulaire des RTKs qu'ils soient phosphorylés ou non. Le matériel non fixé est ensuite éliminé par rinçages. Un anticorps pan anti-phospho-tyrosine conjugué à la HRP est ensuite appliqué pour détecter uniquement les tyrosines phosphorylées sur les récepteurs activés par chimioluminescence.

La quantité de lysat à ajouter varie selon les kits. Les recommandations du fabricant sont de 200 µg pour le kit phospho-MAPK array, 300 µg pour les kits Human Pluripotent Stem cells et phospho-RTK et de 2x200 µg pour le kit phospho-kinase qui est composé de deux membranes complémentaires.

La révélation repose sur une réaction de chimioluminescence. Elle est due à l'oxydation du luminol par l'oxygène, produit par l'action de la peroxydase sur le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) contenu dans le réactif. La membrane est mise en contact pendant 1 minute avec le mélange luminol:H₂O₂ du kit dans les proportions 1:1. Il se forme un composé intermédiaire instable qui, en revenant à l'état stable, émet de la lumière. La mesure de fluorescence est réalisée grâce au système d'acquisition d'images ImageQuant™ LAS-4000 mini (GE Healthcare Life Science). Une série de 10 photographies avec temps d'exposition croissant (toutes les 30 secondes) sont prises. Dans le cas où le signal obtenu n'est pas suffisant, un kit Supersignal® West FEMTO Maximum Sensitivity substrate (Thermo Scientific) est utilisé. Là encore le mélange appliqué sur la membrane est composé en quantités égales de luminol et de peroxyde, et est laissé au contact de la membrane pendant 5 minutes avant révélation.

D. Méthode de quantification

La quantification est réalisée grâce au logiciel Multi Gauge software. Pour chaque membrane, un spot blanc est défini, servant de référence pour le niveau de bruit de fond présent

sur la membrane. Pour tous les autres points, ce bruit de fond est soustrait. Dans notre exemple (Figure 49), le spot blanc est représenté par le spot 107. Les spots 105 et 106 sont les 2 spots PBS ou témoins négatifs. Une moyenne des 6 spots de référence est ensuite réalisée, afin d'effectuer une normalisation de leur valeur à 100%. Pour chaque cible, la moyenne des 2 spots est réalisée, et normalisée par rapport à la moyenne des spots de références.

Concernant la comparaison de deux membranes, pour chaque cible, la valeur de fluorescence de la membrane 1 est normalisée par rapport aux spots de référence de la membrane 1, sous la valeur « Norm mb 1 ». La valeur « Norm mb 2 » est obtenue de la même façon sur la membrane 2. La valeur $(\text{Norm mb 2} / \text{Norm mb 1} \times 100) - 100$ nous permet de déterminer le % d'augmentation ou de diminution de fluorescence de la cible entre la membrane 1 et la membrane 2.

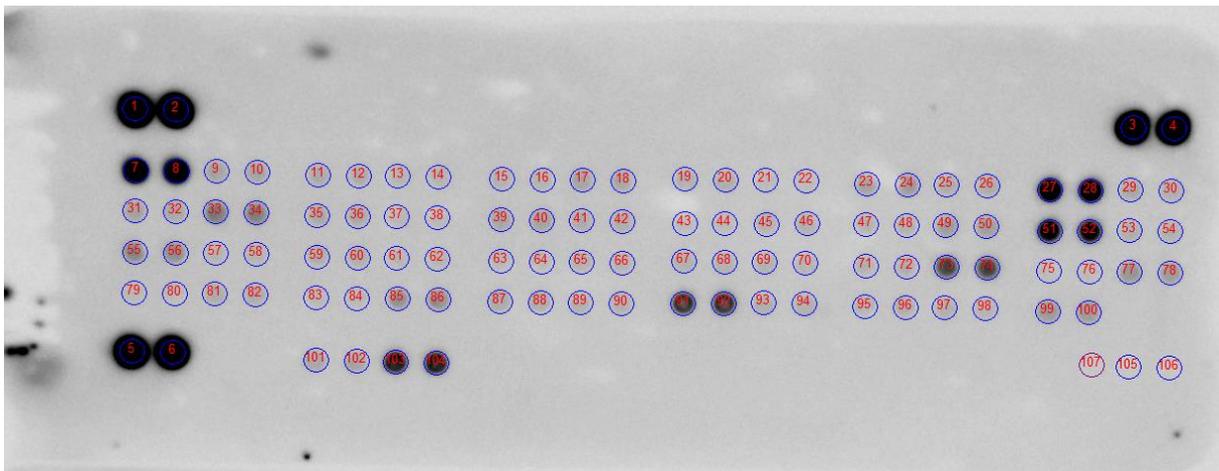


Figure 49. Exemple de quantification sur une membrane de nitrocellulose du kit Human Phospho-RTK array.

V. Formation des mammosphères

A. Composition du milieu sphère

Pour le test de mammosphères, les cellules sont suspendues dans un milieu défini composé de DMEM/F12 auquel sont ajoutés de la BSA, du supplément B27, de l'héparine, de l'insuline, de la pénicilline/streptomycine dans les quantités définies dans le Tableau 14. L'EGF et le bFGF sont ajoutés uniquement dans certaines conditions détaillées plus loin. Pour l'ensemble des tests de mammosphères, les cellules ne sont pas décollées avec de la trypsine mais avec du StemPro® Accutase® Cell dissociation Reagent (Gibco, Life Technologies). L'accutase est toujours réchauffée à température ambiante et non au bain-marie.

Composant	Fournisseur	Référence	Stock []	Final []	Volume (mL)
DMEM/F12 no phenol red	Gibco	11039-021/-047	1X	1X	500
BSA	Sigma	A9576-50mL	30%	0,4%	6,6
B27 supplement	Gibco	17504-044		1X	10
Heparine	Sigma	H3393-100KU	100 mg/mL	4 ug/mL	0,02
Insuline	Sigma	I9278-5mL	10mg/mL	5 µg/mL	0,25
Peni/Strep	Gibco	15140-122/-163			2
EGF	Sigma	E9644		20 ng/mL	0,5
FGF	Sigma	233-FB		20 ng/mL	

Tableau 14. Composition du milieu défini pour le test de mammosphères.

B. Formation de mammosphères en milieu sans ancrage

Les plaques utilisées pour les tests de mammosphères sont des plaques 96 puits low adhesion (CELLSTAR® greiner bio-one, Cat.-No.655185 96 well suspension culture plate). Dans le cas de la lignée MDA-MB-231, des plaques coatées avec du PolyHEMA, un polymère hydrogel, sont également utilisées. Une solution mère de PolyHEMA à 120 mg/mL est obtenue en ajoutant 4,8 g de polyhéma (Sigma. Ref.P3932-25G) à 40 ml d'éthanol à 95°. Le mélange est placé une nuit à 50°C puis conservé à 4°C à l'obscurité. La solution de travail à 12 mg/mL est obtenue en diluant la solution mère au 1/10^e dans l'éthanol 95°. Pour les plaques 96 puits, 50 µl de cette solution sont ajoutés par puits. Puis les boîtes sont placées une nuit à l'étuve à 37°C sur un agitateur, et conservées dans des sachets étanches à 4°C à l'abri de la lumière.

1. Dilutions successives

Le principe des dilutions successives est d'ensemencer les cellules en diminuant leur nombre de moitié de colonne en colonne jusqu'à obtenir des colonnes ne contenant théoriquement plus aucune cellule. Ainsi, sur une 1^{ère} colonne de 8 puits contenant chacun 512 cellules, la 2^{ème} colonne contient 256 cellules et ainsi de suite (Figure 50).

Pour l'ensemencement en plaques 96 puits, les cellules traitées selon des protocoles décrits précédemment sont rincées avec du PBS 1X à 37°C puis décollées avec l'acutase et comptées sur cellule de Malassez.

Pour obtenir 512 cellules par puits dans la première colonne, la suspension cellulaire en milieu sphère doit contenir 1024 cellules/100µL (la quantité de cellules étant ensuite divisée par 2 par transfert de la moitié du volume dans la colonne suivante). Afin de ne pas modifier la composition du milieu sphère, 15 à 50 µl maximum de milieu avec sérum contenant les cellules ont été ajoutés dans 1ml de milieu sphère pour avoir une concentration de 1024 cellules /100µl.

	Col 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ligne A	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	0
B	512											
C	512											
D	512											
E	512											
F	512											
G	512											
H	512											

Figure 50. Représentation schématique du test de mammosphères en dilutions successives. Le principe est d'ensemencer les cellules en diminuant leur nombre de moitié de colonne en colonne jusqu'à obtenir des colonnes ne contenant théoriquement plus aucune cellule.

Les plaques 96 puits sont d'abord remplies avec 100 µL de milieu sphère par puits à l'aide d'une pipette multicanaux. Puis 100 µL de suspension cellulaire sont ajoutés dans chaque puits

de la première colonne. Avec une pipette multicanaux, et après homogénéisation des 200 μL de milieu, 100 μL de la première colonne sont prélevés et déposés dans la deuxième colonne, et ainsi de suite jusqu'à la dernière colonne. Les 100 μL excédentaires sont jetés.

L'évolution du nombre de cellules dans les puits est suivie régulièrement. A J0, des cellules unitaires doivent être observées dans les puits de la plaque 96 puits. A J1, seuls des cellules unitaires ou des amas de 2 cellules devaient être observés. Si des amas de plus de deux cellules sont observés, ils correspondent à de l'agrégation. En effet les cellules ont tendance à s'amasser sur les bords. Le premier comptage est réalisé à J4 minimum et J15 maximum, avec généralement un comptage à J7 ou J8. Tous les 5 jours, de 50 à 100 μL de milieu sphère supplémenté ou non en neurotrophines sont ajoutés dans chaque puits. Par ailleurs de l'H20 MQ stérile est placée entre les puits pour limiter l'évaporation.

Lors de l'analyse des résultats, les puits périphériques, correspondant aux colonnes 1 et 12 et lignes A et H sont le plus souvent éliminés à cause d'une évaporation plus marquée que dans les autres puits.

2. Une cellule par puits

Le principe est d'ensemencer une seule cellule par puits et de compter le nombre de puits dans lesquels une mammosphère s'est développée, ce qui permet de déduire un pourcentage de cellules capables de former des mammosphères. Pour chaque condition, 3 plaques 96 puits sont ensemencées, pour un total de 288 puits. Après décollement et comptage des cellules selon le protocole décrit précédemment, une dilution intermédiaire au 1/100^e était réalisée. La dilution est ensuite ajustée afin d'obtenir 1 cellule pour 100 μL soit 100 cellules dans 10mL de milieu sphère. Comme pour les dilutions successives, 100 μL de milieu sphère sont déposés dans les puits, puis 100 μL de suspension cellulaire, contenant théoriquement une cellule par puits. La présence d'une cellule par puits est vérifiée après ensemencement, et le nombre de sphères formées est compté après 7 jours.

3. Sur plusieurs générations

Les mammosphères ont également été cultivées sur plusieurs générations. Dans des flasks de 75 cm² non adhérentes, 10.000C/mL sontensemencées à raison de 30mL par flask. Après 7 jours, les sphères sont dissociées et une partie des cellules obtenues est réensemencée pour former la génération suivante.

Afin de dissocier les sphères, des pipettes Pasteur sont effilées en faisant chauffer leur extrémité avec une flamme. Puis les 30mL de milieu contenant les sphères sont récupérés dans un falcon de 50mL. Le milieu est centrifugé pendant 5 minutes à 300g. Le surnageant est récupéré et 200 µL d'acutase sont ajoutés au culot pendant 5 minutes à 37°C. Le culot est alors dissocié par pipetages successifs avec la pipette pasteur effilée. 800 µL de milieu sont ajoutés, et la suspension cellulaire est à nouveau aspirée/relâchée une dizaine de fois. Les cellules sont ensuite comptées sur cellules de Malassez au bleu trypan, et réensemencées à la quantité souhaitée, à savoir 10.000C/mL dans une nouvelle flask de 75cm².

4. Dans du Matrigel

Pour la lignée MDA-MB-231, le test de mammosphères a également été mené dans du Matrigel (BD 356237 phenol red free). Après une première dilution intermédiaire au 1/100^e, 50 ou 100 cellules sont suspendues dans 50 µL de milieu sphère puis mélangées par pipetage aller-retour à 50 µL de matrigel, préalablement décongelé sur glace pendant plusieurs heures. Les 100 µL du mélange suspension cellulaire/matrigel sont alors déposés sous forme de goutte au centre d'une boîte de Petri de Ø35mm, et placées très délicatement à l'étuve à 37°C pendant 30 minutes pour que le matrigel se solidifie. 3 mL de milieu chauffé à 37°C sont ensuite ajoutés pour recouvrir la goutte. Le nombre de colonies formées est surveillé et compté à J+7, avec une efficacité de clonage attendue de l'ordre de 50-80%.

VI. Test de clonogénicité

A. En milieu 10% SVF

Les cellules sontensemencées en boîte de Petri Ø100, à raison de 1000 cellules par puits, dans du milieu supplémenté à 10% de SVF. Après 7 jours de culture, le milieu est aspiré, les cellules rincées au PBS 1X, puis fixées avec du paraformaldéhyde 4% à 4°C durant 30 minutes. Après 3 rinçages au PBS, les cellules sont colorées au crystal violet à 0,1% sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes et le nombre de colonies formées est compté.

B. Croissance en agar mou

Un dernier test de clonogénicité plutôt qu'un réel test de mammosphères a été réalisé avec du Bacto Agar (BD Industrial/Difco 214010).

Une solution d'agar à 1,25% est préparée en mélangeant 1,25g de Bacto AGAR à 100 mL d'H₂O MQ. La solution est autoclavée 15 minutes à 121°C puis maintenue à l'étuve à 56°C jusqu'à utilisation. Une solution de MEM 2X est ensuite préparée en ajoutant dans un volume total de 250mL : 50mL de MEM 10X, 50mL de SVF décomplémenté (20%), 5mL de L-glutamine, 5mL d'acides aminés non essentiels, 2mL de pénicilline-streptomycine, 14 mL bicarbonate à 7,5% et 124mL d'H₂O MQ stérile.

Le gel d'agar est composé de deux couches : une couche de Base Agar au contact de la boîte de Petri et une couche de Top agar 0,39%, contenant les cellules. La couche de base agar est composée de 55% de MEM 2X et 45% d'agar 1,25%, pour aboutir à un mélange à 0,56%. Ce mélange est maintenu tout au long des expériences au bain marie à 40°C. La première couche est coulée dans les boîtes de Petri, à raison de 2mL sur une boîte 6cm et 500µL en plaque 12 puits, de façon à former un petit film. L'agar est ensuite laissé à refroidir. La deuxième couche est composée de top agar à 0,39%. Pour couler quatre boîtes à 50.000 cellules par boîte, un volume de 12 mL de TOP agar à 0,39% contenant 200.000 cellules est nécessaire. La suspension cellulaire est préparée en dernier. Les cellules sont trypsinisées, neutralisées et comptées. Les 200.000 cellules sont alors suspendues dans 3,6mL de milieu MEM complet 1X. Le mélange

d'agar à 0,56% est ensuite ajouté rapidement aux cellules, à raison de 8,4mL pour obtenir un total de 12mL. Le top agar est ensuite coulé dans les boîtes à raison de 3mL par boîte puis mis à l'étuve à 37°C.

Du milieu MEM est ajouté régulièrement (tous les 2 jours) sur le gel afin d'éviter son évaporation, et en plaques 6 puits, de l'H2O MQ stérile est placée entre les puits pour limiter ce phénomène. Les colonies formées sont comptées après 7 jours.

VII. Test Aldefluor

Le kit AldefluorTM (Stemcell technologies) a été utilisé pour mesurer l'activité de l'enzyme aldéhyde déshydrogénase par cytométrie en flux.

Après traitement en plaques 6 puits selon les modalités définies plus haut, les cellules sont décollées à l'accutase, comptées et centrifugées. Elles sont ensuite diluées dans la quantité de Buffer Aldefluor nécessaire de façon à obtenir 1 million de cellules par mL, avec un minimum de 750 µL. La suspension cellulaire est alors répartie en trois tubes Eppendorf contenant chacun 250 µL. Dans le premier tube témoin, rien n'est ajouté. Dans le second tube l'Aldefluor uniquement est ajouté et dans le troisième tube à la fois de l'Aldefluor et du DEAB sont ajoutés, à raison de 2,5 µL de DEAB et 1,25 µL d'Aldefluor dans 250 µL. Les tubes sont agités manuellement, puis placés à l'étuve à 37°C pendant 30 minutes. Toutes les 10 minutes, les tubes sont agités pour remettre les réactifs en suspension. Après la demi-heure d'incubation, les tubes sont centrifugés, le surnageant est aspiré et le culot resuspendu dans 250 µL de Buffer ALDH.

VIII. Immunomarquage des CSC dans les lignées cancéreuses

Pour tous les marquages décrits ci-après, le début du protocole est identique. Les cellules sont traitées avec les neurotrophines selon les modalités décrites plus haut, puis rincées avec du PBS1X chaud, décollées avec de l'accutase et comptées en vue du marquage. Dans tous les cas, les cellules sont décollées à une confluence maximum de 80%. Un tube contrôle isotypique et

un tube contrôle auto, contenant les cellules non marquées, sont analysés en même temps que les cellules marquées. Tous les marquages sont réalisés directement dans les tubes de cytométrie.

A. Anticorps utilisés

Les anticorps utilisés pour l'immunomarquage des CSC dans les lignées cancéreuses mammaires ainsi que les isotypes correspondants sont regroupés dans les Tableaux 15 et 16.

Anticorps	Clone	Fournisseur, référence	Espèce hôte	Dilutions	Temps d'incubation
CD44-FITC	G44-26 (C26)	BD Pharmingen™, Ref.555478	Souris	1:50	30 min
CD24-PE	ML5	BD Pharmingen™, Ref.555428	Souris	1:50	30 min
CD133-APC	AC133	Miltenyi Biotec, Ref.130-098-829	Souris	1:5	1h
CD133-PE	AC133	Miltenyi Biotec, Ref.130-098-826	Souris	1:5	1h
CD49f-FITC	GoH3	BD Pharmingen™, Ref.555735	Rat	1:5	1h

Tableau 15. Anticorps utilisés pour l'immunomarquage des CSC dans les lignées cancéreuses mammaires.

Anticorps isotypiques	Clone	Fournisseur, référence	Espèce hôte	Dilutions	Temps d'incubation
Isotype-FITC IgG2b,k	27-35	BD Pharmingen™, Ref.556655	Souris	1:50	30min
Isotype-PE IgG2a,k	G155-178	BD Pharmingen™, Ref.554648	Souris	1:50	30min
Isotype-APC IgG1	IS5-21F5	Miltenyi Biotec, Ref.130-098-846	Souris	2:5	1h
Isotype-PE IgG1	IS5-21F5	Miltenyi Biotec, Ref.130-098-845	Souris	2:5	1h
Isotype-FITC IgG2a,k	R35-95	BD Pharmingen™, Ref.555843	Rat	1:5	1h

Tableau 16. Anticorps isotypiques contrôles utilisés pour l'immunomarquage des CSC dans les lignées cancéreuses mammaires.

B. Double marquage CD44/CD24

Après comptage, les cellules sont centrifugées à 500g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est aspiré et le culot cellulaire dilué dans une solution de fixation composée de PBS 1X et 5% de BSA de façon à obtenir 100.000 cellules/100 µL. Les anticorps sont ensuite ajoutés, à raison de 2µL par tube pour obtenir une dilution au 1/50°. Les tubes sont ensuite incubés dans le noir à 4°C pendant 30 minutes, centrifugés à 500G pendant 5 minutes à 4°C, rincés avec 100 µL de PBS/2% BSA et centrifugés à nouveau à 500G pendant 5 minutes à 4°C. Les cellules sont finalement resuspendues dans 500 µL de PBS/2% BSA et prêtes pour l'acquisition.

C. Marquage CD133

Après comptage, 300.000C sont centrifugées 5 minutes à 1000rpm, le culot est resuspendu dans 150µl de PBS et 50 µL (100.000 cellules) sont distribués dans 3 tubes de cytométrie. Les tubes sont à nouveau centrifugés à 300g pendant 5 minutes. Dans le premier tube (Auto), rien n'est ajouté, dans le 2^{ème} tube, le surnageant est remplacé par 30 µL de PBS et 20 µL d'isotype PE, et dans le 3^{ème} tube 40 µL de PBS et 10 µL de CD133. Les tubes sont alors incubés 1h dans la glace, à l'abri de la lumière. Puis, 500µL de PBS froid sont ajoutés dans chaque tube. Ils sont centrifugés à 1000rpm pendant 5 minutes, le surnageant est aspiré, et repris dans 500µl de PBS, puis placés dans la glace à l'obscurité jusqu'au passage au cytomètre en flux.

D. Marquage CD49f

Plusieurs études utilisent le marqueur CD49f en complément du phénotype CD44⁺/CD24⁻ pour identifier les cellules souches mammaires (Duru et al, 2016 ; Ye et al, 2017 ; Stingl et al, 2006 ; Axlund et al, 2013). Le principe du marquage CD49f est le même que pour les marquages précédents, avec un tube auto, un tube isotype et un tube marqué par l'anticorps anti-CD49f. Dans chaque tube de cytométrie, un million de cellules sont ajoutées, avec 20µl d'anti CD49f ou 20µl d'isotype. L'incubation est réalisée pendant une heure sur glace et à l'abri de la lumière. Puis, 1mL de PBS 1X est ajouté, les cellules sont centrifugées, le surnageant est aspiré et les cellules resuspendues dans 1mL de PBS pour analyse en cytométrie en flux.

IX. Immunomarquage des coupes de tumeurs

A. Origine des tissus canins et sélection des cas

1. Tissus de tumeurs mammaires canines

L'étude est basée sur une série de 96 cas de tumeurs mammaires canines (TMC) malignes issues de la biobanque d'OCR (Oncovet Clinical Research) et les nœuds lymphatiques correspondants. Les TMC proviennent de chiennes de tout âge et de toutes races, ayant subi une chirurgie d'exérèse de tumeur mammaire entre juillet 2011 et octobre 2015. Tous les tissus étaient fixés dans du formol à 10% et enrobés dans de la paraffine. L'étude a suivi autant que possible les recommandations pour la conduite et l'évaluation des études pronostiques en oncologie vétérinaire, et plus spécifiquement les néoplasmes mammaires, avec les limitations inhérentes à une étude rétrospective. Afin de déterminer quels échantillons pouvaient être inclus dans la cohorte, nous nous sommes basés sur des articles guidelines (Mc Shane et al, 2005 ; Webster et al, 2011 ; Matos et al, 2012). Les animaux inclus dans l'étude présentaient soit une seule tumeur mammaire maligne, soit plusieurs tumeurs mammaires dont une seule était maligne. Les cas de récurrences (12) et les animaux présentant plus d'une tumeur maligne (8), quel que soit le sous-type, étaient exclus à cause de la difficulté de déterminer quelle tumeur affecterait le pronostic. Les carcinomes *in situ* (13), dont le caractère malin est discuté, et les cas pour lesquels des données cliniques de suivi même partielles n'ont pas pu être récupérées (15) ont été exclus. La cohorte sera décrite (âge, grade, type histologique, présence d'embolies et infiltration du NL) dans la partie résultats de cette thèse.

2. Tissus contrôles : amygdales et cervelet

Les contrôles positifs utilisés étaient des tissus connus pour exprimer nos différents marqueurs, à savoir des amygdales pour CD44 et CD24 et du cervelet pour les neurotrophines et leurs récepteurs. Les blocs utilisés étaient également issus de la biobanque d'OCR.

B. Immunohistochimie

1. Anticorps utilisés

Les anticorps utilisés pour les marquages immunohistochimiques sur tumeurs mammaires canines ainsi que les anticorps isotypiques correspondants sont regroupés dans les Tableaux 17 et 18.

Anticorps	Clone	Fournisseur	Espèce hôte	Dilutions	Temps d'incubation
CD44 (Monoclonal)	MAC329	Abcam, ref. ab23844	Rat	1:10	1h
CD24 (Polyclonal)	-	Abcam, ref. ab202963	Lapin	1:100	1h
BDNF (Monoclonal)	EPR1292	Abcam, ref. ab108319	Lapin	1:400	1h
proNGF (Polyclonal)	-	Merck Millipore, ref. AB9040	Lapin	1:600	1h
TrkA (Polyclonal)	-	Alomone Labs, ref. ANT-018	Lapin	1:50	1h
TrkB (Monoclonal)	EPR1294	Abcam, ref. ab134155	Lapin	1:50	1h
P75 ^{NTR} (Monoclonal)	ME 20.4	Sigma-Aldrich, ref. 200-3-G-6-4	Souris	1:100	1h

Tableau 17. Anticorps utilisés pour les marquages IHC sur tumeurs mammaires canines.

Anticorps	Clone	Fournisseur	Espèce hôte	Dilutions	Temps d'incubation
IgG (monoclonal)	EPR25A	Abcam, ref. ab172730	Lapin	1:50-1:400	1h
IgG (polyclonal)	-	Abcam, ref. ab37415	Lapin	1:50-1:600	1h
IgG1, kappa (monoclonal)	RTK2071	Abcam, ref. ab18407	Rat	1:10	1h

Tableau 18. Anticorps isotypiques utilisés sur tumeurs mammaires canines.

2. Immunomarquages

L'expression des différentes cibles a été étudiée par marquage en immunohistochimie (IHC) sur des coupes de tumeurs de 5µm d'épaisseur. Lorsque plusieurs blocs de tissus tumoraux inclus en bloc de paraffine étaient disponibles pour une seule tumeur, toutes les lames de diagnostic colorées à l'hémalum éosine étaient revues par un anatomopathologiste (Dr. Quentin Pascal) et une lame représentative de chaque tumeur était sélectionnée.

Les anticorps choisis pour l'immunomarquage étaient tous dirigés contre les épitopes humains et dans un premier temps leur réaction croisée avec les épitopes canins a été vérifiée. Seul l'anticorps contre p75^{NTR} avait déjà été validé dans les tissus canins dans une étude publiée précédemment (Imbschweiler et al, 2012). Les anticorps contre BDNF et TrkB partageaient 100% d'homologie avec l'épitope canin, les anticorps contre TrkA et proNGF 87% et les anticorps contre CD44 et CD24 respectivement 82% et 81%.

La spécificité des anticorps pour les tissus canins a été partiellement confirmée tout d'abord en marquant des tissus connus pour exprimer ces marqueurs. Le contrôle positif utilisé était un bloc d'amygdales canines pour CD44 et CD24 (Figure 51) – CD44 marquant la couche basale de l'épithélium et CD24 marquant les follicules lymphoïdes et les différentes couches de l'épithélium – et du cervelet pour les neurotrophines et leurs récepteurs (Figure 52). Pour CD44 et CD24, la validation du double marquage a été réalisée en comparant le double marquage CD44/CD24 et les marquages isolés de CD44 et CD24.

Finalement, un contrôle négatif avec des anticorps isotypiques a été réalisé sur les tissus canins : amygdales, cervelet et tumeurs mammaires canines de tous grades et types histologiques (Figures 53 et 54).

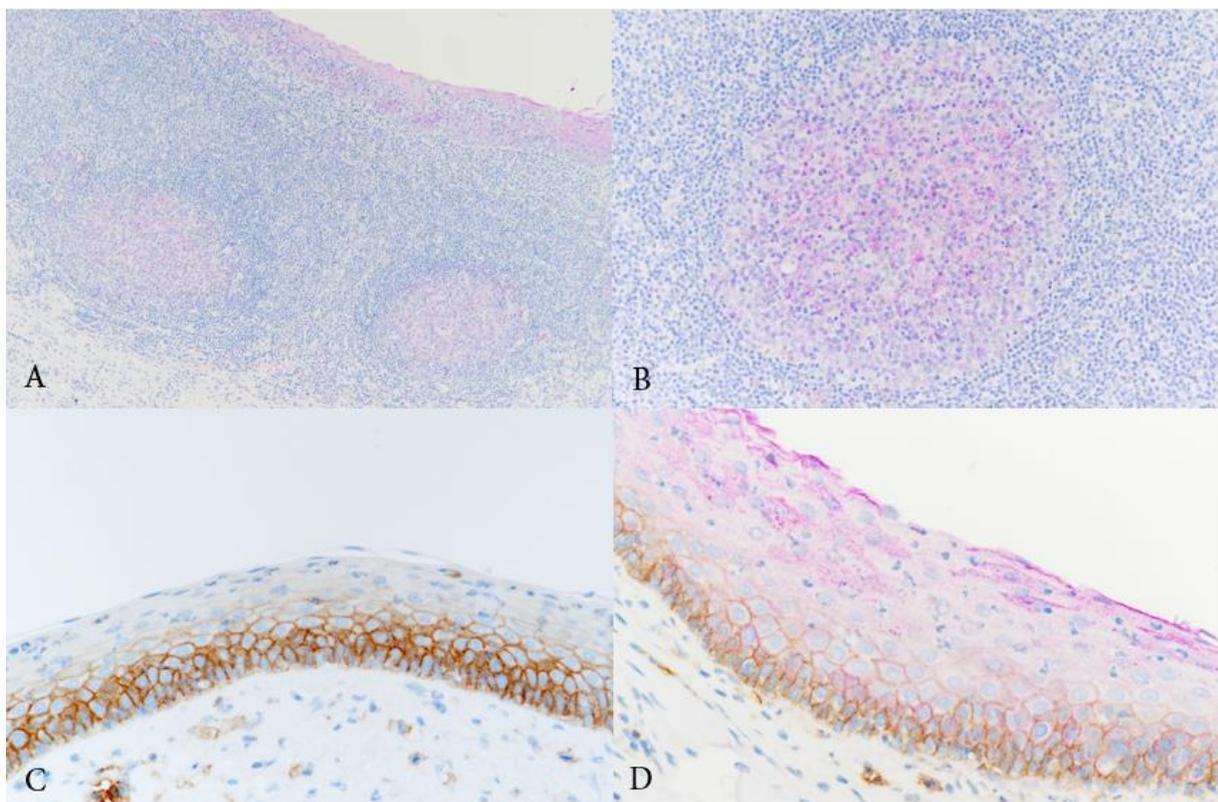


Figure 51. Amygdales canines. Marquage IHC de CD44 et CD24 seuls ou en combinaison. Le marquage par CD44 apparaît en marron, le marquage par CD24 en violet. A. L'anticorps anti-CD24 marque les follicules lymphoïdes et l'épithélium mais ne marque pas les tissus conjonctifs environnants. B. L'anticorps anti-CD44 marque le follicule lymphoïde. C. L'anticorps anti-CD44 marque la couche basale de l'épithélium mais ne marque pas les tissus conjonctifs sous-jacents. D. Double marquage CD44/CD24 au niveau de l'épithélium. L'anticorps anti-CD44 marque la totalité de la membrane des cellules et concerne la couche basale de l'épithélium. L'anticorps anti-CD24 marque faiblement le cytoplasme des cellules dans les couches supérieures de l'épithélium.

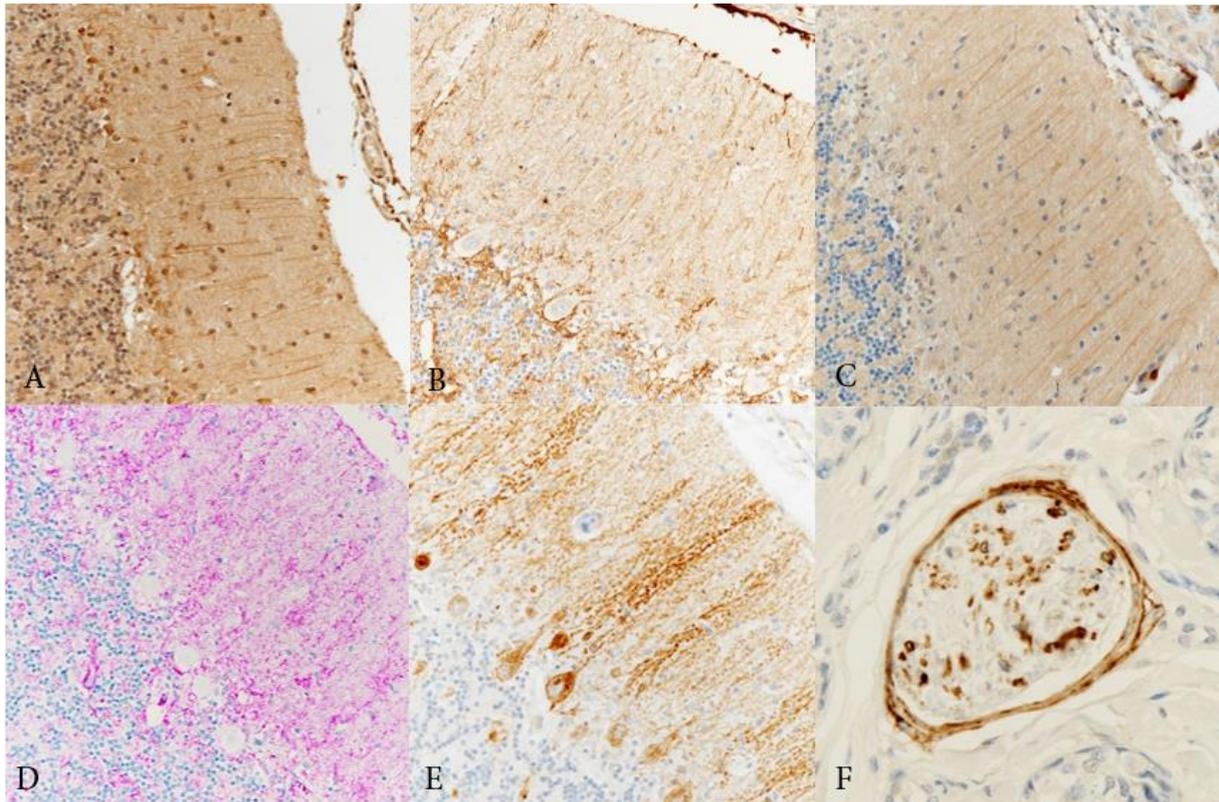


Figure 52. A à E. Cervelet canin. Marquage IHC des anticorps anti-proNGF (A), BDNF (B), TrkA(C), TrkB (D) et p75^{NTR}(E). Les marquages par proNGF, BDNF, TrkA et p75^{NTR} apparaissent en marron, le marquage par TrkB apparaît en violet. Les anticorps anti-neurotrophines ou anti-récepteurs marquent plus particulièrement les axones. Le noyau des neurones n'est pas marqué et apparaît en bleu. F. Tumeur mammaire canine. L'anticorps anti-p75^{NTR} marque une fibre nerveuse, qui peut être utilisée comme contrôle positif.

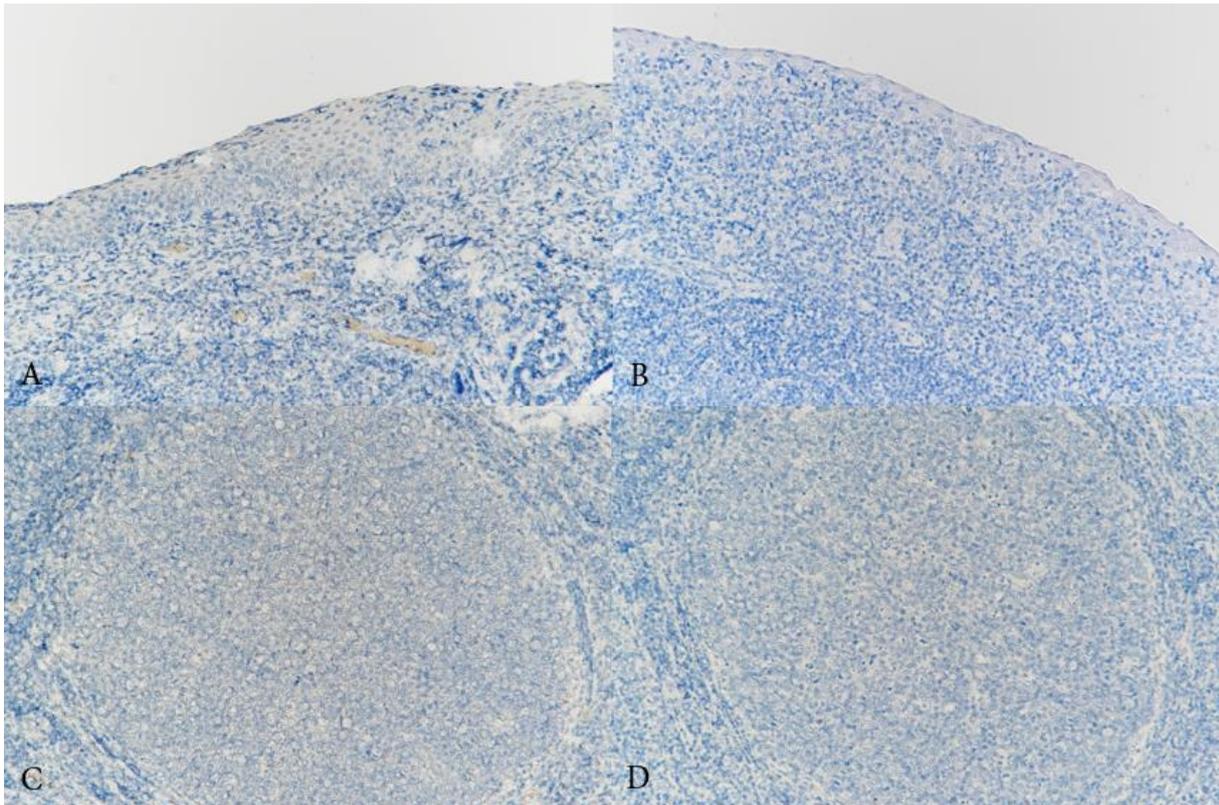


Figure 53. Amygdales, chien. Marquages IHC de l'anticorps de rat monoclonal IgG1, κ et de l'anticorps lapin polyclonal IgG, contrôles isotypiques des anticorps anti-CD44 et CD24 respectivement. A. L'anticorps de rat monoclonal IgG1, κ ne marque pas la couche basale de l'épithélium. B. L'anticorps de lapin polyclonal IgG ne marque pas l'épithélium. C. L'anticorps de rat monoclonal IgG1, κ ne marque pas les follicules lymphoïdes. D. L'anticorps de lapin polyclonal IgG ne marque pas les follicules lymphoïdes.

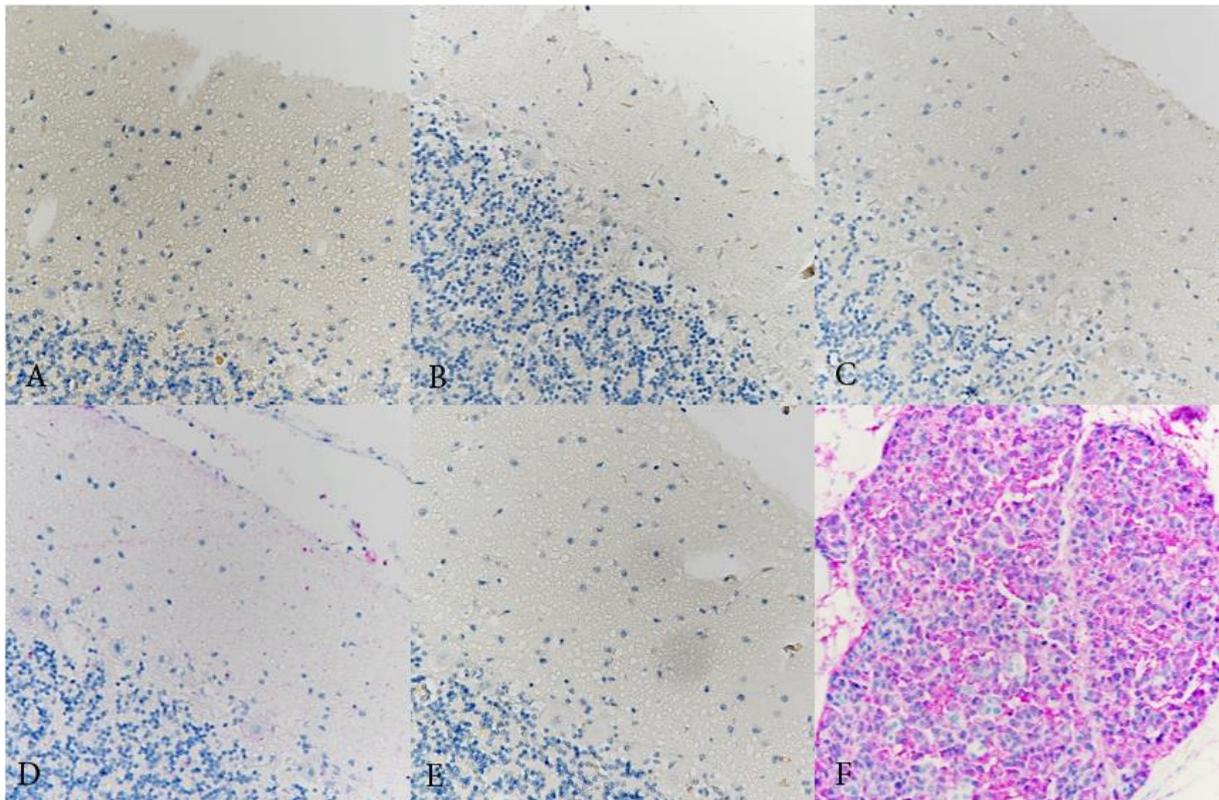


Figure 54. A à E. Cervelet, chien. Contrôles isotypiques pour les anticorps anti-neurotrophines et leurs récepteurs A. Immunomarquage de l'anticorps de lapin polyclonal IgG (contrôle isotypique de l'anticorps anti-proNGF). B. Immunomarquage de l'anticorps de lapin monoclonal IgG (contrôle isotypique de l'anticorps anti-BDNF). C. Immunomarquage de l'anticorps de lapin polyclonal IgG (contrôle isotypique de l'anticorps anti-TrkA). Aucun marquage n'est détecté. D. Immunomarquage de l'anticorps de lapin monoclonal IgG (contrôle isotypique de l'anticorps anti-TrkB). E. Immunomarquage de l'anticorps de rat monoclonal IgG1, κ (contrôle isotypique de l'anticorps anti-p75^{NTR}). Aucun marquage n'est détecté. F. Tumeur mammaire maligne, chien. Contrôle négatif, sans anticorps primaire, du marquage par TrkB. Le signal aspécifique observé est aussi fort que le signal obtenu en présence de l'anticorps primaire.

Les immunomarquages ont été réalisés à l'aide d'un automate de coloration Discovery XT (Ventana Medical Systems). Les lames étaient déparaffinées et un démasquage de l'antigène court était réalisé (95°C, CC1 court). Après incubation avec les anticorps primaires pendant 1 heure, les lames étaient incubées pendant 4 minutes avec un multimère HRP sans biotine (DISCOVERY Ultramap anti-Rb/Ms/Rt HRP, Roche) et les anticorps étaient révélés en utilisant un chromogène lié à la HRP (DISCOVERY ChromoMap DAB kit). La réaction avec le 3,3 - diaminobenzidine (DAB) menait à une couleur brune pour p75^{NTR}, TrkA, BDNF et proNGF. Pour TrkB, un système d'amplification basé sur des haptènes était utilisé (DISCOVERY HQ-HRP detection kit) et menait à une couleur violette pour TrkB (Figure 55).

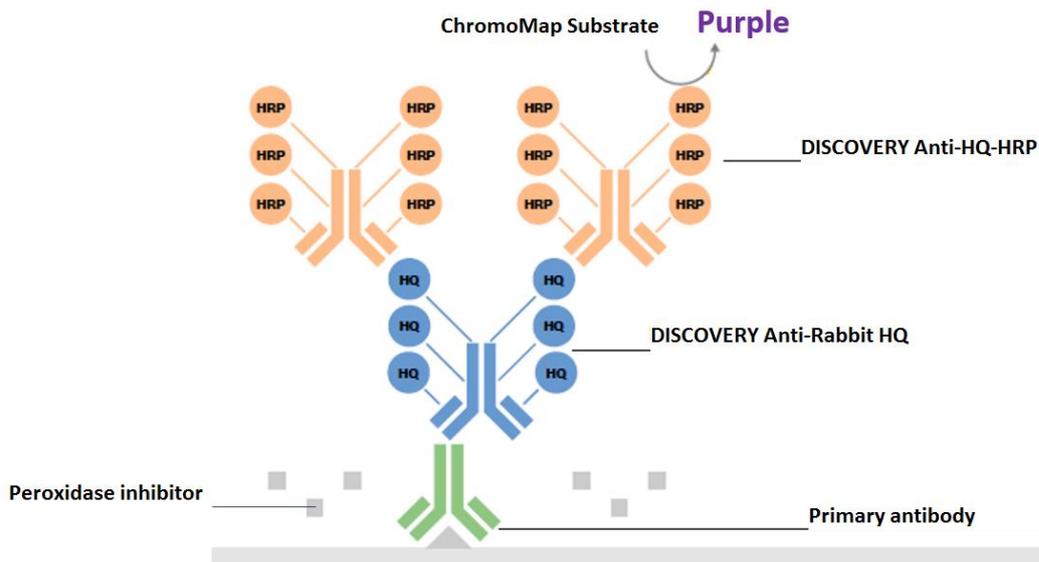


Figure 55. Système d'amplification DISCOVERY HQ-HRP detection kit utilisé pour TrkB.

Le double marquage CD44/CD24 était réalisé consécutivement. Après incubation avec un anticorps primaire ciblant CD24, les lames étaient incubées pendant 4 minutes avec un multimère HRP sans biotine et un chromogène lié à la HRP (DISCOVERY Purple Kit, Roche). Les lames étaient ensuite incubées avec l'anticorps ciblant CD44 suivies d'une incubation de 16 minutes avec un autre multimère HRP biotine free (DISCOVERY Ultramap anti-Rt HRP, Roche) et un chromogène lié à la HRP (DISCOVERY ChromoMap DAB Kit, Roche).

La contre-coloration était réalisée avec de l'hématoxyline de Mayer modifiée (Hematoxylin II, Roche) pour 4 minutes et une solution aqueuse de (buffered lithium carbonate) (Bluing Reagent, Roche) pendant 4 minutes. Un contrôle négatif, dans lequel l'anticorps primaire était omis et remplacé par une solution tampon, et deux contrôles positifs (amygdales canines dans le cas de CD44/CD24 et cervelet dans le cas des neurotrophines, et une section de tumeur mammaire connue pour exprimer les marqueurs) étaient incluses dans chaque cycle de marquage.

Pour TrkB, un contrôle négatif (lame sans anticorps primaire) était utilisé systématiquement pour prévenir un marquage aspécifique dû au système d'amplification. Dans le cas où le contrôle négatif était aussi intense que le marquage IHC, le marquage était considéré

comme négatif. Un exemple de marquage aspécifique aussi intense que le marquage en présence de l'anticorps est présenté Figure 54.F.

Au total, 6 lames marquées (CD44/CD24 en colocalisation, p75^{NTR}, TrkA, TrkB, proNGF et BDNF) ainsi qu'un contrôle négatif pour TrkB étaient réalisées pour chaque tumeur.

C. Evaluation des marquages

Pour chaque tumeur, 10 photographies à grossissement moyen (objectif x20) étaient prises avec un microscope Nikon Eclipse Ni. Les champs choisis étaient les mêmes sur les 6 lames d'une même tumeur, afin de pouvoir étudier l'éventuelle colocalisation des marqueurs de CSC avec les neurotrophines et leurs récepteurs. Un nombre conséquent de lames (une vingtaine) était évalué par deux observateurs dont un anatomopathologiste afin d'établir un consensus sur le scoring. Tous les cas étaient évalués sans connaissance de la pathologie tumorale ou du devenir de l'animal. Sur chaque champ et pour chaque marquage, une estimation semi-quantitative de l'intensité de marquage et du pourcentage de cellules positives étaient évalués, comme décrit dans des articles précédents (Ahmed et al, 2012 ; Collina et al, 2015). La proportion de cellules marquées était exprimée par un score variant de 0 à 3 (0=aucune ou <5%, 1 = 5-25% ; 2 = 25-50% ; 3= >50%). L'intensité de marquage était aussi exprimée par un score variant de 0 à 3 (0= Négatif, 1 = Faible, 2 = Modéré, 3 = Fort) (Figure 56, 57 et 58). Pour chaque champ, l'intensité de marquage (0-3) était multipliée par la proportion de cellules marquées (0-3) pour obtenir un score variant de 0 à 9. Les scores finaux pour la tumeur étaient obtenus en additionnant les scores des 10 champs, ce qui menait à des scores de marquage variant de 0 à 90.

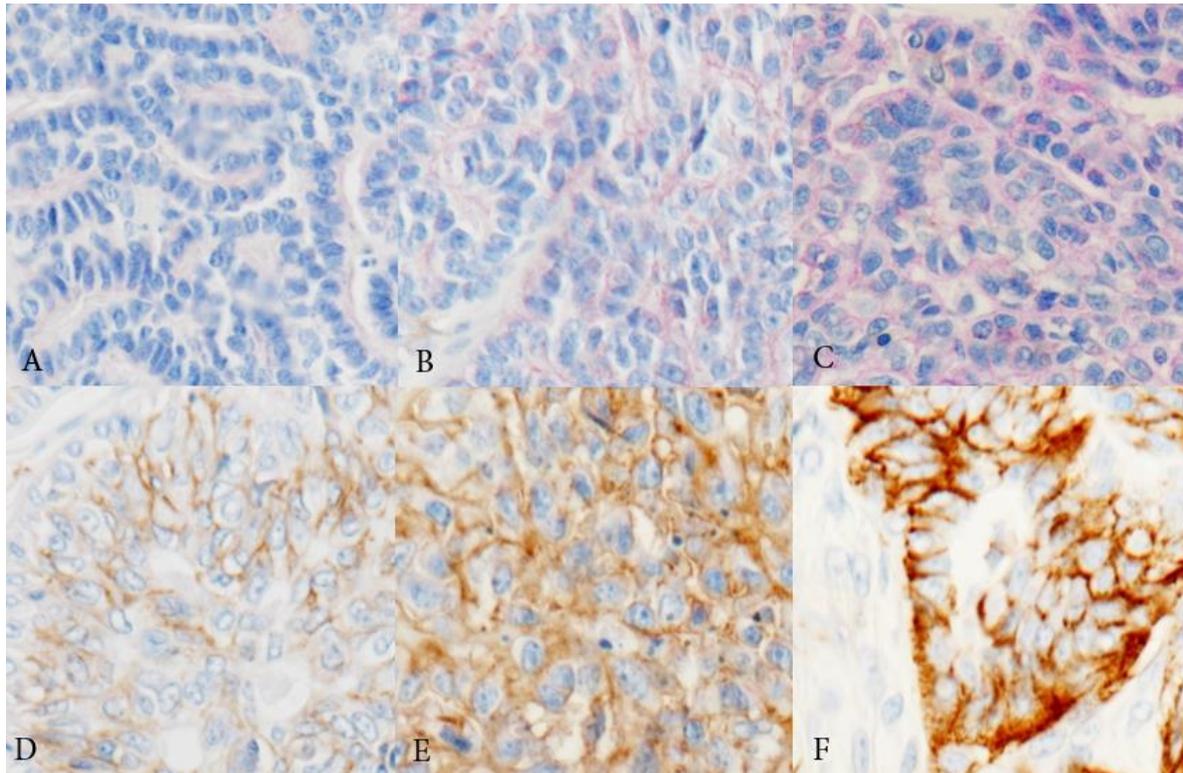


Figure 56. Tumeurs mammaires malignes, chien. Immunohistochimie pour CD44/CD24. Exemples de gamme d'intensité (marquage faible, modéré ou fort). Le marquage par CD44 apparaît en marron, le marquage par CD24 en violet. A. Carcinome tubulaire simple, cellules luminales avec un faible marquage CD24. B. Carcinome solide, cellules en plages solides avec un marquage CD24 modéré. C. Carcinome solide, cellules en plages solides avec un marquage CD24 fort. D. Carcinome tubulaire complexe, cellules luminales avec un faible marquage CD44. E. Carcinome tubulaire complexe, cellules luminales avec un marquage CD44 faible. F. Carcinome tubulaire simple, cellules luminales avec un marquage CD44 fort.

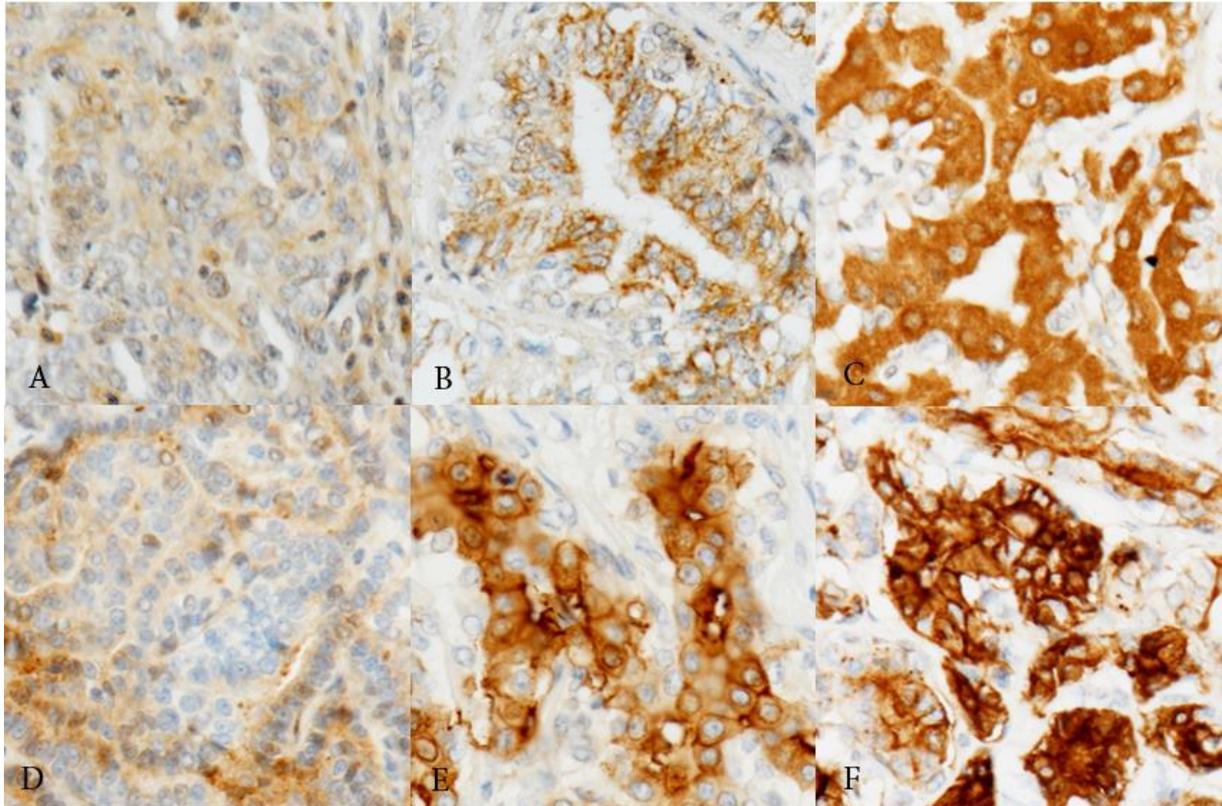


Figure 57. Tumeurs mammaires malignes, chien. Immunohistochimie pour le proNGF et le BDNF. Exemples de gamme d'intensité (marquage faible, modéré ou fort). Les marquages par proNGF et BDNF apparaissent en marron. A. Carcinome solide, cellules en plages solides présentant un faible marquage proNGF. B. Carcinome tubulaire simple, cellules luminales avec un marquage proNGF modéré. C. Carcinome tubulaire simple, cellules luminales avec un marquage proNGF fort. D. Carcinome solide, cellules en plages solides présentant un marquage BDNF faible. E. Carcinome solide, cellules myoépithéliales-like présentant un marquage BDNF modéré. F. Carcinome tubulaire, cellules luminales présentant un marquage BDNF fort.

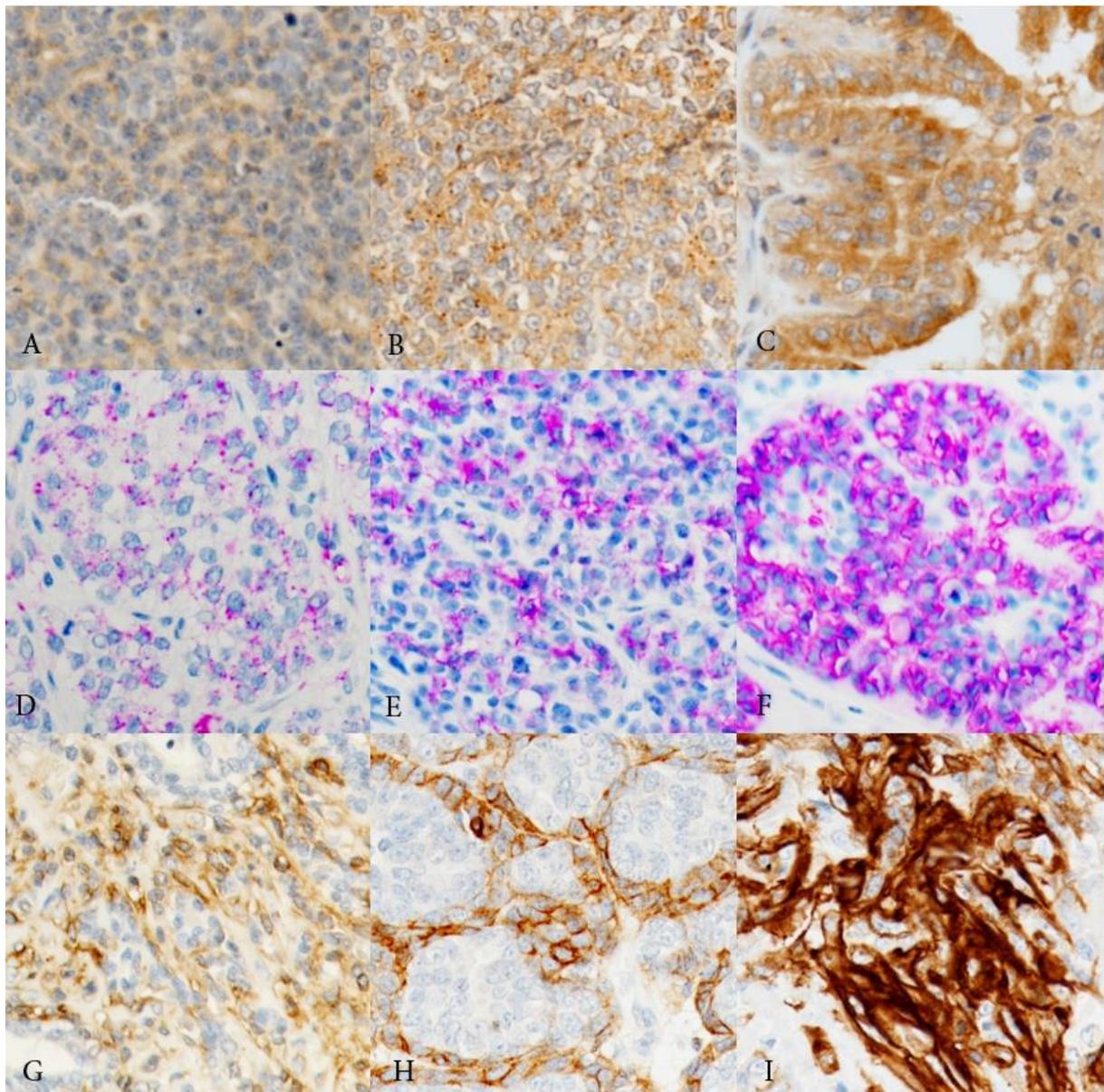


Figure 58. Tumeurs mammaires malignes, chien. Immunohistochimie pour les récepteurs des neurotrophines TrkA, TrkB et p75^{NTR}. Exemples de gamme d'intensité (marquage faible, modéré ou fort). Le marquage par TrkB apparaît en violet, les marquages par TrkA et p75^{NTR} apparaissent en marron. A. Carcinome solide, cellules en plages solides présentant un marquage par TrkA faible. B. Carcinome solide, cellules en plages solides présentant un marquage TrkA modéré. C. Carcinome tubulaire simple, cellules luminales présentant un marquage TrkA fort. D. Carcinome solide, cellules en plages solides présentant un marquage TrkB faible. E. Carcinome solide, cellules en plages solides présentant un marquage TrkB modéré. F. Carcinome tubulaire, cellules luminales présentant un marquage TrkB fort. G. Carcinome tubulaire complexe, cellules myoépithéliales-like présentant un marquage p75^{NTR} faible. H. Carcinome tubulaire complexe, cellules myoépithéliales-like présentant un marquage p75^{NTR} modéré. I. Carcinome tubulaire complexe, cellules myoépithéliales-like présentant un marquage p75^{NTR} fort.

Pour l'étude des phénotypes associés à un double marquage CD44/CD24 (CD44⁺/CD24⁻; CD44⁻/CD24⁺; CD44⁺/CD24⁺; CD44⁻/CD24⁻), les scores de marquage possibles étaient représentés par la proportion de cellules marquées (de 0 à 30). Le seuil utilisé pour définir l'immunopositivité ou négativité des tumeurs était une proportion de cellules marquées $\geq 1/30$. Les tumeurs étaient considérées comme négatives quand elles ne présentaient aucun marquage.

D. Notion de composants

En plus d'utiliser les classifications conventionnelles des tumeurs mammaires canines basées sur le grade et le type histologique, nous avons identifié sur les coupes de tumeurs trois types cellulaires différents, que nous avons appelé « composants ». Une composante luminale correspondait à toutes les structures en lien avec une lumière (canales, tubulaires ou papillaires). La composante myoépithéliale correspondait aux cellules myoépithéliales ou myoépithéliales-like (fusiformes). Enfin, une composante diffuse correspondait à des cellules en amas ou des zones anaplasiques. Chaque tumeur pouvait présenter une, deux ou les trois composantes.

E. Corrélation à la survie

La collecte des données cliniques auprès des différents vétérinaires et propriétaires a fait l'objet d'une thèse d'exercice vétérinaire et a été réalisée par Audrey Bobillier, étudiante à l'école nationale vétérinaire de Lyon. La période de suivi a été fixée à 24 mois entre la chirurgie et la collecte des informations cliniques. Les paramètres clinicopathologiques réunis pour chaque tumeur incluaient : le type histologique, le grade, le statut du nœud lymphatique, les récurrences locales ou les métastases à distance, le type de chirurgie (nodulectomie, mammectomie régionale, mastectomie unilatérale ou bilatérale), les modalités de traitement (pas de traitement après la chirurgie, anti-inflammatoires non stéroïdiens +/- chimiothérapie, Viscum Album, anti-inflammatoires stéroïdiens), et la survie. Les informations recueillies concernant les animaux incluaient l'âge, la race, et le statut vis-à-vis de la stérilisation. La survie globale (SG ou

OS pour Overall Survival) était définie comme la période entre la chirurgie et la mort en lien avec la tumeur, qui était définie cliniquement comme une mort spontanée ou une euthanasie consécutive au cancer. La durée de survie sans progression (SSP ou DFS pour Disease-Free Survival) était définie comme la période entre la chirurgie et une récurrence, que ce soit une récurrence locale ou des métastases à distance.

X. Analyses statistiques

A. Analyses des données *in vitro*

Pour les tests de formations de sphères, un test de Student a été appliqué. Un résultat était considéré comme significatif si $p < 0,05$.

B. Analyses des données obtenues dans le modèle canin

Les analyses statistiques ont été réalisées par les biostatisticiens du CHRU de Lille. Les variables quantitatives étaient exprimées par une moyenne et un écart-type ou une médiane et un intervalle inter-quartile. La normalité des distributions était vérifiée de façon graphique par un test de Shapiro-Wilk. Les variables qualitatives étaient décrites en utilisant les fréquences et les pourcentages. La relation entre l'expression d'un phénotype ou d'un marqueur et les types de composantes (luminale, diffuse et myoépithéliale) était estimée en utilisant des modèles mixtes linéaires généralisés. Des comparaisons deux à deux post hoc étaient réalisées dans le cas de différences globales significatives, et une correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples était appliquée. Dans le cas d'un échantillon de taille suffisante, la comparaison de la proportion d'expression d'un phénotype ou d'un marqueur entre les groupes de paramètres clinicopathologiques étaient réalisées avec des tests du khi deux. En cas de comptes attendus inférieurs à 5, des tests exacts de Fisher étaient utilisés. Les scores de marquage de CD44 et CD24 seuls ou en combinaison étaient comparés entre grades et types histologiques en utilisant des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis; et entre la présence et l'absence d'embolies, d'infiltration des nœuds lymphatiques, et de métastases à distance, en utilisant des tests non

paramétriques de Mann-Whitney U. Les valeurs nulles (absence de marquage) ont été exclues de l'analyse du score de marquage. Des comparaisons deux à deux post-hoc ont été réalisées dans le cas de différences globales significatives, et une correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples était appliquée, en utilisant le groupe des Carcinomes mammaires inflammatoires comme références pour les grades et le groupe de tumeurs solides comme référence pour le type histologique.

Les courbes de survies ont été réalisées en utilisant la méthode de Kaplan-Meier. Les courbes de survie étaient comparées entre groupes de tumeurs exprimant ou non un marqueur ou un phénotype en utilisant un test du log-rank. Les comparaisons ont été ajustées avec l'âge en utilisant une régression de Cox (modèle à risque proportionnel), et les rapports de hasard ont été estimés (risque relatif sur la durée de l'étude en prenant compte des facteurs de confusion).

Finalement, la relation entre les scores de marquage et la survie globale ont été évalués en utilisant des modèles de régression aléatoires proportionnels de Cox considérant les scores comme des variables continues. Les hypothèses de risques proportionnels et de log-linéarité ont été vérifiées en estimant les résidus martingale et Schoenfeld.

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel SAS version 9.4 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) et tous les tests statistiques ont été réalisés avec un risque alpha bilatéral de 0,05.

Résultats

Partie 1 : Modalités d'enrichissement en CSC

I. Expression des neurotrophines et leurs récepteurs dans différentes lignées cellulaires

Les différentes lignées cellulaires, à l'exception des BT-20, ont été caractérisées en termes de niveau d'expression des neurotrophines, de leurs récepteurs et de quelques co-récepteurs, par RT-Q-PCR. Nos résultats indiquent que toutes les lignées expriment les (pro)neurotrophines et leurs récepteurs avec des niveaux très variables (Figure 59).

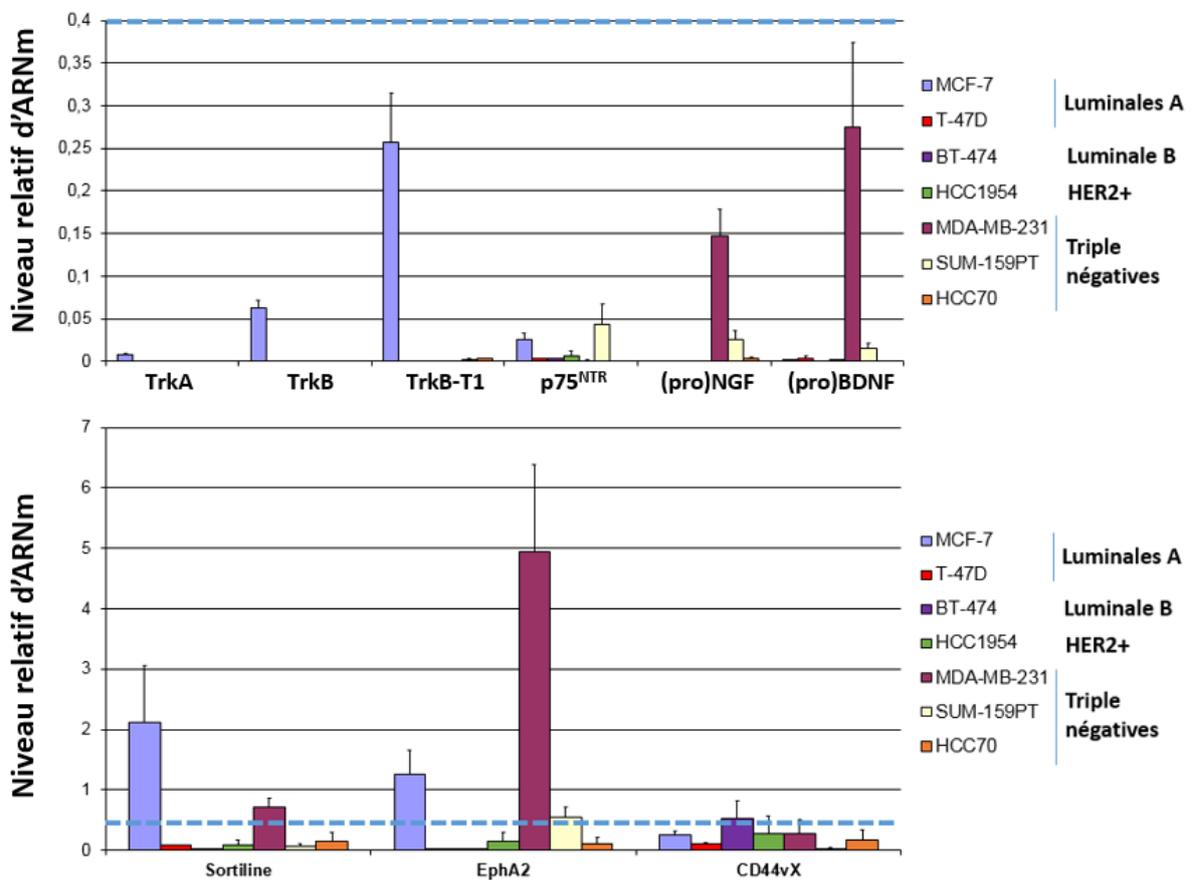


Figure 59. Expression des (pro)neurotrophines et de leurs récepteurs (A) ou co-récepteurs (B) dans différentes lignées cellulaires cancéreuses de sein : luminales A (MCF-7 et T-47D), luminale B (BT-474), surexprimant HER2 (HCC1954) ou triple négatives basal-like (MDA-MB-231, SUM-159PT et HCC70). La barre en pointillés bleus marque le changement d'échelle entre les deux graphiques. Les données représentent la moyenne de 3 ou 4 expériences indépendantes (moyenne +/- écart-type).

Par exemple, le (pro)NGF et le (pro)BDNF sont fortement exprimés dans la lignée MDA-MB-231 mais peu dans les autres lignées. TrkB et son récepteur variant dépourvu de domaine kinase TrkB-T1 ne sont exprimés fortement que dans une seule lignée, les cellules MCF-7. Les co-récepteurs sortiline et EphA2 sont moyennement à fortement exprimés dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 mais peu dans les autres lignées. CD44vX, correspondant à un des variants de CD44, est globalement exprimé de la même façon dans les différentes lignées.

En conclusion, il ne semble pas possible d'effectuer une corrélation entre le statut des différentes lignées cellulaires en fonction de l'expression des neurotrophines, récepteurs ou co-récepteurs. Cependant ces expériences permettent uniquement de quantifier des ARNm et d'autres études sont nécessaires afin de quantifier le niveau d'expression des protéines (immunohistochimie, western blot).

II. Effets des différentes (pro)neurotrophines sur les lignées cellulaires

A. Effet sur la formation des sphères

1. Détermination des doses les plus efficaces

Les doses de neurotrophines utilisées jusqu'à présent dans l'unité INSERM U908 pour les tests de formation de sphères sont basées sur les doses utilisées lors des expériences de migration et d'invasion (16 nM NGF/BDNF, 0,5 nM proNGF/proBDNF). Nous avons voulu vérifier si ces doses étaient optimales pour le test de formation de sphères dans le cadre d'un traitement continu sur la lignée MCF-7.

Les résultats sont présentés Figure 60. Pour le NGF, nous n'avons pas observé d'augmentation du nombre de sphères par rapport à la condition traitée, et ce quelle que soit la dose utilisée. Pour le BDNF, la dose optimale pour la formation de mammosphères était de 1 nM. La dose optimale de proNGF et de proBDNF est de 0,25 nM.

En nous basant sur ces résultats et par souci d'uniformisation, pour les expériences suivantes, nous utilisons 1nM pour le NGF et le BDNF, 0,25 nM pour le proNGF et le proBDNF.

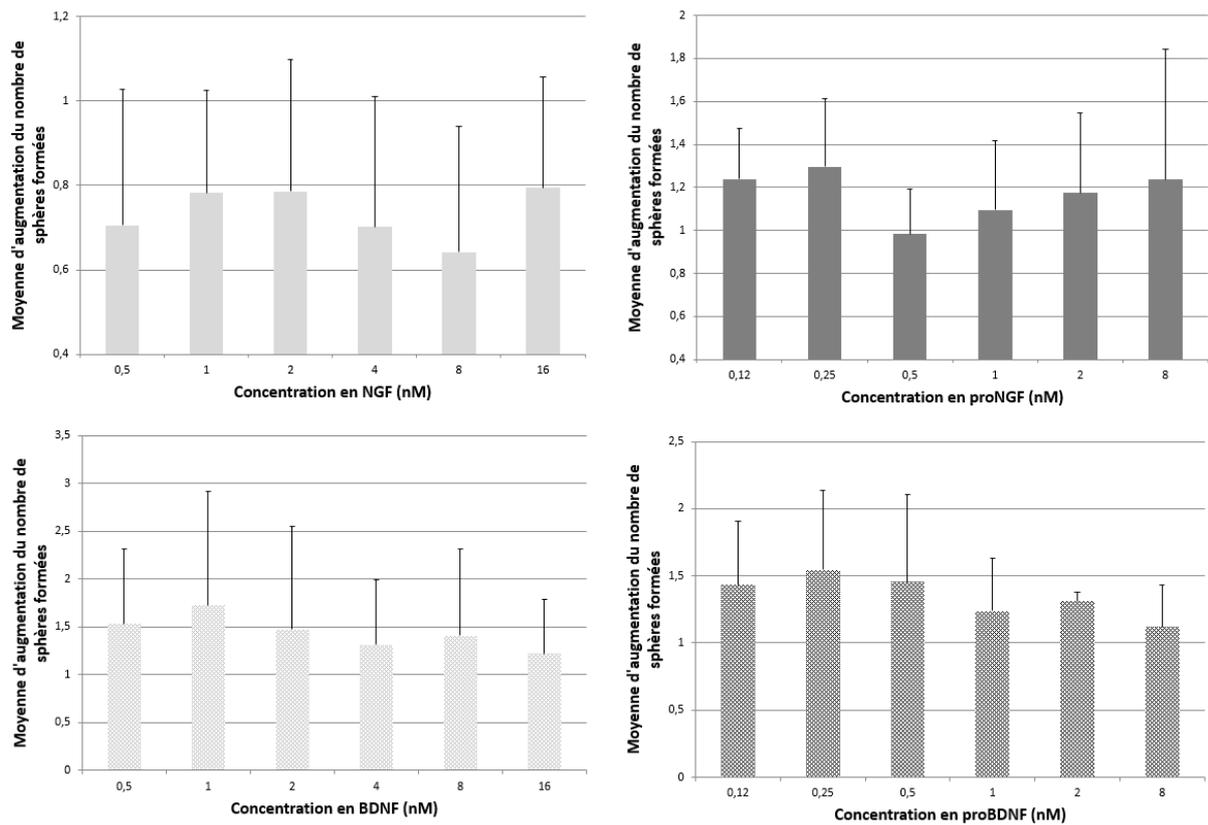


Figure 60. Détermination de la dose optimale à utiliser pour chaque (pro)neurotrophine (NGF, proNGF, BDNF, proBDNF) dans les expériences de formation des mammosphères en traitement continu pour la lignée MCF-7. Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes pour BDNF/proBDNF ou 4 expériences indépendantes pour NGF/proNGF (moyenne +/- écart-type).

2. Capacité des lignées cellulaires à former des sphères

Nous avons cherché à déterminer l'effet des couples NGF/proNGF et BDNF/proBDNF sur l'enrichissement en CSC de nos lignées cellulaires cancéreuses de sein par un test de formation de mammosphères. Nous avons d'abord réalisé un pré-traitement aux neurotrophines sur les différentes lignées cellulaires. Pour ces expériences, nous avons utilisé dans un premier temps les concentrations « historiques » de 16 nM pour le NGF et le BDNF et de 0,5 nM pour le proNGF et le proBDNF. Pour la lignée BT-20, les expériences ayant été réalisées séparément (travail de M1 de Sarah Trouvilliez), les conditions testées sont légèrement différentes en pré-traitement (1nM et 16 nM pour NGF/BDNF, 0,25 nM pour proNGF/proBDNF). Puis nous avons réalisé un traitement continu par les neurotrophines en

utilisant cette fois pour le NGF et le BDNF les doses de 1 et 16nM et pour le proNGF et le proBDNF les doses de 0,25 nM.

a. En pré-traitement

Nos lignées cellulaires se sont révélées plus ou moins aptes à former des sphères en milieu sans ancrage.

Pour la lignée T-47D, les sphères formées étaient très difformes (Figure 61), et il n'était pas possible d'isoler les différentes sphères présentes au sein des agglomérats. Elles n'étaient donc pas comptabilisables. Nous avons alors testé une mise en sphères avec une seule cellule par puits, afin d'éviter l'éventuelle agglomération des différentes sphères, mais par cette méthode aucune sphère n'a été créée.

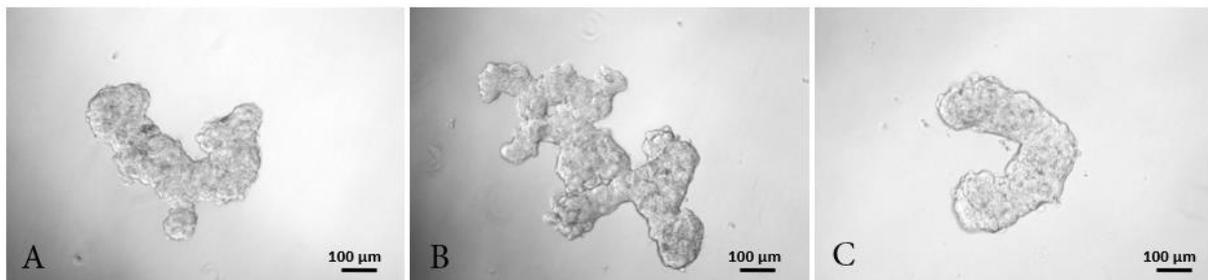


Figure 61. Photographies représentatives des sphères formées en pré-traitement par l'EGF/bFGF après 8 jours de culture dans la lignée T-47D. A. En pré-traitement à EGF/bFGF. B. Avec du NGF 16 nM. C. Avec du BDNF 16 nM.

Pour la lignée BT-474, lors du premier test de formation de mammosphères en plaques 96 puits low binding, nous avons constaté que quel que soit le nombre de cellulesensemencées, une seule sphère était formée dans chaque puits. Ces sphères étaient de très grande taille dans la première colonne (Figure 62), puis décroissaient en taille de colonne en colonne. Nous avons supposé que les sphères avaient fusionné en une seule, possiblement sous l'effet de vibrations dans l'étuve. Nous avons mesuré le volume de ces sphères et évalué la décroissance de volume de colonne en colonne pour chaque condition. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence entre la condition standard EGF/bFGF et les différentes conditions de

neurotrophines. Nous avons également fait un essai d'un ensemencement d'une seule cellule par puits mais aucune sphère n'a pu se former.

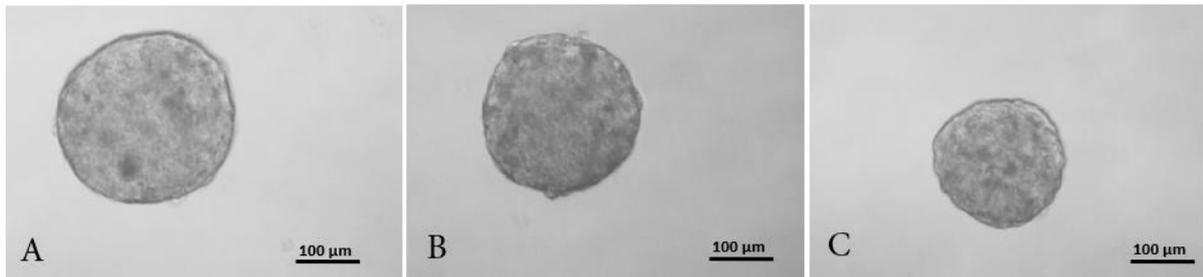


Figure 62. Photographies représentatives des sphères formées en pré-traitement par le NGF 1nM après 8 jours de culture dans la lignée BT-474. Chaque puits ne contenait qu'une seule sphère. A. Dans un puits ensemencé à 1024 cellules. B. Dans un puits ensemencé à 512 cellules. C. Dans un puits ensemencé à 256 cellules.

Concernant la lignée HCC1954, nous n'avons pas observé d'augmentation du compartiment des CSC sous l'action des (pro) neurotrophines suite à un pré-traitement (Figure 63). Ces cellules surexprimant HER2 et présentant également de hauts niveaux d'EGFR, nous avons supposé que la suractivation d'une de ces voies de signalisation pouvait masquer l'effet des neurotrophines et/ou favoriser l'action de la condition standard EGF/bFGF par rapport aux neurotrophines. Nous avons testé si une inhibition du récepteur HER2 grâce au trastuzumab (Herceptin®) permettait une meilleure expression de l'action des neurotrophines sur la formation de sphères, mais le nombre de sphères formées en présence des neurotrophines était à nouveau inférieur ou égal à la condition EGF/bFGF. Nous avons alors testé un autre inhibiteur, le cetuximab (Erbix®), ciblant cette fois l'EGFR, mais à nouveau nous n'avons pas observé un effet supérieur des neurotrophines.

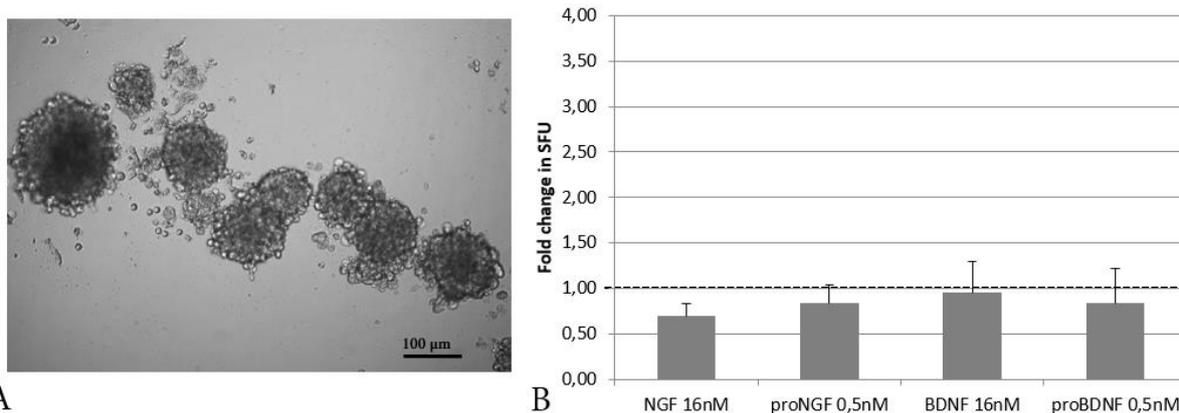


Figure 63. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée HCC1954. A. Photographie représentative de sphères formées en pré-traitement par l'EGF/bFGF après 8 jours de culture. B. Formation des mammosphères en pré-traitement par les (pro)neurotrophines par rapport à la condition standard EGF/bFGF. Les données représentent la moyenne de 2 expériences indépendantes (moyenne +/- écart-type).

Pour la lignée MCF-7 (Figure 64), nous n'obtenons pas d'augmentation significative du nombre de sphères quelle que soit la condition testée par rapport à l'EGF/bFGF en pré-traitement par les neurotrophines.

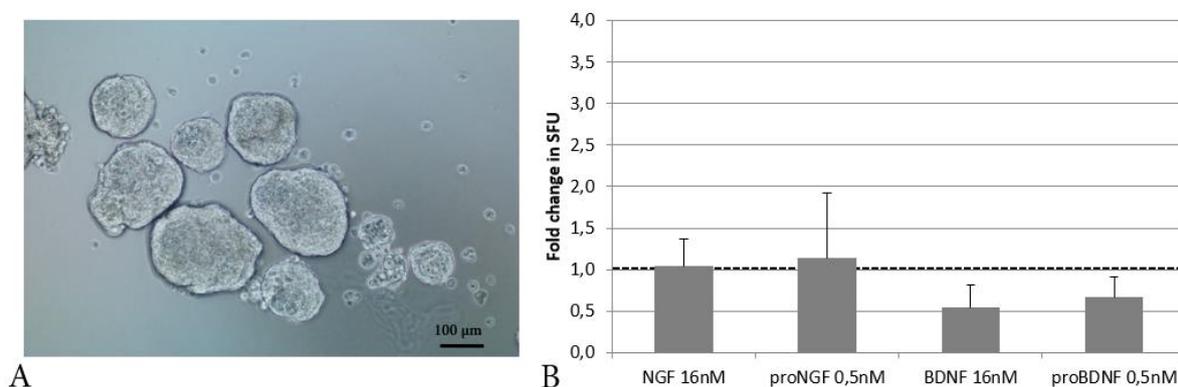


Figure 64. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée MCF-7. A. Photographie représentative de sphères formées en pré-traitement par l'EGF/bFGF après 7 jours de culture. B. Formation des mammosphères en pré-traitement par les (pro)neurotrophines par rapport à la condition standard EGF/bFGF. Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes (moyenne +/- écart-type).

Pour la lignée HCC70, les deux couples NGF/proNGF et BDNF/proBDNF permettent d'augmenter le nombre de mammosphères formées par rapport à la condition standard (Figure 65). La différence est significative uniquement pour le proBDNF 0,5 nM ($p < 0,05$ sur les 4 expériences).

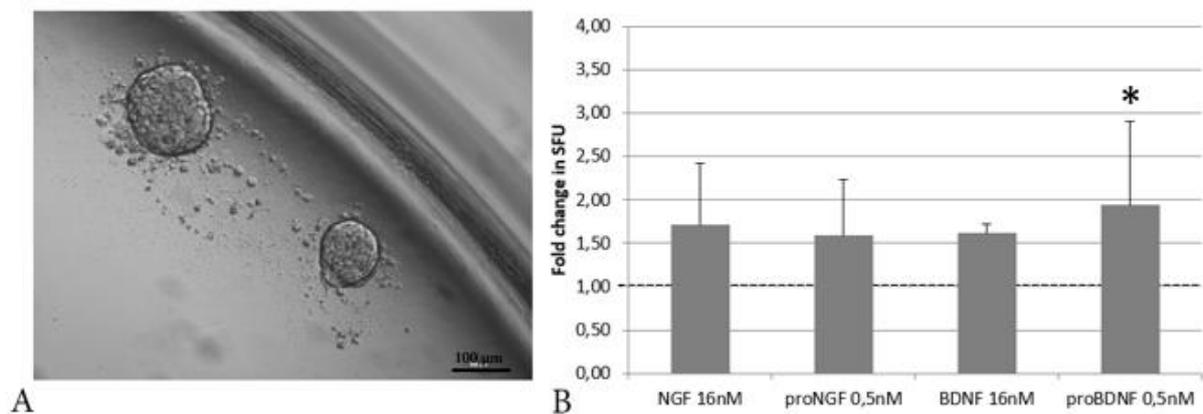


Figure 65. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée HCC70. **A.** Photographie représentative de sphères formées en pré-traitement par l'EGF/bFGF après 7 jours de culture. **B.** Formation des mammosphères en pré-traitement par les (pro)neurotrophines par rapport à la condition standard EGF/bFGF. Les données représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes sauf pour le BDNF qui ne comporte que 3 expériences indépendantes (moyenne +/- écart-type).

Pour la lignée MDA-MB-231 (Figure 66), seul le proNGF et dans une moindre mesure le NGF permettent d'augmenter le nombre de mammosphères formées par rapport à la condition standard, mais cet effet n'a pas été observé de façon constante.

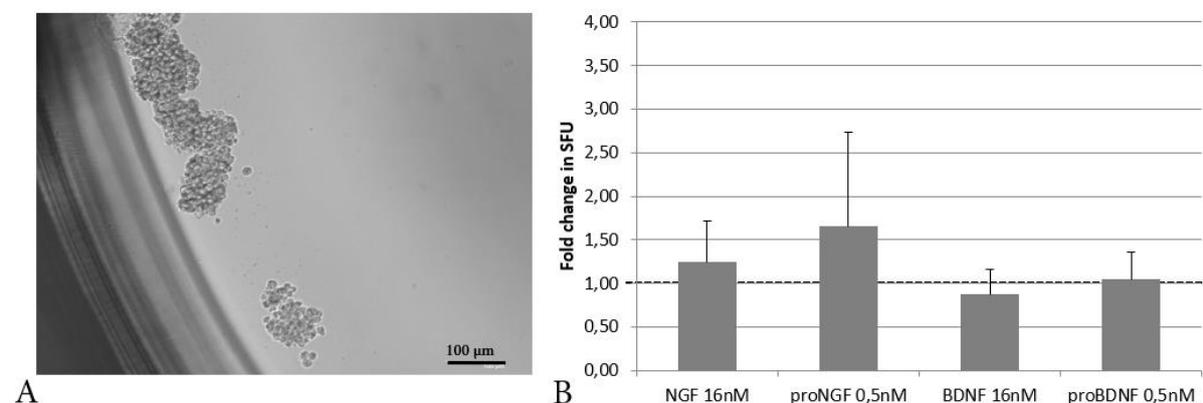


Figure 66. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée MDA-MB-231. **A.** Photographie représentative de sphères formées en pré-traitement par l'EGF/bFGF après 8 jours de culture. **B.** Formation des mammosphères en pré-traitement par les (pro)neurotrophines par rapport à la condition standard EGF/bFGF. Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes (moyenne +/- écart-type).

Pour la lignée BT-20, les deux couples NGF/proNGF et BDNF/proBDNF permettent d'augmenter le nombre de mammosphères formées par rapport à la condition standard (Figure 67). La différence est significative pour le NGF 16nM, le proNGF 0,25nM et le proBDNF 0,25 nM ($p < 0,05$ sur les 3 expériences).

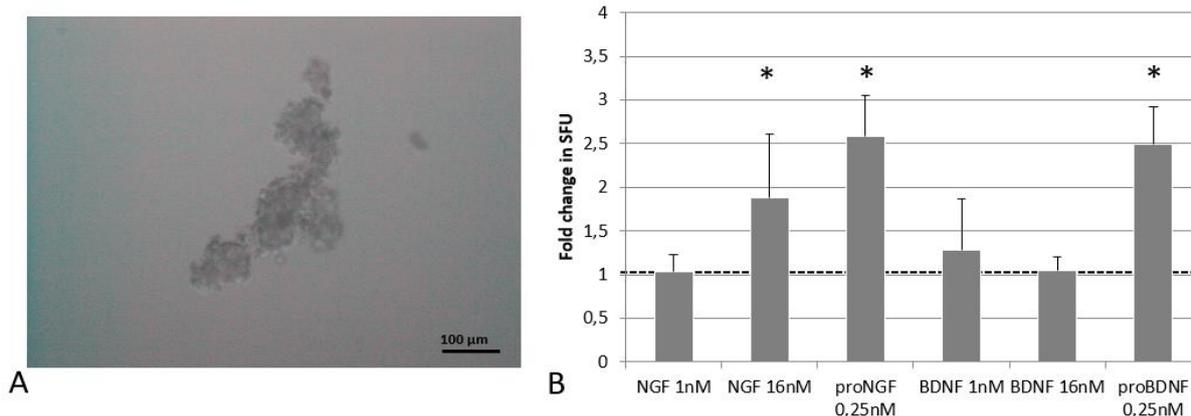


Figure 67. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée BT-20. **A.** Photographie représentative de sphères formées en pré-traitement par l'EGF/bFGF après 7 jours de culture. **B.** Formation des mammosphères en pré-traitement par les (pro)neurotrophines par rapport à la condition standard EGF/bFGF. Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes (moyenne +/- écart-type).

Pour la lignée SUM-159PT (Figure 68), l'effet des neurotrophines était plus inconstant et la différence obtenue non significative.

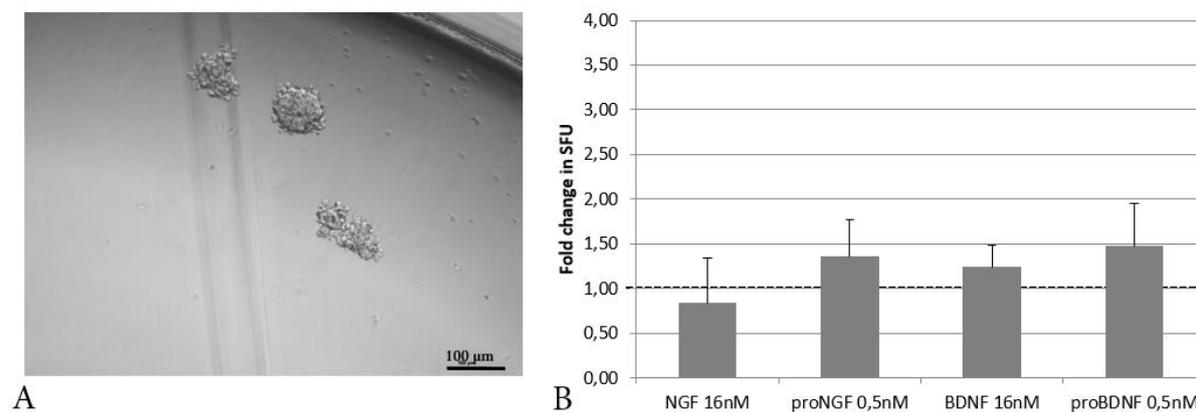


Figure 68. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée SUM-159PT. **A.** Photographie représentative de sphères formées en pré-traitement par l'EGF/bFGF après 8 jours de culture. **B.** Formation des mammosphères en pré-traitement par les (pro)neurotrophines par rapport à la condition standard EGF/bFGF. Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes (moyenne +/- écart-type).

Il semble donc qu'en pré-traitement, les neurotrophines ont peu d'effet supérieur par rapport à la condition standard EGF/bFGF sauf dans les lignées HCC70 (effet du proBDNF 0,5nM significatif) et BT-20 (effet du NGF 16nM, du proNGF 0,25nM et du proBDNF 0,25 nM).

b. En traitement continu

Comme pour le pré-traitement, nos lignées se sont révélées plus ou moins aptes à former des sphères en traitement continu. Nous avons constaté que selon la modalité de traitement, nos lignées ne réagissaient pas de la même façon au traitement par les neurotrophines.

Le traitement continu n'a pas été testé sur la lignée T-47D étant donné les difficultés rencontrées pour la formation de sphères en pré-traitement.

Dans la lignée BT-474 (Figure 69), nous avons encore une fois été confrontés à des problèmes de fusions dans de nombreuses plaques. Les résultats des comptages étaient très inégaux entre les puits d'une même colonne, avec des puits comportant une ou plusieurs sphères de grande taille et quelques petites sphères, et d'autres puits contenant de multiples petites sphères. Nous n'avons donc pas pu exploiter les résultats sur cette lignée.

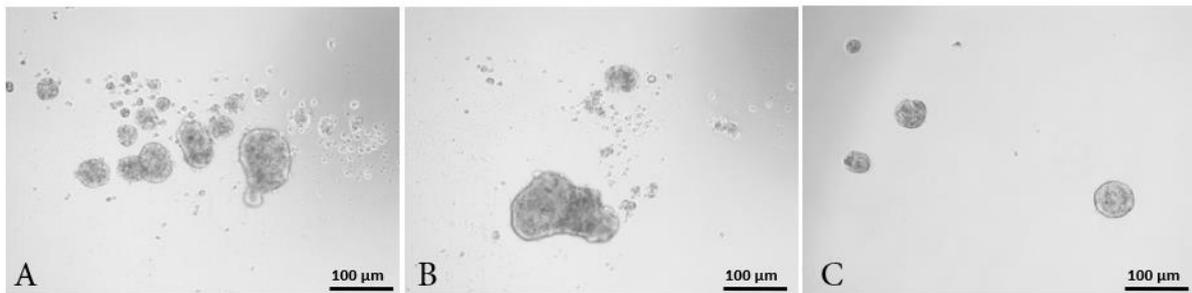


Figure 69. Photographies représentatives des sphères formées en traitement continu par le proNGF 0,25nM après 7 jours de culture dans la lignée BT-474. Les photographies correspondent à 3 puits de la même colonne,ensemencés à 256 cellules/puits. **A.** Multitude de sphères de toutes tailles. **B.** Puits contenant une sphère de grande taille issue de la fusion de plusieurs sphères et une sphère de petite taille. **C.** Puits contenant quatre sphères de petite taille.

Dans la lignée HCC1954 (Figure 70), à nouveau nous n'avons pas observé d'effet des neurotrophines sur l'augmentation du nombre de mammosphères formées, et ce quelle que soit la neurotrophine ou la dose testée. Etant donné les résultats obtenus sur le pré-traitement, nous n'avons pas testé l'utilisation de l'Herceptin ou du Cetuximab en traitement continu.

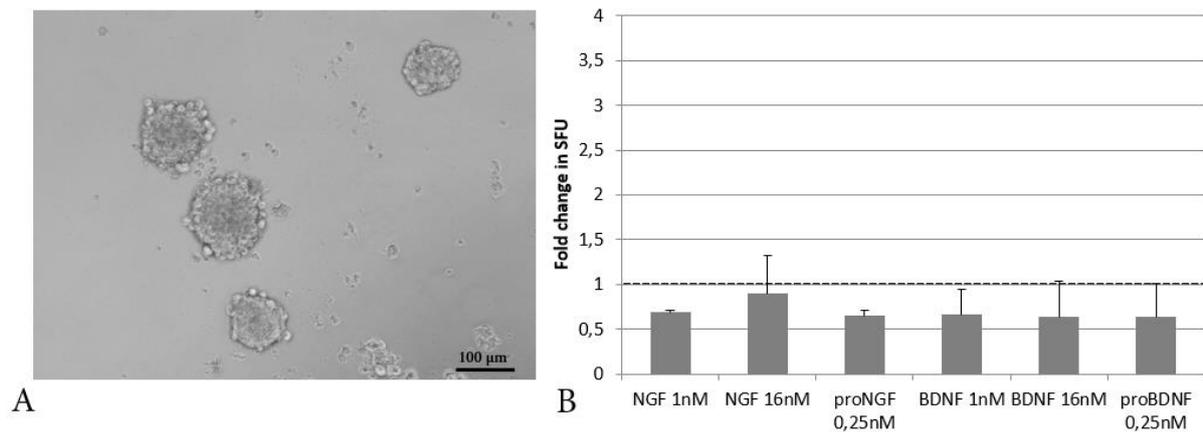


Figure 70. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée HCC1954 en traitement continu. A. Photographie représentative de sphères formées en traitement continu par l'EGF/bFGF après 7 jours de culture. B. Formation des mammosphères en traitement continu par les (pro)neurotrophines par rapport à la condition standard EGF/bFGF. Les données représentent la moyenne de 2 expériences indépendantes (moyenne +/- écart-type).

Dans la lignée MCF-7, sur 3 expériences indépendantes, les neurotrophines ont permis d'augmenter la formation de mammosphères mais de façon inconstante (Figure 71).

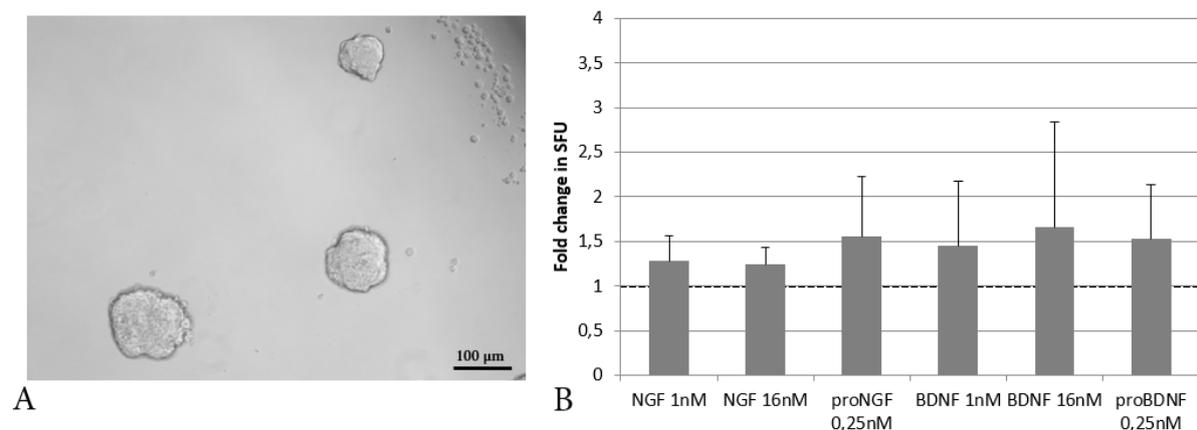


Figure 71. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée MCF-7 en traitement continu. A. Photographie représentative de sphères formées en traitement continu par l'EGF/bFGF après 7 jours de culture. B. Formation des mammosphères en traitement continu par les (pro)neurotrophines par rapport à la condition standard EGF/bFGF. Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes (moyenne +/- écart-type).

Dans la lignée HCC70 (Figure 72), toutes les conditions testées permettaient d'augmenter de façon significative le nombre de sphères formées sauf le BDNF 16nM. Le traitement continu était dans ce cas plus efficace que le pré-traitement.

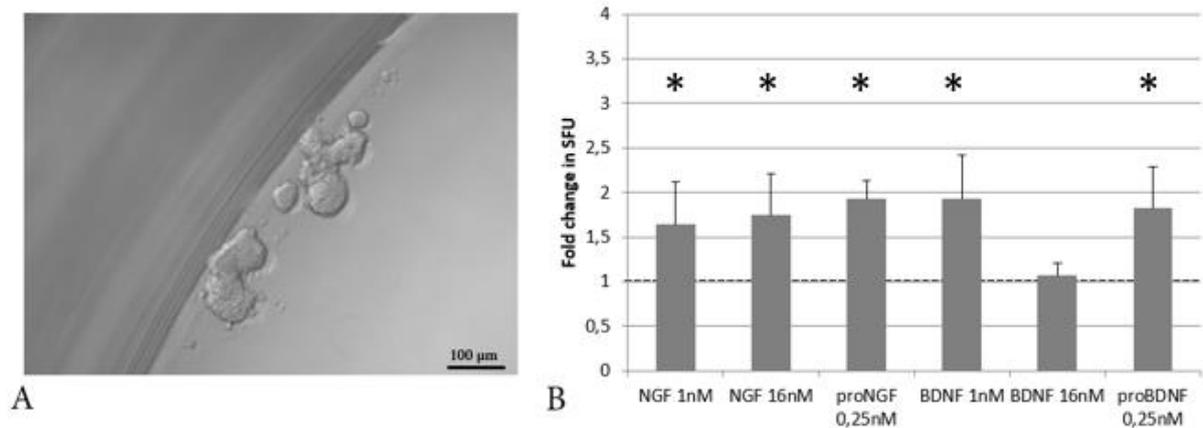


Figure 72. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée HCC70 en traitement continu. A. Photographie représentative de sphères formées en traitement continu par l'EGF/bFGF après 7 jours de culture. B. Formation des mammosphères en traitement continu par les (pro)neurotrophines par rapport à la condition standard EGF/bFGF. Les données représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes (moyenne +/- écart-type).

Dans la lignée MDA-MB-231 (Figure 73), nous avons à nouveau rencontré des difficultés liées à l'adhérence des cellules sur les plaques low binding. Nous avons réalisé nos 3 expériences indépendantes dans des plaques 96 puits traitées avec du polyHEMA. Les sphères formées étaient souvent formées par l'association de plusieurs sphères peu denses (relativement bien individualisables), et l'effet observé par les neurotrophines était inconstant. Dans l'ensemble, les neurotrophines n'ont pas eu d'effet supérieur par rapport à la condition contrôle EGF/bFGF pour la formation de sphères.

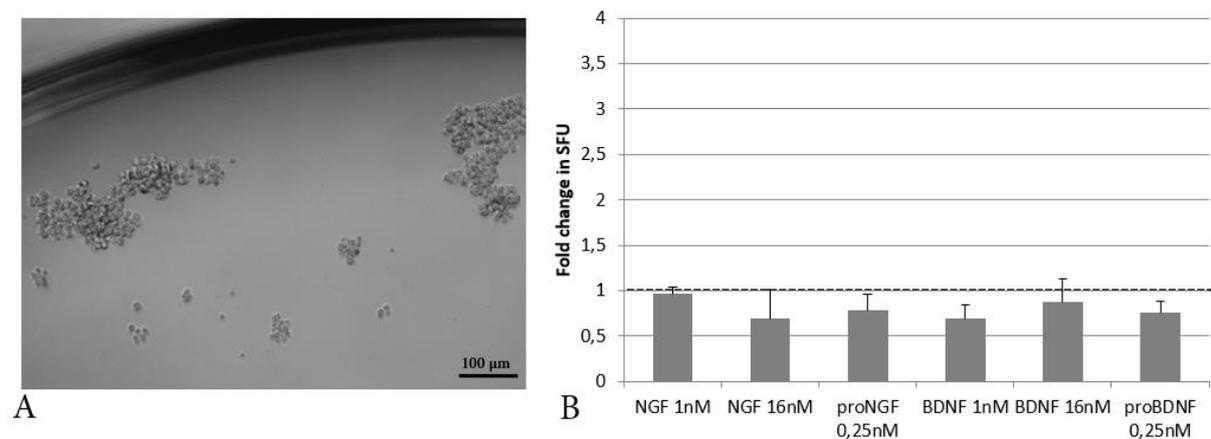


Figure 73. Effet des neurotrophines sur la formation des sphères dans la lignée MDA-MB-231 en traitement continu. A. Photographie représentative de sphères formées en traitement continu par l'EGF/bFGF après 7 jours de culture. B. Formation des mammosphères en traitement continu par les (pro)neurotrophines par rapport à la condition standard EGF/bFGF. Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes (moyenne +/- écart-type).

Dans la lignée SUM-159PT (Figure 74), les sphères formées en EGF/bFGF étaient beaucoup plus nombreuses et de plus grande taille par rapport aux sphères formées en présence des neurotrophines. En traitement continu, l'effet de l'EGF/bFGF était très supérieur à celui des neurotrophines.

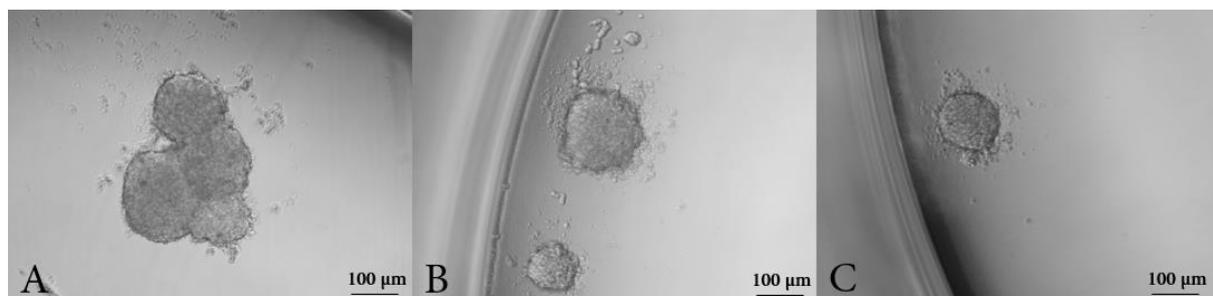


Figure 74. Exemples de sphères obtenues dans la lignée SUM-159PT après 7 jours de traitement continu. A. En condition EGF/bFGF. B. En condition NGF 1nM. C. En condition proBDNF 0,25nM.

Il semble donc qu'en traitement continu, nos lignées répondent différemment aux neurotrophines par rapport au pré-traitement. Dans la lignée HCC70, les deux couples NGF/proNGF et BDNF/proBDNF permettent d'enrichir le compartiment de CSC. Dans la lignée MCF-7 et la lignée MDA-MB-231, l'effet des neurotrophines est inconstant. Dans la lignée HCC1954 et SUM-159PT, les neurotrophines n'ont pas permis d'augmenter le nombre de mammosphères par rapport à la condition EGF/bFGF.

B. Effet sur les marqueurs de CSC

1. Test Aldefluor

Le test AldefluorTM (Stem Cells technologies) permet de visualiser en cytométrie en flux les cellules ayant une activité enzymatique ALDH1 plus importante que la moyenne de la population cellulaire (ALDH^{high}). Nous avons d'abord réalisé le test Aldefluor sur des cellules MCF-7, MDA-MB-231 et SUM-159PT en monocouche, non traitées, afin d'évaluer la population de CSC de base dans ces trois lignées cellulaires (Figure 75).

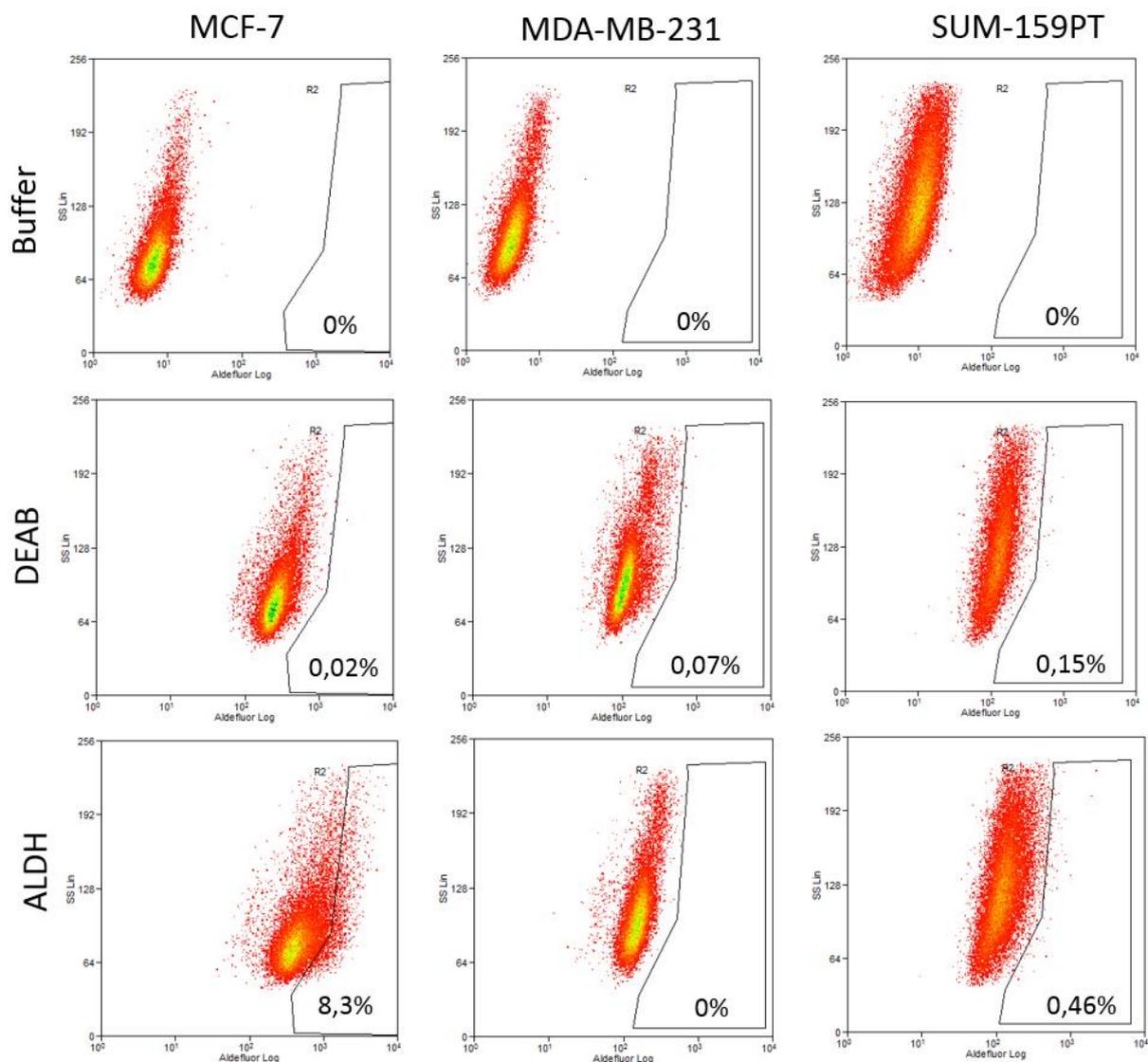


Figure 75. Test Aldefluor sur les lignées MCF-7, MDA-MB-231 et SUM-159PT en monocouche, non traitées aux neurotrophines. 2 expériences indépendantes ont été réalisées, les figures présentent les résultats obtenus sur la deuxième expérience.

Sur les deux expériences indépendantes, il s'est révélé impossible d'isoler une population réellement ALDH^{high}. Pour la lignée MCF-7, nous avons obtenu une population ALDH^{high} de 8.3% supérieure par rapport au contrôle. Ce chiffre très élevé ne correspondant pas aux données de la littérature et la population mise en évidence n'étant pas réellement dissociable de la population globale, nous avons supposé que la population observée résultait d'une augmentation globale du marquage ALDH moyen au sein de la population MCF-7 et ne correspondait pas à une population CSC.

Nous avons dans un deuxième temps évalué la population de CSC dans un des modèles cellulaires répondant aux différentes neurotrophines, la lignée MCF-7. Elisa Tomellini avait montré une augmentation de facteurs impliqués dans l'EMT dans des cellules MCF-7 traitées en monocouche par le NGF (16nM) ou le proNGF (0,5nM) (Tomellini et al, 2014). L'EMT et le caractère souche étant liés, cette modification pouvait précéder l'enrichissement en CSC mammaires. En nous basant sur ces observations, nous avons évalué l'activité ALDH après une exposition des cellules en monocouche aux neurotrophines ((NGF/BDNF: 16 nM; proNGF/proBDNF: 0,5 nM) pendant 48h. L'effet le plus important était obtenu avec le proBDNF (+5,91%) mais ce résultat n'était pas supérieur au résultat obtenu dans la condition EGF/bFGF (+5%), et a pas été retrouvé lors de la seconde expérience (Figure 76).

Nous avons alors tenté de procéder à des mises en sphères en flasks non adhérentes sur 2 générations, et ce pour les cellules MCF-7, MDA-MB-231 et HCC70. Ces différentes cellules étaient exposées de façon continue aux neurotrophines. Le couple NGF/proNGF a été testé, aux concentrations de 1nM et 16nM pour le NGF et de 0,25 et 0,5nM pour le proNGF. Suite à des problèmes d'adhérence des cellules sur le plastique pourtant normalement traité non-adhérent, seules les sphères issues des cellules MCF-7 ont pu être soumises à un test Aldefluor. Les résultats montrent que le traitement continu par les neurotrophines ne permet pas de mettre en évidence une population ALDH^{high} (données non montrées).

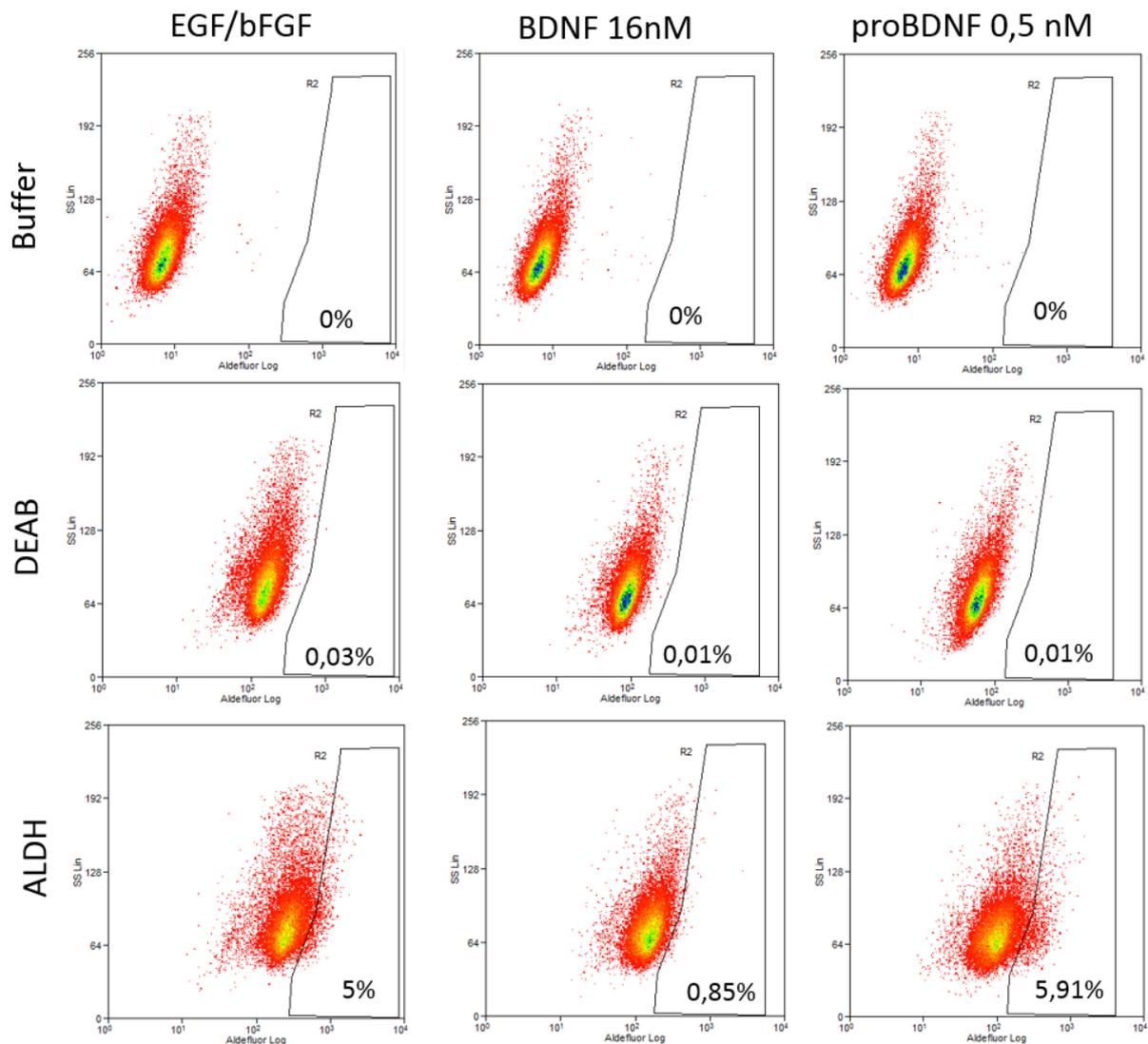


Figure 76. Test Aldefluor sur la lignée MCF-7 après 48h de traitement aux neurotrophines (NGF/BDNF : 16 nM ; proNGF/proBDNF : 0,5 nM). Deux expériences indépendantes ont été réalisées. Seules les conditions dans lesquelles une population ALDH^{high} était observée sont présentées.

Ces résultats ne concordent pas avec les résultats obtenus précédemment par Elisa Tomellini ou avec nos propres expériences, dans lesquelles le NGF et le proNGF permettaient d'enrichir la population de CSC et d'augmenter la proportion de cellules ALDH^{high}. Par la suite, nous avons testé une méthode différente d'isolement des CSC en utilisant un marquage membranaire CD44⁺/CD24⁻.

2. Marquage CD44⁺/CD24⁻

Les CSC de sein sont caractérisées par un phénotype CD44⁺/CD24⁻, qui peut être mis à profit en cytométrie en flux pour visualiser et isoler une population enrichie en CSC. Nous avons testé et validé le protocole de marquage CD44/CD24 sur une population de MCF-7 non traitées. Nous avons ensuite réalisé un pré-traitement aux neurotrophines sur cette même lignée, avec des concentrations de 1 nM pour le NGF et le BDNF, 0,25 nM pour le proNGF et 0,5 nM pour le proBDNF. Sur trois expériences indépendantes, les neurotrophines ne permettaient pas de mettre en évidence une population CD44⁺/CD24⁻ différente de celle présente dans la condition standard EGF/bFGF (Figure 77).

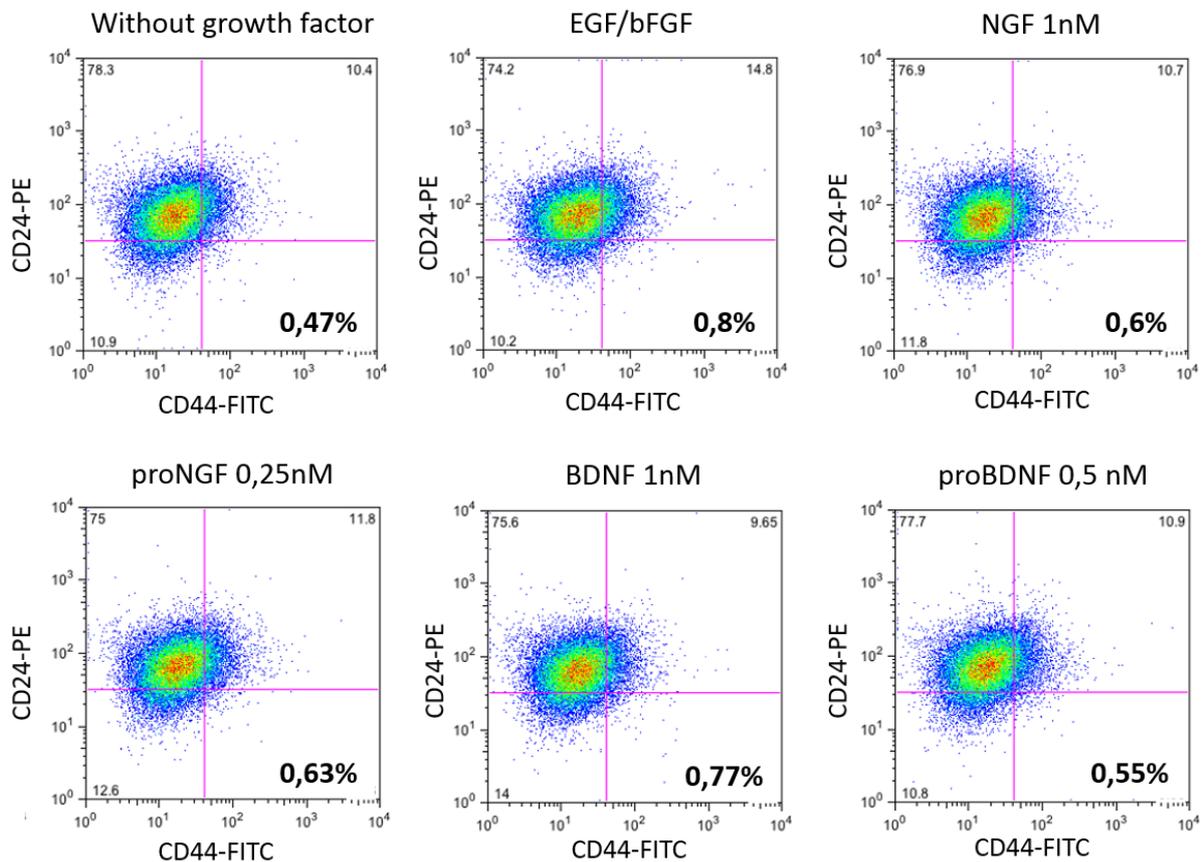


Figure 77. Double marquage CD44/CD24 sur la lignée MCF-7 après 48h de traitement aux neurotrophines en culture en monocouche (NGF/BDNF : 1 nM ; proNGF : 0,25 nM ; proBDNF : 0,5 nM). Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Les résultats présentés correspondent à une des trois expériences. Le pourcentage de cellules CD44⁺/CD24⁻ est présenté en gras.

3. Marquage CD133

Nous avons réalisé un marquage CD133 selon le protocole décrit dans les matériels et méthodes sur la lignée MDA-MB-231. Nous avons utilisé comme contrôle une lignée de glioblastome connue pour marquer très fortement le CD133, la lignée DIPG013 (diffuse intrinsic pontine gliomas). Que ce soit sur les MDA-MB-231 traitées avec 1% de SVF ou avec 10% de SVF, nous n'avons pas réussi à visualiser un marquage CD133, alors que le marquage pouvait bien être observé dans notre lignée contrôle où plus de 60% des cellules présentaient un marquage CD133^{pos} (Figure 78). Le marqueur CD133 a donc été abandonné.

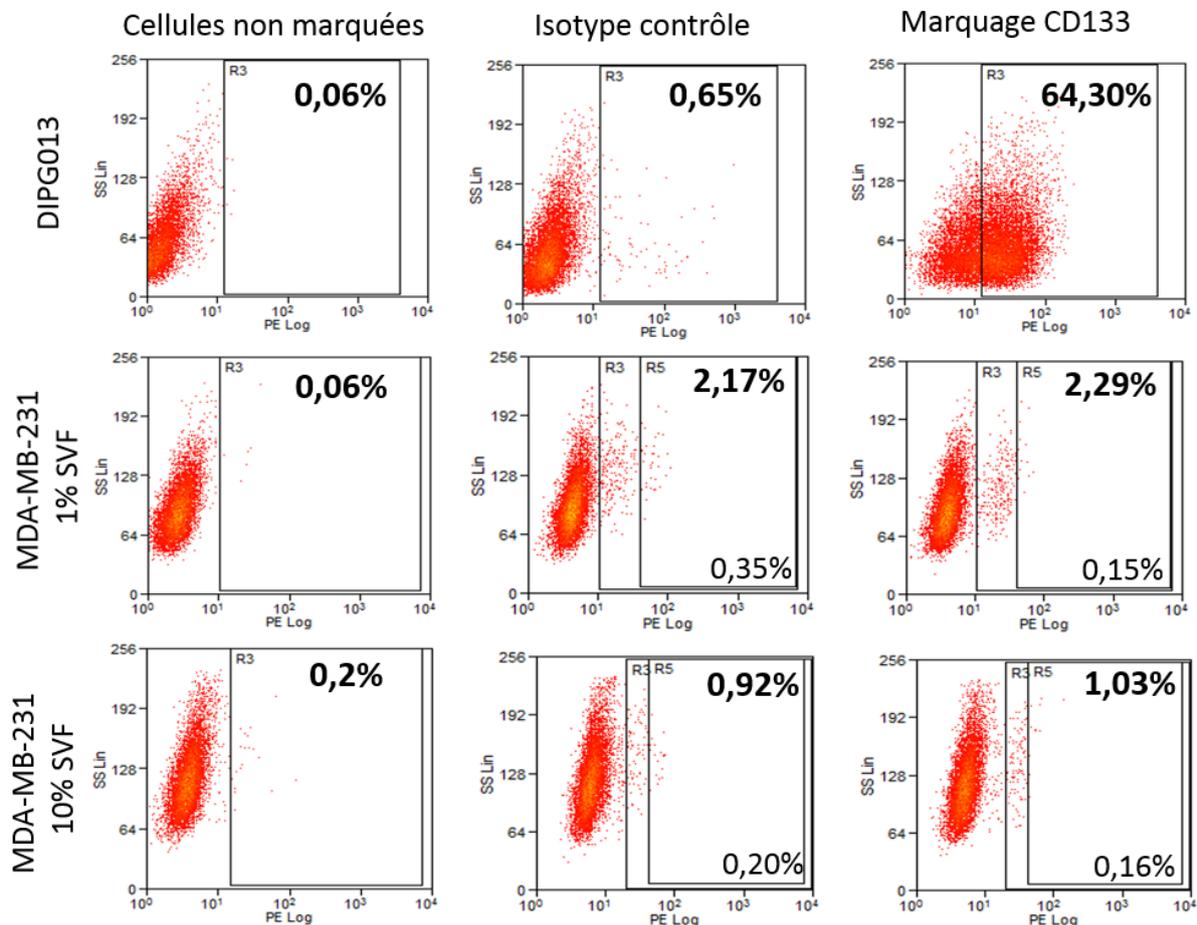


Figure 78. Cellules non marquées, cellules marquées par l'isotype contrôle et cellules marquées avec l'anticorps CD133-PE dans la lignée DIPG013 et dans la lignée MDA-MB-231 cultivée dans un milieu à 1% ou 10% de SVF. Les chiffres en gras correspondent au % de cellules CD133^{pos} (population R3) et les chiffres non gras correspondent au % de cellules CD133^{high} dans l'isotype contrôle et l'échantillon marqué (population R5)

4. Marquage CD49f

Nous avons testé un marquage par CD49f sur la lignée MDA-MB-231 selon le protocole décrit dans les matériels et méthodes. Contrairement au marquage CD133, nous avons cette fois obtenu presque 100% de cellules positives pour le CD49f (Figure 79). Ce marqueur n'était donc pas non plus adapté pour détecter la population de CSC dans la lignée MDA-MB-231.

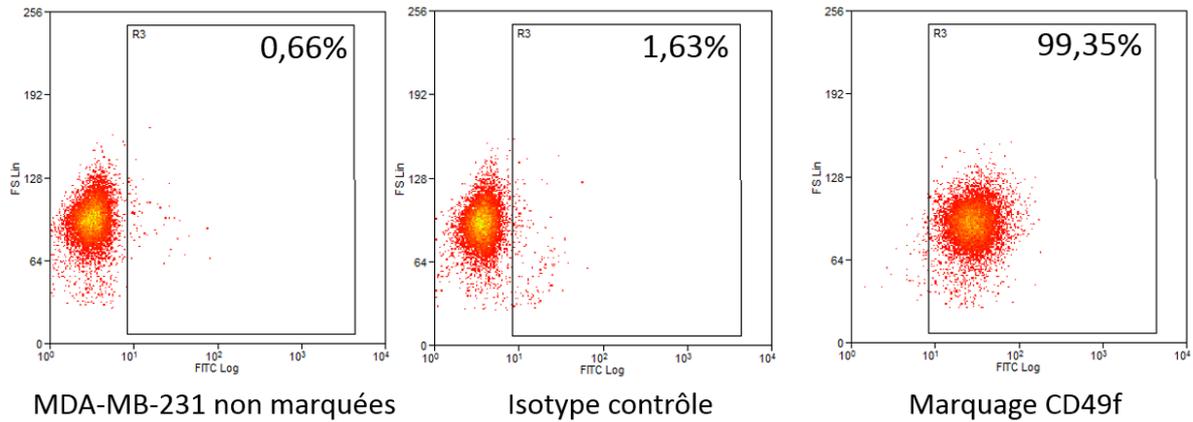


Figure 79. Marquage par CD49f dans la lignée MDA-MB-231. Résultats obtenus sur les cellules non marquées, les cellules marquées par l'isotype contrôle et les cellules marquées avec l'anticorps CD49f-FITC.

III. Modèles cellulaires pour l'isolement des CSC

Les tests classiques utilisant l'activité de l'enzyme ALDH1A1 (test Aldefluor) ou des marqueurs membranaires (phénotype CD44⁺/CD24⁻, CD133⁺, CD49f⁺) s'étant révélés décevants pour mettre en évidence une population de CSC modulée par les neurotrophines dans différentes lignées cellulaires, nous avons envisagé d'autres approches utilisant cette fois-ci des modèles cellulaires.

A. MDA-MB-231 pNanog-mNeptune

Nous avons créé trois vecteurs pNanog-mNeptune de taille différente : B6, B7 et B9 que nous avons nucléofectés dans la lignée MDA-MB-231. Avec les clones B7 et B9, nous n'avons pas réussi à obtenir une population Neptune^{high}. Avec le clone B6, nous avons observé une population Neptune^{high} mais avec une fluorescence peu supérieure au contrôle Mock (nucléofection avec un vecteur vide) à la fois en intensité et en nombre (Figure 80). Nous avons réalisé deux tris cellulaires indépendants avec le clone B6. Lors du 1^{er} tri cellulaire, nous avons observé 0,2% de cellules Neptune^{high} dans la population Mock et 0,6% dans la population B6. Lors du 2^{ème} tri cellulaire, nous avons observé 1% de cellules Neptune^{high} dans la population Mock, alors qu'aucun fluorophore n'était nucléofecté, et 1,3% dans la population B6.

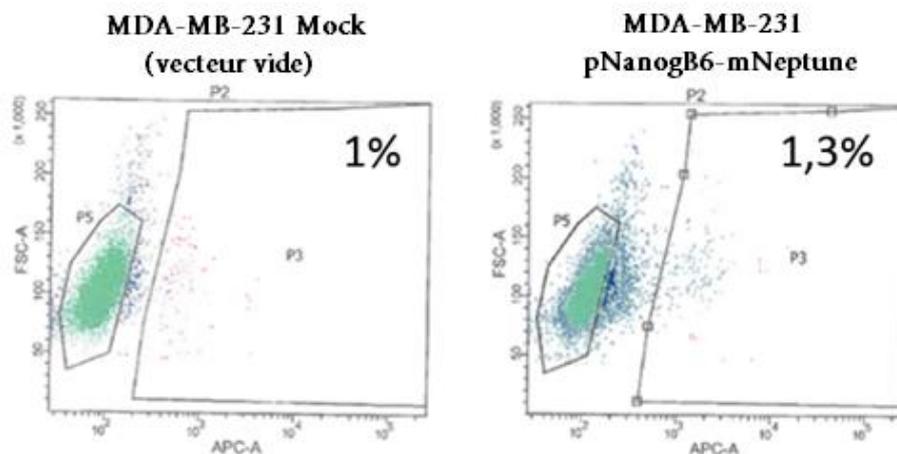


Figure 80. Deuxième tri cellulaire réalisé sur les MDA-MB-231 pNanogB6-mNeptune. La population Mock présentait 1% de cellules APC^{high} et la population pNanogB6-mNeptune présentait 1,3% de cellules APC^{high}

Après le 1^{er} tri cellulaire (N1), la décroissance de fluorescence (Figure 81) était lente et régulière au cours du temps (passe de 80% à 20% en 7 semaines). Après le 2^{ème} tri cellulaire (N2), la décroissance de fluorescence était d'abord rapide (100% à 38% en 5 jours), puis lente et régulière au cours du temps (de 38% à 8% en 5 semaines).

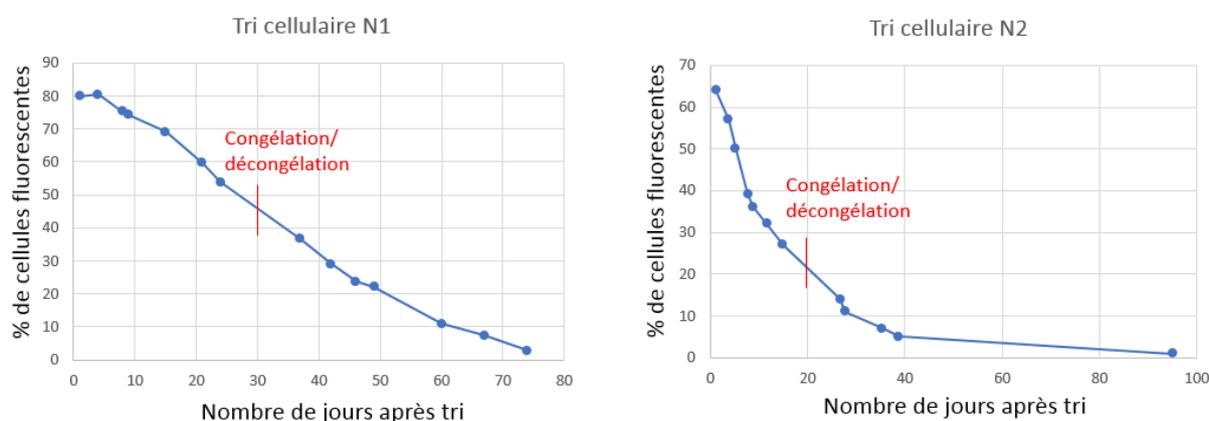


Figure 81. Décroissance de fluorescence des cellules MDA-MB-231 pNanogB6-mNeptune^{high} au cours du temps après le tri cellulaire N1 et le tri cellulaire N2. Les cellules ont subi un cycle de congélation/décongélation à J30 après le 1^{er} tri ou J20 après le 2^{ème} tri.

De plus, nous avons cherché l'origine de la fluorescence observée dans les cellules Mock. Nous avons mis en évidence une autofluorescence des MDA-MB-231 dans l'APC pouvant atteindre 2% de la population (Figure 82), ce qui expliquait la fluorescence observée avec les cellules Mock.

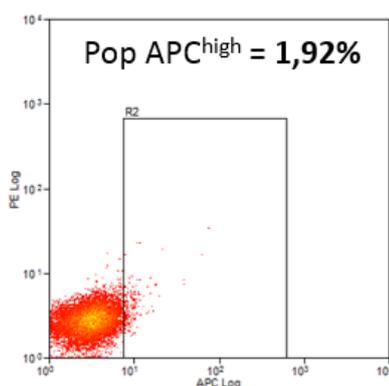


Figure 82. Autofluorescence des cellules de la lignée MDA-MB-231 dans l'APC.

Etant donné l'autofluorescence des MDA-MB-231 dans l'APC et la faible population Neptune^{high} obtenue avec le clone B6, nous avons décidé de créer un nouveau vecteur, cette fois-ci avec la GFP.

B. MDA-MB-231 pNanog-GFP

Nous avons trié les MDA-MB-231 pNanog-GFP après 14 jours de sélection par la généticine et avons récupéré trois populations cellulaires distinctes (Figure 83) : un groupe de cellules négatives pour la GFP (GFP neg), un groupe exprimant faiblement la GFP (GFP faible), et enfin un groupe exprimant fortement la GFP (GFP fort).

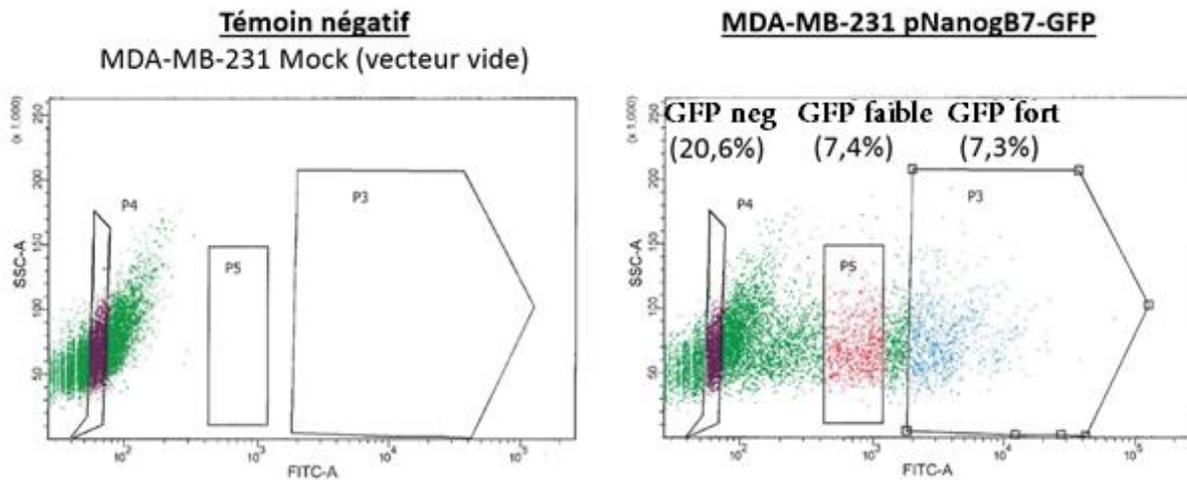


Figure 83. Tri des MDA-MB-231 pNanogB7-GFP après 14 jours de sélection par la généticine. Trois populations ont été isolées: une population GFP neg (20,6% de la population totale), une population GFP faible (7,4% du total) et une population GFP fort (7,3% du total).

Nous avons réalisé un suivi de la décroissance de la fluorescence dans le temps, à la fois par observation directe en microscopie (Figure 84) et par cytométrie en flux.

Nous avons observé que la fluorescence des cellules GFP faible et GFP fort ne décroissait pas avec le temps, ce qui n'était pas en accord avec un phénotype de CSC (Figure 85). Dans la population GFP neg une faible population devenait positive.

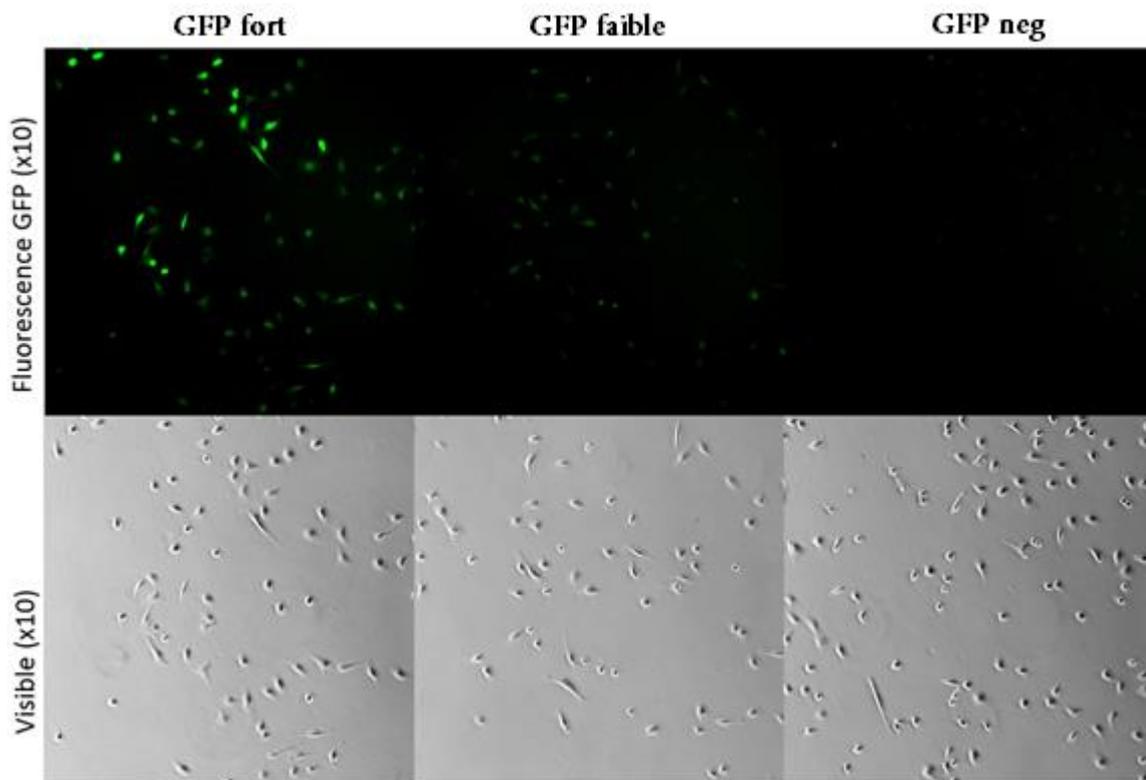


Figure 84. Evaluation de la fluorescence des MDA-MB-231 pNanogB7-GFP par microscopie (48h après tri cellulaire).

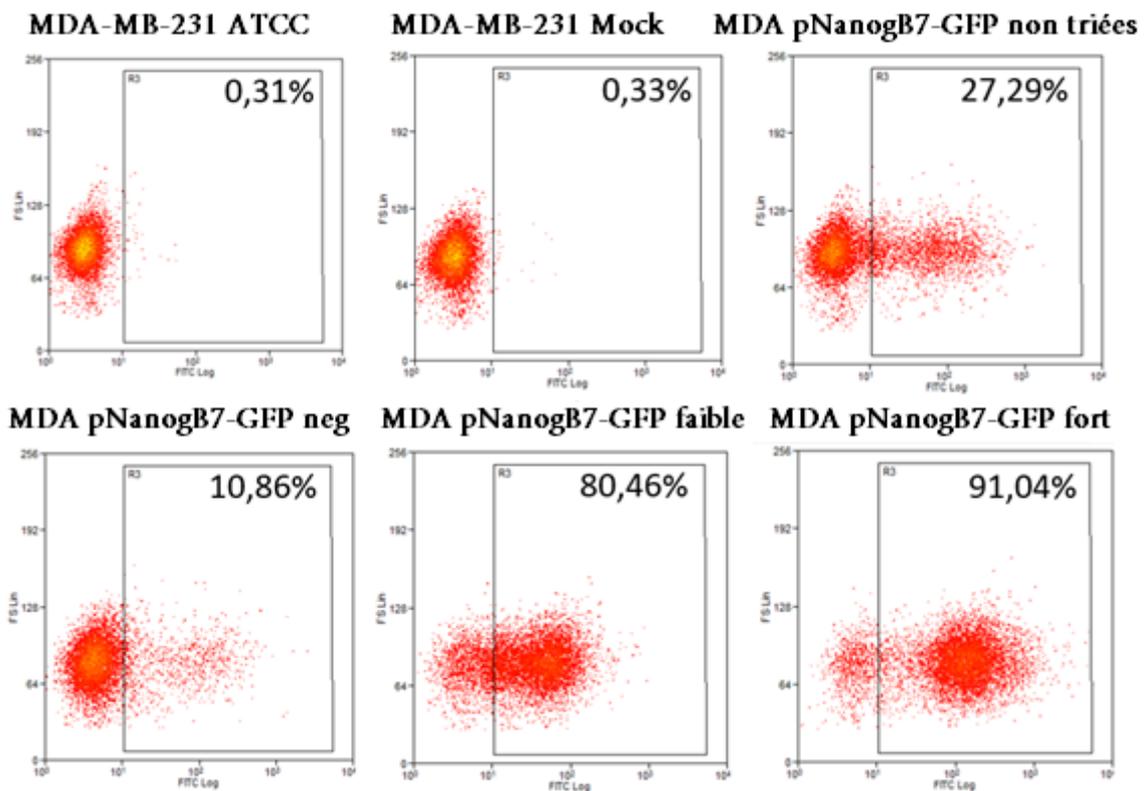


Figure 85. Fluorescence des cellules MDA-MB-231 non nucléofectées, nucléofectées avec le vecteur vide ou nucléofectées avec le vecteur pNanogB7-GFP, 4 jours après tri.

Nous avons voulu tester les propriétés souches des différents groupes triés pour vérifier si notre rapporteur pNanog-GFP permettait bien d'isoler une population de CSC.

Nous avons tout d'abord réalisé un test de formation de sphères avec décroissance du nombre de cellulesensemencées. Après 7 jours, le % de sphères formées était de 2,17% dans les MDA-MB-231 ATCC, 2,16% dans les MDA-MB-231 Mock, 1,42% dans le groupe pNanogB7-GFP neg, 1,02% dans pNanogB7-GFP faible et 1,33% dans pNanogB7-GFP fort. Les groupes GFP-positifs ne démontraient donc pas une capacité de formation de sphères augmentée par rapport aux MDA natives, au témoin Mock ou aux GFP neg.

Nous avons réitéré l'expérience en utilisant la méthode de 1 cellule/puits, avec 3 plaques par condition (Figure 86) et avons obtenu le même type de résultats. Le % de formation de sphères était de 5,7% pour MDA, 6,60% pour Mock, 7,5% pour les GFP neg, 4,3% pour les GFP low et 6,6% pour les GFP high.

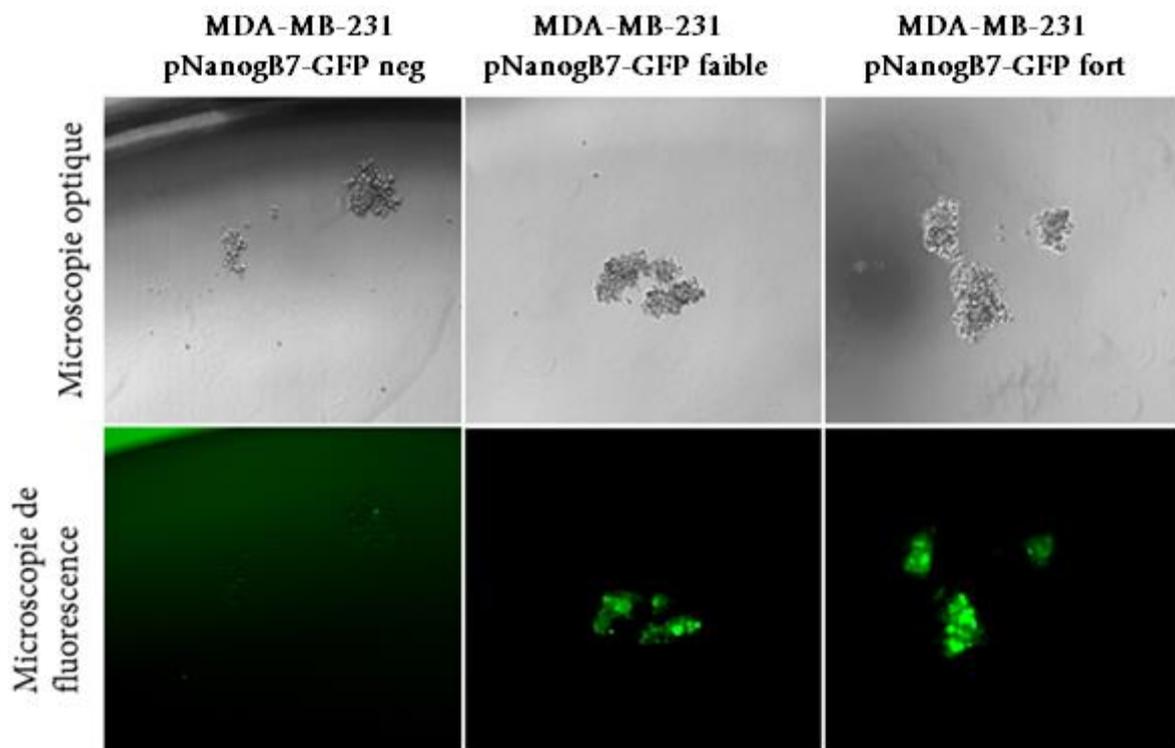


Figure 86. Sphères observées en microscopie optique ou de fluorescence dans les populations MDA-MB-231 pNanogB7-GFP neg, pNanogB7-GFP faible et pNanogB7-GFP fort.

Nous avons également testé la mise en sphères en Matrigel (Figure 87). Après 7 jours, le pourcentage de formation de « sphères » formé (moyenne de 2 boîtesensemencées

respectivement à 50 et 100 cellules) était de 64,5% MDA, 69% Mock, 84% B7-GFP neg, 59,5% B7-GFP low et 79,5% B7-GFP high. Là encore, il n'y avait pas de différence entre les groupes GFP-positifs et les autres. Par ailleurs, nous avons mis en évidence de fortes capacités de tubulogénèse dans les MDA-MB-231, les structures observées n'étaient donc pas des sphères mais plutôt des colonies.

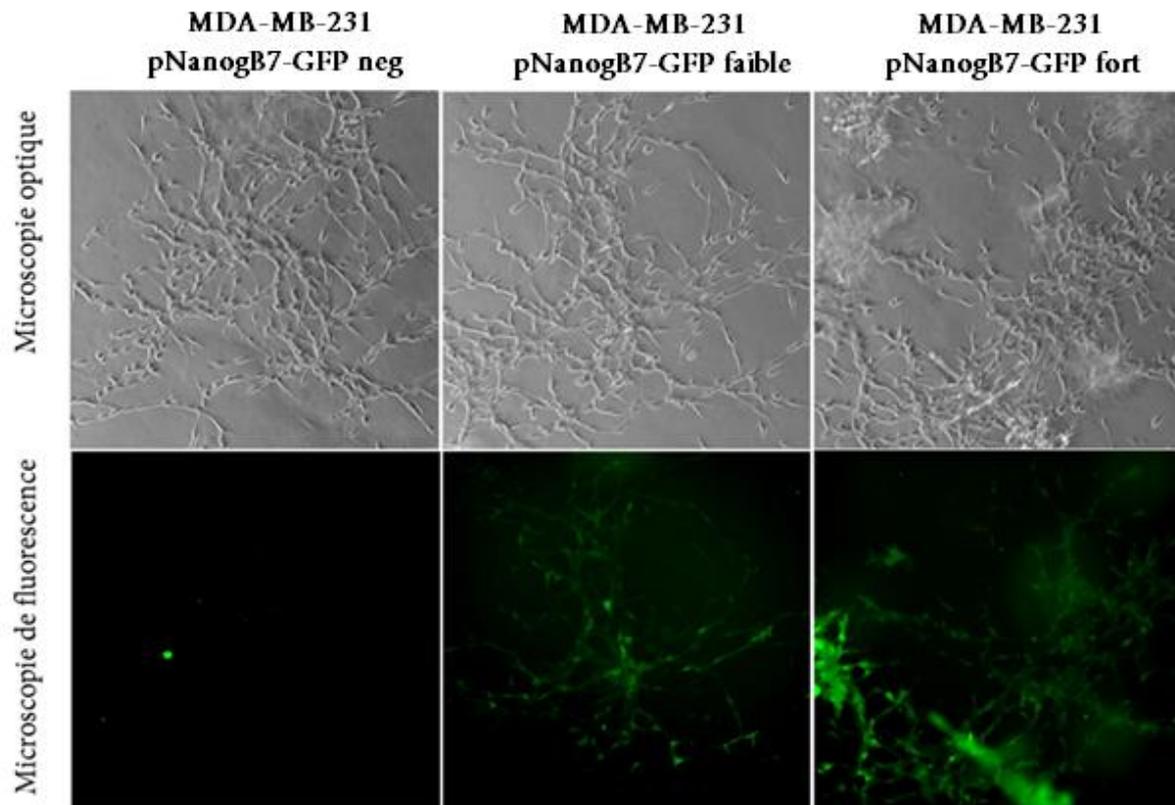


Figure 87. Observation en photographie optique et de fluorescence de clones de MDA-MB-231 pNanogB7-GFP formés en Matrigel issues de cellules MDA-MB-231 pNanogB7-GFP neg, pNanogB7-GFP faible et pNanogB7-GFP fort.

Nous avons obtenu les mêmes résultats avec un test de clonogénicité en milieu 10% SVF. A 7 jours, le % de clones formés était pour les MDA-MB-231 ATCC 76,7%, MDA-MB-231 Mock 63,2%, MDA-MB-231 pNanogB7-GFP neg 79,8%, MDA-MB-231 pNanogB7-GFP faible 51,6%, et MDA-MB-231 pNanogB7-GFP fort 82,6%.

Enfin, nous avons quantifié l'expression des facteurs de pluripotence oct-4, sox-2, Nanog et Klf-4 dans les différentes populations (Figure 88) et encore une fois nous n'avons pas observé de différence significative entre les différents groupes.

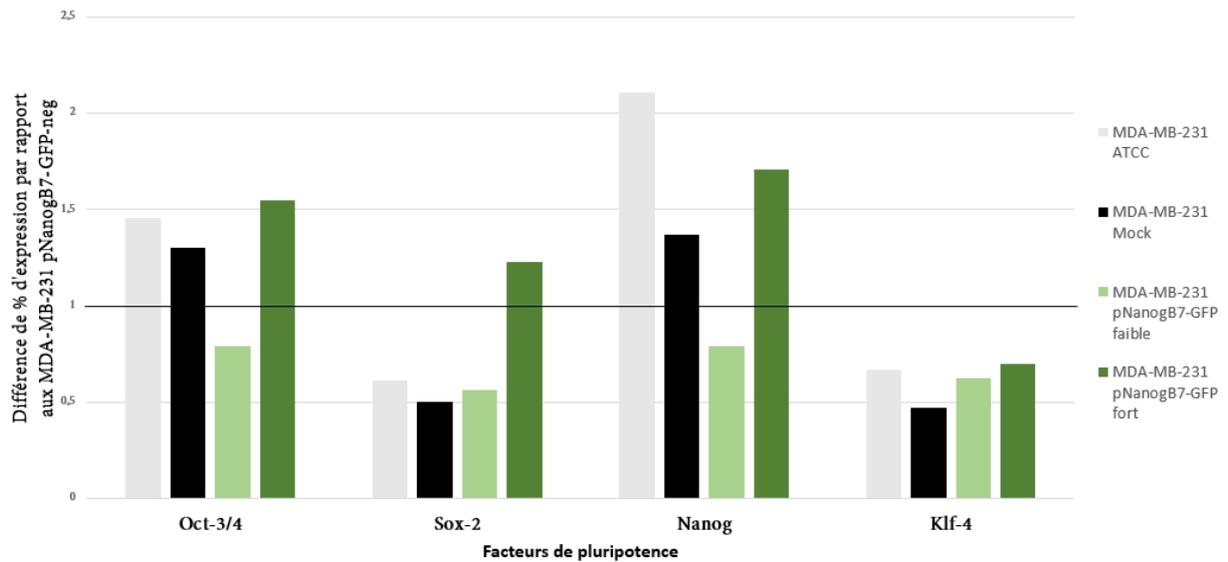


Figure 88. Quantification de l'expression des facteurs de pluripotence Oct-3/4, Sox 2, Nanog et Klf-4 dans les différentes populations de MDA-MB-231 : différence relative par rapport à la population MDA-MB-231 pNanogB7-GFP neg, indiquée par la barre noire. Le gène de référence est la microglobuline.

Les résultats convergents de tous ces tests indiquent que la population MDA-MB-231 pNanogB7-GFP^{high} ne présentait pas de propriétés de CSC, invalidant donc le vecteur utilisé comme un rapporteur de CSC.

Partie 2 : Voies de transduction impliquées dans l'enrichissement en CSC

I. Etude de l'implication des récepteurs des neurotrophines

Nous avons évalué l'implication des différents (co)récepteurs sur l'enrichissement en CSC en bloquant spécifiquement l'un ou l'autre par des expériences de transfection de siRNA. Les cellules MCF-7 transfectées et traitées de façon continue aux neurotrophines ont été soumises aux tests de formation des sphères.

Au vu des résultats précédemment obtenus dans le laboratoire (thèse Elisa Tomellini, 2013), nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur le couple NGF/proNGF et avons donc ciblé TrkA (récepteur préférentiel du NGF/proNGF), p75^{NTR} (récepteur des neurotrophines de faible affinité) et EphA2, un co-récepteur récemment impliqué dans la signalisation médiée par le proNGF (données non publiées). De manière intéressante, ces résultats préliminaires (Figure 89) indiquent que pour l'enrichissement en CSC, p75^{NTR} est impliqué quelle que soit la condition de culture (EGF/bFGF, NGF, proNGF), que TrkA est à la fois impliqué dans les effets du NGF et du proNGF et que EphA2 est impliqué dans l'effet du proNGF. Ces résultats suggèrent donc qu'il n'y a pas un seul récepteur spécifique impliqué dans l'action du NGF ou du proNGF.

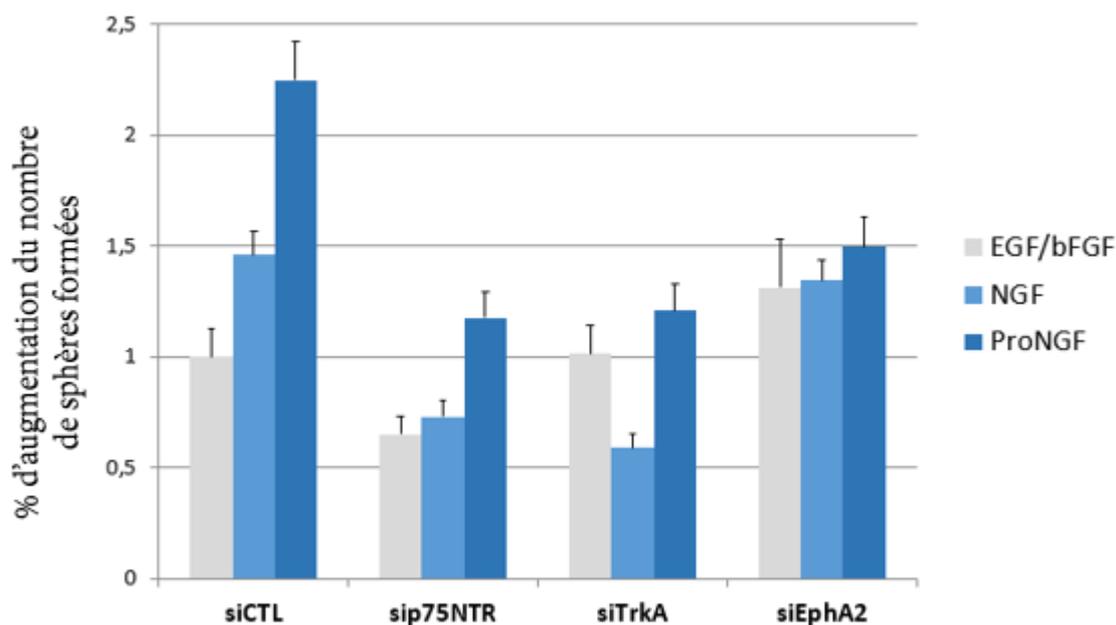


Figure 89. Test de formation de mammosphères après 7 jours de traitement continu au NGF (16 nM) et proNGF (0,5 nM) après inhibition de p75^{NTR}, TrkA et EphA2 dans la lignée MCF-7. L'efficacité des siRNA a été au préalable vérifiée par RT-QPCR. Les données représentent la moyenne de 2 expériences indépendantes.

II. Etude des voies de signalisation activées

A. Etude des facteurs de pluripotence modulés en population totale

Nous avons cherché à évaluer les variations d'expression des facteurs de transcription impliqués dans le maintien de la pluripotence, à savoir Oct-4, Sox 2, Nanog, Klf-4 et c-Myc, après traitement d'une population cellulaire par les neurotrophines.

Les cellules MCF-7 ont été cultivées en monocouche et exposées aux neurotrophines comme en pré-traitement. Cette approche pouvait se révéler envisageable car de précédents travaux au laboratoire avaient démontré que ce laps de temps était suffisant pour modifier de manière significative bon nombre de facteurs impliqués dans la transition épithélio-mesenchymateuse (EMT) tels que SNAI1, SNAI2, TWIST1 ou la vimentine (Tomellini et al, 2014). Or l'EMT est un phénomène pouvant permettre un enrichissement en CSC. Les doses de neurotrophines utilisées pour ce traitement étaient pour le NGF/BDNF de 1 et 16 nM, pour le proNGF de 0,25 nM et pour le proBDNF de 0,5 nM. A l'issue de 48h de traitement en pseudo-sevrage, nous avons quantifié par RT-Q-PCR les niveaux d'expression des différents facteurs de

pluripotence. Les résultats obtenus n'ont pas été concluants car sur 4 expériences indépendantes, d'importantes variations de ces facteurs de pluripotence par rapport au gène de référence (microglobuline) ont été observées. Sur les mêmes extractions, il faudrait réitérer cette quantification en utilisant deux nouveaux gènes de référence, la GAPDH et RPLP0, et ajouter un contrôle positif, twist1 ou snai1, ou la vimentine, qui ont déjà été montrés comme augmentés précédemment au laboratoire en utilisant le même protocole (Tomellini et al, 2014).

Cependant, l'analyse présentée ci-dessus porte sur une population totale comportant des cellules non souches et des cellules souches. Ainsi, si nous souhaitons déchiffrer les voies de signalisation au sein des CSC, l'étape suivante consiste à se concentrer uniquement sur la population de CSC en tentant de l'isoler de manière la plus précise possible.

B. Résultats des Protein Arrays

Différentes expériences utilisant la technique des Protein arrays ont été réalisées sur les MDA-MB-231 en population totale selon les protocoles décrits dans les matériels et méthodes. L'objectif était de relier la variation des facteurs de pluripotence aux voies de signalisation.

Globalement, les variations observées en termes d'intensité des spots testés étaient très faibles d'une condition à l'autre.

Les protein arrays Human Pluripotent Stem Cells ont été réalisés 2 fois. Pour rappel, ils permettaient entre autres d'étudier les variations d'expression des facteurs de pluripotence de cœur : Nanog, Oct-3/4 et Sox-2, mais n'incluaient pas Klf-4. Les résultats obtenus sont cohérents avec les données de la littérature concernant les CSC. Ainsi, l'expression de Nanog et Sox-2 augmentait de 50% entre la condition EGF/bFGF et la condition 0. Lors d'un traitement par le NGF, l'expression de Nanog augmentait de 36,4% +/- 12,4% et l'expression Sox-2 augmentait de 37,2% +/- 0,3% par rapport à la condition 0. Dans tous les autres cas, les variations d'expression observées entre les conditions étaient minimes, de l'ordre de $\pm 20\%$ maximum, et n'étaient pas reproductibles entre les deux expériences. Ainsi, les protein arrays Human Pluripotent Stem Cells ne nous ont pas permis de mettre en évidence d'autres cibles d'intérêts.

Les phospho RTK array (N=2) ont été réalisés deux fois. Dans la condition EGF/bFGF versus la condition 0, l'EGFR augmentait de $644,8\% \pm 145,56$, ErbB2 augmentait de $559,8\% \pm 136,75$, Mer augmentait de $170,5\% \pm 21,94$, C-Ret augmentait de $60,4\% \pm 37,91$ et TrkA augmentait de $71,6\% \pm 49,11$. Dans la condition proNGF versus la condition 0, EphA2 augmentait de $86,28\% \pm 32,52$, EphA3 augmentait de $83,2\% \pm 56,61$ et VEGFR1 augmentait de $46,62\% \pm 7,35$.

Dans les phospho MAPK et phospho kinase, nous n'avons pas mis en évidence de cible d'intérêt.

Comme indiqué précédemment, l'analyse présentée ci-dessus porte sur une population totale comportant des cellules non souches et des cellules souches, et souligne la nécessité d'isoler les CSC pour déchiffrer les voies de signalisation au sein des CSC.

Partie 3 : Marqueurs de CSC, neurotrophines et récepteurs dans le modèle canin

I. Caractérisation des tumeurs et de la cohorte canine

L'étude comprenait 96 chiennes. Parmi celles dont le statut stérilisé ou non était connu, la plupart étaient entières au moment du diagnostic : 67/88 (76%). 38 races étaient représentées, les plus fréquentes étant les Yorkshires (13/96), les épagneuls bretons (7/96) et les Shih-Tzu (6/96). L'âge moyen des chiennes au moment de la chirurgie était de 10,1±2,1 ans (moyenne ± écart-type, intervalle de 3,3 à 15,5 ans). Les tumeurs étaient classées selon le grading de Peña et Clemente en grade I (30/96 ; 31%), grade II (21/96 ; 22%), ou grade III (32/96 ; 33%) (Goldschmidt et al, 2011 ; Peña et al, 2013). Les carcinomes mammaires inflammatoires représentaient 13/96 cas (14%). Les tumeurs étaient classées en sous-types histologiques suivant la même classification de Peña et Clemente (Goldschmidt et al, 2011). Notre cohorte a ainsi été classée en 4 types histologiques majeurs – tubulaire simple, tubulaire complexe, solide et anaplasique (Tableau 19).

Diagnostic morphologique	Type histologique
Tubulaire Tubulopapillaire Tubulotrabéculaire Canalaire	Tubulaire simple
Tubulaire complexe Tubulopapillaire complexe Tubulotrabéculaire complexe	Tubulaire complexe
Adénosquameux Adénosquameux et tubulaire Comédocarcinome Cribriforme Solide et tubulaire/trabéculaire	Solide
Anaplasique	Anaplasique

Tableau 19. Correspondance entre le diagnostic morphologique et le type histologique des tumeurs mammaires canines malignes.

Il est reconnu que les tumeurs tubulaires simples et complexes sont de meilleur pronostic que les tumeurs solides et encore plus les tumeurs anaplasiques, qui ont un pronostic sombre (Misdorp et al, 1999 ; Rasotto et al, 2017). Dans le cas de tumeurs hétérogènes, par exemple dans le cas d'une tumeur « solide et tubulaire » ou « adénosquameuse et tubulaire », l'aspect solide était privilégié par rapport à l'aspect tubulaire car ce premier est communément associé à un moins bon pronostic. Notre cohorte était composée de 31/96 carcinomes tubulaires simples (32%), 17/96 tubulaires complexes (18%), 34/96 carcinomes solides (35%), et 14/96 carcinomes anaplasiques (15%). La correspondance entre les grades et les types histologiques est présentée Tableau 20.

Type histologique	Grade de Peña & Clemente				Total
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	IMC	
Tubulaire simple	13	11	7	0	31
Tubulaire complexe	14	1	2	0	17
Solide	3	7	21	3	34
Anaplasique	0	0	4	10	14
Total	30	19	34	13	96

Tableau 20. Correspondance entre le type histologique et le grade des échantillons de la cohorte.

Les tumeurs étaient également classées selon des critères d'agressivité. Des emboles étaient observés dans 29/96 tumeurs (30%), incluant 16 tumeurs de grade 3 et 13 CMI. Les nœuds lymphatiques étaient présents dans 49/96 cas (51%), avec l'observation d'une infiltration par des cellules tumorales dans 35% des cas (17/49).

Les tumeurs ont finalement été classifiées en 3 groupes en fonction des composantes, telles que décrites dans les matériels et méthodes. 75/96 tumeurs présentaient une composante luminale, 37/96 présentaient une composante myoépithéliale et 68/96 présentaient une composante diffuse.

Les données individuelles relatives à chaque animal inclus dans l'étude ainsi que les résultats des immunomarquages pour chaque cas sont disponibles en **Annexe**.

II. Etude des marqueurs de CSC (CD44 et CD24)

A. Résultats IHC

1. Expression de CD44

Le marquage par CD44 était très majoritairement membranaire, réparti soit de façon homogène sur toute la membrane cellulaire, notamment dans le cas des cellules anaplasiques, soit sur la partie basolatérale des cellules dans le cas de structures tubulaires et papillaires (Figures 90.A et B.). Dans de rares cas, un marquage cytoplasmique était observé dans les cellules tumorales présentant des anomalies majeures comme des caryomégalies (Figure 90.B.). Le marquage était dans ce cas considéré comme aspécifique et n'était pas pris en compte.

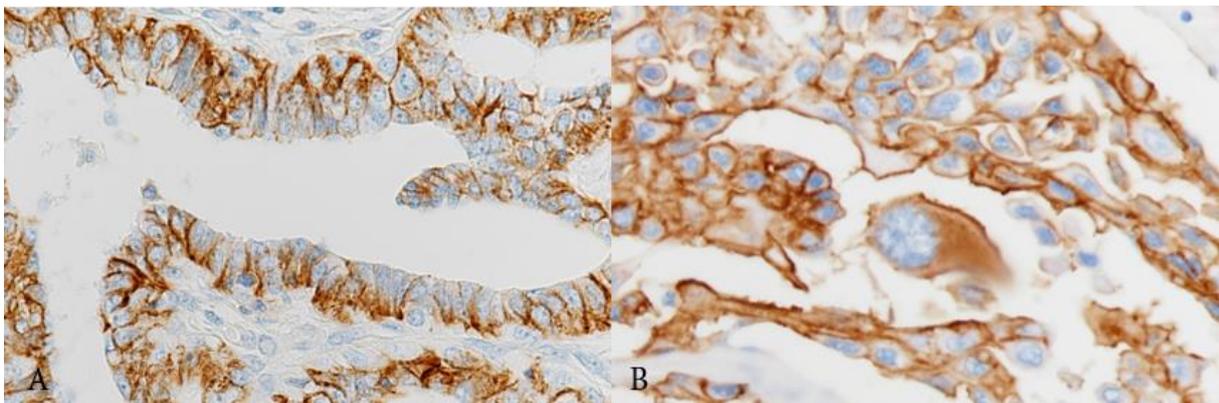


Figure 90. Tumeurs mammaires malignes, chien Exemples d'immunomarquage par CD44. A. Sur la partie basolatérale des cellules dans une structure tubulaire. **B.** Sur toute la membrane cellulaire dans des cellules anaplasiques. Marquage aspécifique cytoplasmique de CD44 sur une cellule néoplasique avec une caryomégalie majeure.

L'expression de CD44 (Tableau 21) était significativement associée à la composante tumorale ($p < 0.001$) avec une prédominance de marquage dans la composante luminale par rapport à la composante diffuse ($p = 0.045$) et à la composante myoépithéliale ($p < 0.001$). La composante diffuse était elle-même significativement plus souvent marquée que la composante myoépithéliale ($p = 0.010$).

CD44 était exprimé dans 75/96 tumeurs (78%). L'expression de CD44 n'était pas significativement associée au grade tumoral ($p = 0.071$), à la présence d'embolies ($p = 0.85$), au statut du NL ($p = 0.48$), aux récurrences tumorales ($p = 0.18$), ou aux métastases à distance ($p = 0.19$) mais était significativement associée au type histologique ($p = 0.040$) : les tumeurs solides exprimaient significativement moins souvent CD44 que les tumeurs tubulaires complexes ($p = 0.028$).

Le score de marquage de CD44 variait de 0 à 90 (le score maximum possible, où la quasi-totalité des cellules étaient marquées). Les tumeurs marquées présentaient un score médian de 43 (Premier quartile Q1 = 13 ; Dernier quartile Q3 = 55.5). Le score de marquage de CD44 n'était pas associé de façon significative au grade tumoral ($p = 0.19$), à la présence d'embolies ($p = 0.20$), au statut du NL ($p = 0.89$), aux récurrences tumorales ($p = 0.19$) ou aux métastases à distance ($p = 0.50$) mais était associé au type histologique ($p = 0.002$), avec un score de marquage significativement plus faible dans les tumeurs solides par rapport aux tumeurs tubulaires complexes ($p = 0.001$) et aux carcinomes anaplasiques ($p = 0.012$).

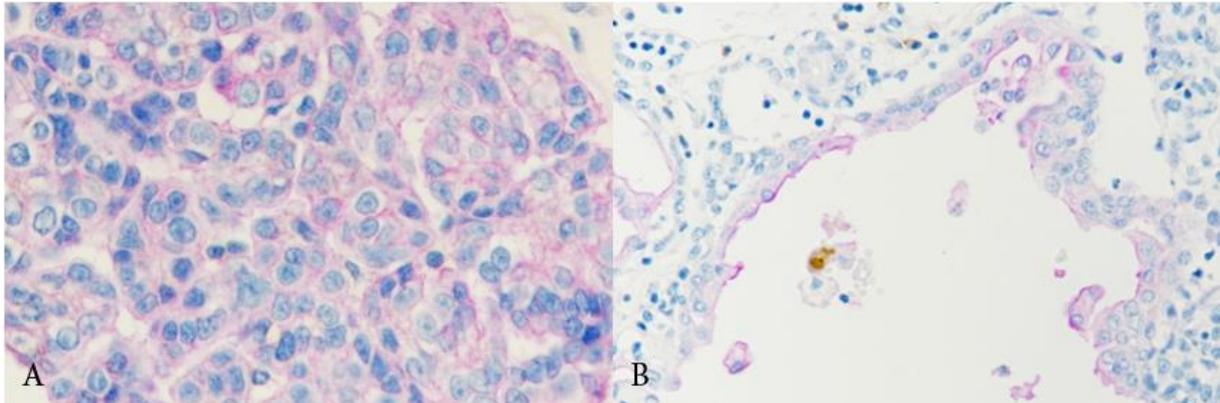
Dans l'ensemble, malgré l'expression prédominante de CD44 dans la composante luminale, CD44 n'était pas un facteur pronostic dans notre cohorte. En effet, son expression était associée avec des types histologiques à la fois de bon et de mauvais pronostic.

Paramètres clinicopathologiques		Expression de CD44	Score de marquage (/90)
Composante tumorale	Luminale (n=75)	60 (80.0) ^{M,D}	-
	Myoépithéliale (n=37)	12 (32.4) ^{L,D}	-
	Diffuse (n=68)	40 (58.8) ^{L,M}	-
	p-value	< 0.001	-
Grade	Grade 1 (n=30)	28 (93.3)	43.5 (28.0 ; 56.5)
	Grade 2 (n=19)	13 (68.4)	42.0 (9.0 ; 54.0)
	Grade 3 (n=34)	24 (70.6)	18.0 (6.5 ; 54.0)
	CMI (n=13) ^{REF}	10 (76.9)	51.5 (23.0 ; 60.0)
	p-value	0.071	0.19
Type histologique	Tubulaire simple (n=31)	24 (77.4)	43.5 (11.0 ; 55.0)
	Tubulaire complexe (n=17)	17 (100.0) [*]	54.0 (40.0 ; 60.0) [*]
	Solide (n=34)	23 (67.6)	15.0 (7.0 ; 43.0)
	Anaplasique (n=14) ^{REF}	11 (78.6)	58.0 (23.0 ; 63.0) [*]
	p-value	0.040	0.002
Emboles	Présence (n=29)	23 (79.3)	23.0 (8.0 ; 54.0)
	Absence (n=67)	52 (77.6)	45.5 (16.5 ; 56.0)
	p-value	0.85	0.20
Infiltration du nœud lymphatique	Présence (n=17)	12 (70.6)	34.0 (10.5 ; 60.5)
	Absence (n=32)	26 (81.3)	40.0 (9.0 ; 54.0)
	p-value	0.48	0.89
Récidive tumorale	Présence (n=13)	12 (92.3)	24.5 (5.0 ; 49.0)
	Absence (n=71)	52 (73.2)	41.0 (9.5 ; 56.0)
	p-value	0.18	0.19
Métastases à distance	Présence (n=24)	16 (66.7)	45.0 (9.0 ; 60.5)
	Absence (n=60)	48 (80.0)	35.5 (8.5 ; 54.0)
	p-value	0.19	0.50

Tableau 21. Expression et score de marquage de CD44 en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques. Pour la composante tumorale, les valeurs sont présentées en fréquence (pourcentage). ^L groupe significativement différent du groupe luminal; ^D groupe significativement différent du groupe diffus; ^M groupe significativement différent du groupe myoépithélial. Pour les paramètres clinicopathologiques, les valeurs sont présentées en médiane (Premier quartile ; Dernier quartile); ^{REF} Groupe de référence pour les comparaisons post-hoc. NA : non applicable; ^{*} Groupe significativement différent du groupe de référence.

2. Expression de CD24

Le marquage par CD24 était presque exclusivement cytoplasmique (Figure 91.A). Un marquage apical était parfois observé, notamment dans les structures luminales, mais était considéré comme aspécifique suite au marquage des sécrétions (Figure 91.B).



Figures 91. Tumeurs mammaires malignes, chien. Exemples d'immunomarquages par CD24. A. Carcinome solide, marquage CD24 cytoplasmique. **B.** Cellules tumorales luminales avec un marquage CD24 apical alors que les autres cellules néoplasiques ont un marquage cytoplasmique.

L'expression de CD24 (Tableau 22) était significativement associée à la composante tumorale ($p < 0.001$) : elle était plus fréquente dans les composantes luminales et diffuses que dans la composante myoépithéliale (respectivement $p < 0.001$ et $p = 0.003$). Il n'y avait par ailleurs pas de différence significative entre les composantes luminale et diffuse ($p = 0.88$).

CD24 était exprimé dans 52/96 tumeurs (54%). L'expression de CD24 était significativement associée à un grade tumoral élevé ($p = 0.019$), au type histologique ($p = 0.010$), et à la présence d'embolies ($p = 0.018$). Les tumeurs solides exprimaient significativement plus souvent CD24 que les tumeurs tubulaires simples ($p = 0.028$). CD24 était plus fréquemment exprimé dans les tumeurs présentant un NL infiltré mais sans atteindre une significativité statistique ($p = 0.069$). L'expression de CD24 n'était pas associée aux récurrences tumorales ($p = 0.50$) et aux métastases à distance ($p = 0.17$).

Le score de marquage de CD24 variait de 0 à 90, le score maximum possible. Les tumeurs marquées présentaient un score médian de 14.5 (Q1:7.75 ; Q3:24.75). Le nombre d'échantillons dans les sous-groupes étant souvent inférieur à 8, l'analyse statistique n'a pas pu être réalisée

pour le grade, le type histologique et les récurrences tumorales. Le niveau de marquage de CD24 n'était pas associé à l'infiltration du NL ($p=0.20$) et aux métastases à distance ($p=0.41$), mais un score de marquage élevé était associé à la présence d'embolies ($p=0.019$).

Dans l'ensemble, ces données indiquaient que CD24 était associé à des paramètres clinicopathologiques de mauvais pronostic.

Paramètres clinicopathologiques		Expression de CD24	Score de marquage (/90)
Composante tumorale	Luminale (n=75)	39 (52.0) ^M	-
	Myoépithéliale (n=37)	2 (5.6) ^{LD}	-
	Diffuse (n=68)	31 (45.6) ^M	-
	p-value	< 0.001	-
Grade	Grade 1 (n=30)	12 (40.0)	10.0 (7.0 ; 23.0)
	Grade 2 (n=19)	7 (36.8)	7.0 (2.0 ; 18.0)
	Grade 3 (n=34)	23 (67.6)	19.0 (8.0 ; 30.0)
	CMI (n=13) ^{REF}	10 (76.9)	13.5 (9.0 ; 32.0)
	p-value	0.019	NA (n<8)
Type histologique	Tubulaire simple (n=31)	11 (35.5) [*]	22.0 (9.0 ; 27.0)
	Tubulaire complexe (n=17)	7 (41.2)	17.0 (9.0 ; 28.0)
	Solide (n=34)	23 (67.6)	11.0 (6.0 ; 24.0)
	Anaplasique (n=14) ^{REF}	11 (78.6)	15.0 (9.0 ; 30.0)
	p-value	0.010	NA (n<8)
Embolies	Présence (n=29)	21 (72.4)	23.0 (9.0 ; 32.0)
	Absence (n=67)	31 (46.3)	11.0 (6.0 ; 22.0)
	p-value	0.018	0.019
Infiltration du nœud lymphatique	Présence (n=17)	11 (64.7)	14.0 (8.0 ; 30.0)
	Absence (n=32)	12 (37.5)	10.0 (4.5 ; 20.5)
	p-value	0.069	0.20
Récidive tumorale	Présence (n=13)	6 (46.2)	8.0 (7.0 ; 13.0)
	Absence (n=71)	40 (56.3)	17.0 (7.5 ; 25.5)
	p-value	0.50	NA (n<8)
Métastases à distance	Présence (n=24)	16 (66.7)	16.5 (8.5 ; 30.0)
	Absence (n=60)	30 (50.0)	13.0 (7.0 ; 24.0)
	p-value	0.17	0.41

Tableau 22. Expression et score de marquage de CD24 en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques. Pour la composante tumorale, les valeurs sont présentées en fréquence (pourcentage). ^L groupe significativement différent du groupe luminal; ^Dgroupe significativement différent du groupe diffus; ^M groupe significativement différent du groupe myoépithélial. Pour les paramètres clinicopathologiques, les valeurs sont présentées en médiane (Premier quartile; Dernier quartile); ^{REF} Groupe de référence pour les comparaisons post-hoc. NA : non applicable; ^{*} Groupe significativement différent du groupe de référence.

3. Expression de CD44⁺/CD24⁻

L'expression du phénotype CD44⁺/CD24⁻ (Tableau 23) était associée de façon significative à la composante tumorale (p=0.002) avec une prédominance de la composante luminale par rapport à la composante myoépithéliale (p=0.001).

L'expression du phénotype CD44⁺/CD24⁻ (Figure 92) était observée dans 63/96 tumeurs (65.6%). Le phénotype CD44⁺/CD24⁻ n'était pas associé à la présence d'emboles (p=0.059), au statut du NL (p=0.12), ou aux récurrences tumorales (p=0.54) mais était associé à l'absence de métastases à distance (p=0.002) et au type histologique (p=0.014). Les tumeurs solides étaient significativement moins souvent marquées que les tumeurs tubulaires complexes (p=0.006).

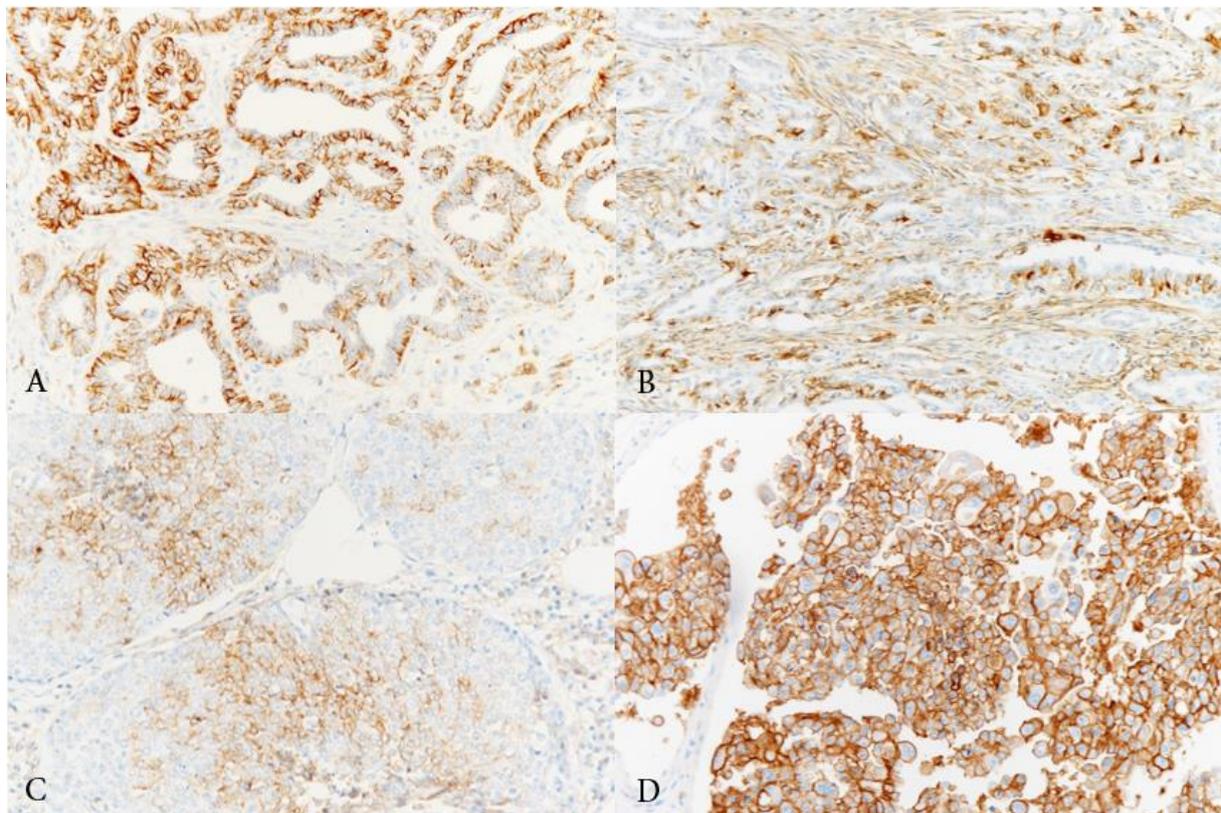


Figure 92. Tumeurs mammaires malignes, chien. Immunohistochimie pour CD44/CD24. Exemples d'immunomarquages avec le phénotype CD44⁺/CD24⁻. CD44 marque en marron, CD24 marque en violet. A. Carcinome tubulaire simple. Cellules luminales présentant un phénotype CD44⁺/CD24⁻. B. Carcinome tubulaire complexe. Cellules myoépithéliales présentant un phénotype CD44⁺/CD24⁻. C. Carcinome solide. Cellules en plages solides présentant un phénotype CD44⁺/CD24⁻. D. Carcinome anaplasique. Cellules anaplasiques présentant un phénotype CD44⁺/CD24⁻.

La proportion de cellules marquées par CD44⁺/CD24⁻ variait de 0 à 30 (score maximum possible). Dans les tumeurs marquées, le proportion de cellules marquées médiane était de 20 (Q1:8,5 ; Q3:27). Les analyses statistiques de la relation entre la proportion de cellules présentant le phénotype CD44⁺/CD24⁻ et le grade ainsi que les récurrences tumorales n'ont pas pu être réalisées à cause d'un nombre limité d'échantillons tumoraux dans un sous-groupe (n<8). Les niveaux d'expression de CD44⁺/CD24⁻ étaient associés au type histologique (p=0.005). La proportion de cellules présentant un phénotype CD44⁺/CD24⁻ était significativement plus faible dans les tumeurs solides que dans les tumeurs tubulaires complexes (p=0.001). La proportion de cellules présentant le phénotype CD44⁺/CD24⁻ n'était pas associée à la présence d'embolies (p=0.25), au statut du NL (p=0.73) et aux métastases à distances (p=0.35). Dans l'ensemble, ces données indiquaient que CD44⁺/CD24⁻ était associé à des facteurs clinicopathologiques de bon pronostic.

Paramètres clinicopathologiques		Expression du phénotype CD44 ⁺ /CD24 ⁻	Proportion de cellules marquées (/30)
Composante tumorale	Luminale (n=75)	49 (65.3) ^M	-
	Myoépithéliale (n=37)	12 (32.4) ^L	-
	Diffuse (n=68)	31 (45.6)	-
	p-value	0.002	-
Grade	Grade 1 (n=30)	26 (86.7) [*]	25.5 (16.0 ; 28.0)
	Grade 2 (n=19)	13 (68.4)	12.0 (6.0 ; 27.0)
	Grade 3 (n=34)	18 (52.9)	13.0 (7.0 ; 21.0)
	CMI (n=13) ^{REF}	6 (46.2)	24.0 (11.0 ; 30.0)
	p-value	0.011	NA (n<8)
Type histologique	Tubulaire simple (n=31)	20 (64.5)	25.0 (10.0 ; 27.0)
	Tubulaire complexe (n=17)	16 (94.1) [*]	27.0 (18.0 ; 29.5) [*]
	Solide (n=34)	17 (50.0)	9.0 (6.0 ; 17.0)
	Anaplasique (n=14) ^{REF}	10 (71.4)	20.0 (11.0 ; 29.0)
	p-value	0.014	0.005
Emboles	Présence (n=29)	15 (51.7)	12.0 (5.0 ; 27.0)
	Absence (n=67)	48 (71.6)	22.5 (10.0 ; 27.0)
	p-value	0.059	0.25
Infiltration du nœud lymphatique	Présence (n=17)	9 (52.9)	19.0 (11.0 ; 26.0)
	Absence (n=32)	24 (75.0)	22.0 (7.5 ; 28.0)
	p-value	0.12	0.73
Récidive tumorale	Présence (n=13)	7 (53.8)	24.0 (16.0 ; 27.0)
	Absence (n=71)	46 (64.8)	16.5 (6.0 ; 28.0)
	p-value	0.54	NA (n<8)
Métastases à distance	Présence (n=24)	9 (37.5)	24.0 (15.0 ; 27.0)
	Absence (n=60)	44 (73.3)	16.5 (7.5 ; 26.5)
	p-value	0.002	0.35

Tableau 23. Expression et proportion de cellules marquées par le phénotype CD44⁺/CD24⁻ en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques. Pour la composante tumorale, les valeurs sont présentées en fréquence (pourcentage). ^L groupe significativement différent du groupe luminal ; ^D groupe significativement différent du groupe diffus ; ^M groupe significativement différent du groupe myoépithélial. Pour les paramètres clinicopathologiques, les valeurs sont présentées en médiane (Premier quartile ; Dernier quartile) ; ^{REF} Groupe de référence pour les comparaisons post-hoc. NA : non applicable ; * Groupe significativement différent du groupe de référence.

4. Expression de CD44⁺/CD24⁺

L'expression du phénotype CD44⁺/CD24⁺ (Tableau 24) était associée à la composante tumorale ($p=0.023$). Ce phénotype était observé dans les mêmes proportions dans les composantes diffuses et luminales mais était significativement moins souvent exprimé dans la composante myoépithéliale (respectivement $p=0.020$ et $p=0.022$).

Le phénotype CD44⁺/CD24⁺ (Figure 93) était exprimé dans 39/96 tumeurs (40.6%). CD44⁺/CD24⁺ n'était pas associé avec le type histologique ($p=0.30$) ou les récurrences tumorales ($p=0.87$) mais était associé à un grade élevé ($p=0.008$), à la présence d'embolies ($p=0.001$), l'infiltration des NL ($p=0.027$) et les métastases à distance ($p=0.035$).

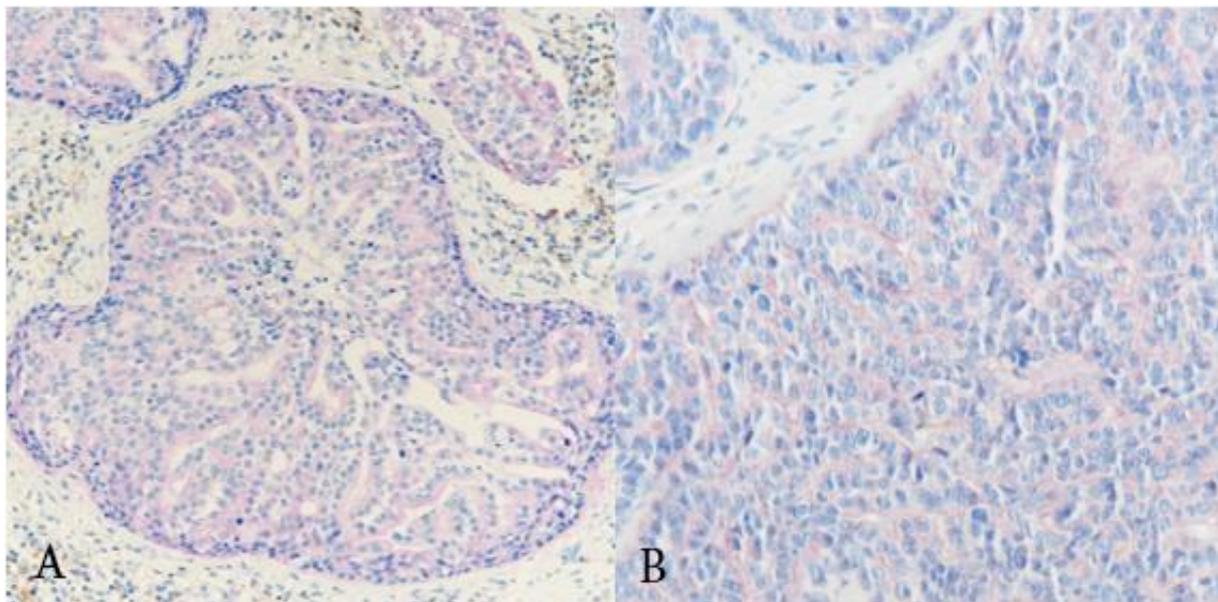


Figure 93. Tumeurs mammaires malignes, chien. Immunohistochimie pour CD44/CD24. Exemples d'immunomarquages avec le phénotype CD44⁺/CD24⁺. CD44 marque en marron, CD24 en violet. A et B. Carcinomes solides, cellules présentant un phénotype CD44⁺/CD24⁺.

La proportion de cellules présentant le phénotype CD44⁺/CD24⁺ variait de 0 à 30 (le score maximum possible). Dans les tumeurs marquées, ce phénotype avait un score médian de 6 (Q1:3; Q3:13). L'analyse statistique n'a pas pu être réalisée pour la corrélation entre les niveaux d'expression de CD44⁺/CD24⁺ et le grade, le type histologique, ou les récurrences tumorales à cause d'un nombre limité d'échantillons tumoraux ($n<8$). Les niveaux d'expression de CD44⁺/CD24⁺ n'étaient pas associés aux métastases à distance ($p=0.56$), mais étaient associés

à la présence d'emboles (p=0.021). Dans l'ensemble, ces données indiquaient que le phénotype CD44⁺/CD24⁺ était associé à des paramètres clinicopathologiques défavorables, mais sans valeur ajoutée en comparant avec CD24⁺ seul.

Paramètres clinicopathologiques		Expression du phénotype CD44 ⁺ /CD24 ⁺	Proportion de cellules marquées (/30)
Composante tumorale	Luminale (n=75)	25 (33.8) ^M	-
	Myoépithéliale (n=37)	1 (2.7) ^{LD}	-
	Diffuse (n=68)	24 (35.3) ^M	-
	p-value	0.023	-
Grade	Grade 1 (n=30)	9 (30.0)	7.0 (3.0 ; 14.0)
	Grade 2 (n=19)	3 (15.8)	1.0 (1.0 ; 5.0)
	Grade 3 (n=34)	19 (55.9)	6.0 (4.0 ; 24.0)
	CMI (n=13) ^{REF}	8 (61.5)	8.5 (4.0 ; 10.0)
	p-value	0.008	NA (n<8)
Type histologique	Tubulaire simple (n=31)	9 (29.0)	7.0 (5.0 ; 9.0)
	Tubulaire complexe (n=17)	6 (35.3)	5.0 (2.0 ; 18.0)
	Solide (n=34)	17 (50.0)	6.0 (5.0 ; 12.0)
	Anaplasique (n=14) ^{REF}	7 (50.0)	8.0 (2.0 ; 17.0)
	p-value	0.30	NA (n<8)
Emboles	Présence (n=29)	19 (65.5)	9.0 (6.0 ; 24.0)
	Absence (n=67)	20 (29.9)	5.0 (2.0 ; 8.0)
	p-value	0.001	0.021
Infiltration du nœud lymphatique	Présence (n=17)	9 (52.9)	6.0 (6.0 ; 8.0)
	Absence (n=32)	7 (21.9)	7.0 (5.0 ; 18.0)
	p-value	0.027	NA (n<8)
Récidive tumorale	Présence (n=13)	5 (38.5)	6.0 (6.0 ; 6.0)
	Absence (n=71)	29 (40.8)	7.0 (3.0 ; 18.0)
	p-value	0.87	NA (n<8)
Métastases à distance	Présence (n=24)	14 (58.3)	6.0 (2.0 ; 17.0)
	Absence (n=60)	20 (33.3)	7.0 (4.5 ; 16.0)
	p-value	0.035	0.56

Tableau 24. Expression et proportion de cellules marquées par le phénotype CD44⁺/CD24⁺ en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques. Pour la composante tumorale, les valeurs sont présentées en fréquence (pourcentage). ^L groupe significativement différent du groupe luminal ; ^D groupe significativement différent du groupe diffus ; ^M groupe significativement différent du groupe myoépithélial. Pour les paramètres clinicopathologiques, les valeurs sont présentées en médiane (Premier quartile ; Dernier quartile) ; ^{REF} Groupe de référence pour les comparaisons post-hoc. NA : non applicable ; * Groupe significativement différent du groupe de référence

5. Expression de CD44⁺/CD24⁺ et CD44⁺/CD24⁻

Le phénotype CD44⁺/CD24⁺ (Figure 94) était exprimé dans 39/96 tumeurs (40.6%) et le phénotype CD44⁺/CD24⁻ dans 74/96 tumeurs (77.1%). L'expression des phénotypes CD44⁺/CD24⁺ ou CD44⁺/CD24⁻ n'était pas associée au grade (respectivement p=0.10 et p=0.59), le type histologique (respectivement p=0.24 et p=0.31), les emboles (respectivement p=0.15 et p=0.47), le statut du NL (p=0.185 et p=0.244), les récurrences tumorales (p=0.95 et p=0.72) et les métastases à distance (p=0.44 et p=0.93).

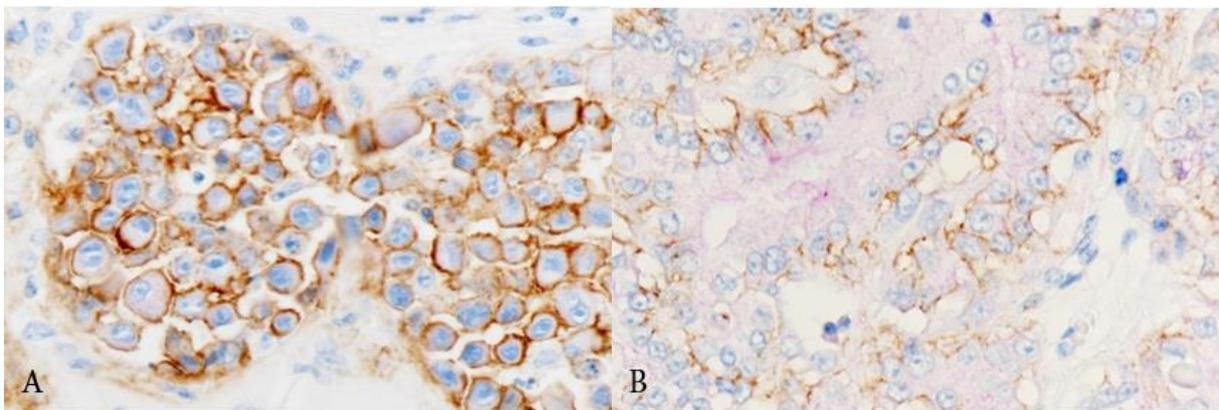


Figure 94. Tumeurs mammaires malignes, chien. Immunohistochimie pour CD44/CD24. Exemples d'immunomarquages avec le phénotype CD44⁺/CD24⁺. CD44 marque en marron, CD24 marque en violet. A. Carcinome anaplasique. Cellules anaplasiques présentant un phénotype CD44⁺/CD24⁺. B. Carcinome solide. Cellules myoépithéliales présentant un phénotype CD44⁺/CD24⁺.

B. Mise en relation des données IHC et de la survie

Les données de suivi étaient disponibles pour 84 cas sur 96 (87,5%). Ces 84 cas étaient composés de 26 tumeurs de grade I (31%), 19 tumeurs de grade II (22,5%), 31 tumeurs de grade III (37%) et 8 CMI (9,5%). Pendant la période de suivi, 13 animaux ont présenté une récurrence et 25 sont morts ou ont été euthanasiés à cause d'une maladie métastatique et/ou d'une récurrence locale. Les animaux morts pour des raisons non liées au cancer ou qui étaient encore vivants à l'issue des deux ans de suivi ont été censurés car l'événement « mort liée au cancer » n'était pas survenu. Le temps de survie sans progression moyen était de 380 jours et le temps de survie globale médian était de 417 jours. La survie était comparée en présence ou absence d'un

marqueur/phénotype particulier. Dans cette cohorte, le phénotype CD44⁺/CD24⁻ était significativement associé à une meilleure survie (p=0.003) (Figure 95). Les autres marqueurs et phénotypes n'étaient pas liés au pronostic, même si le phénotype CD44⁻/CD24⁺ tendait à être associé à une moins bonne survie (p=0.077) (Figure 96). Des résultats similaires étaient obtenus après ajustement par l'âge avec un hasard-ratio ajusté par l'âge (Intervalle de confiance de 95%) de 0.30 (0.13 ; 0.71) pour CD44⁺/CD24⁻ (p=0.006).

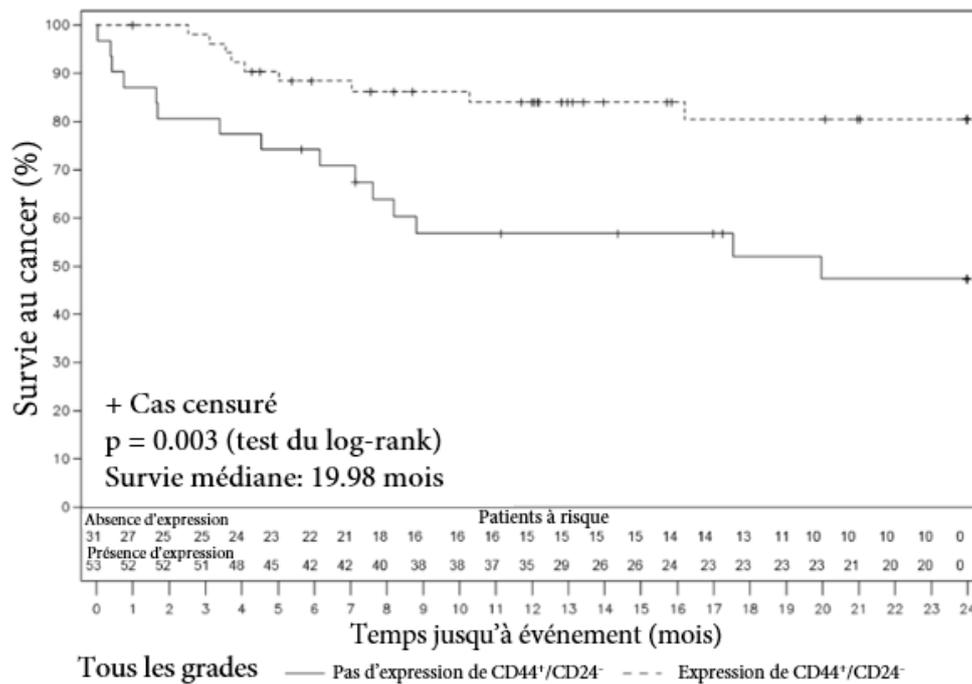
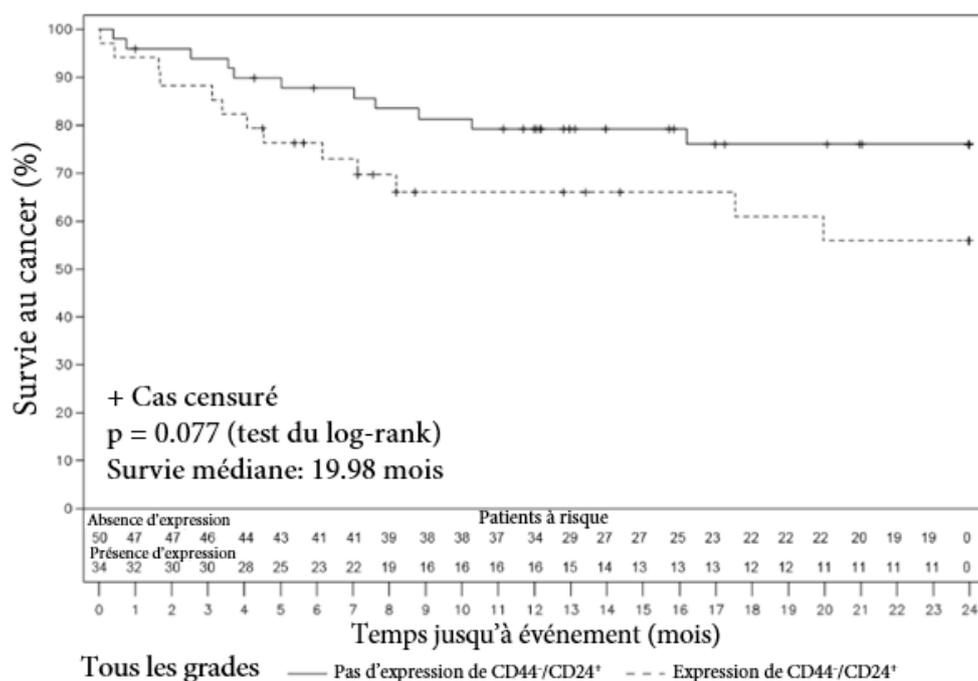


Figure 95. Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des 86 chiennes au cours du temps, en fonction du phénotype CD44⁺/CD24⁻. Les nombres sous l'axe des X correspondent au nombre de chiennes vivantes à un temps t, en fonction du phénotype du CD44⁺/CD24⁻.



Figures 96. Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des 86 chiennes au cours du temps, en fonction du phénotype CD44⁻/CD24⁺. Les nombres sous l'axe des X correspondent au nombre de chiennes vivantes à un temps t, en fonction du phénotype CD44⁻/CD24⁺.

La cohorte a ensuite été divisée en 2 groupes d'agressivité différente en se basant sur le grade tumoral, dans le but de vérifier si CD44 et CD24 seuls ou en combinaison pouvaient avoir une valeur pronostique supplémentaire par rapport aux grades tumoraux. Le sous-groupe de « bon pronostic » était composé de 45 animaux, incluant toutes les tumeurs de grade I (26 ; 57.8%) et les tumeurs de grade II (19 ; 42.2%). Pendant la période de suivi, seul un animal est mort de raisons liées au cancer. Le sous-groupe de « mauvais pronostic » était composé de 39 animaux, incluant toutes les tumeurs de grade III (31 ; 79,5%) et les CMI (8 ; 20,5%). Pendant la période de suivi, 23 de ces animaux sont morts de raisons liées au cancer. Dans ce sous-groupe, la durée de survie sans progression médiane était de 249 jours et le temps de survie médian était de 268 jours. Aucun marqueur ou phénotype n'a pu être relié à la survie. Les animaux qui présentaient un phénotype CD44⁺/CD24⁻ montraient une tendance à une meilleure survie sans atteindre une significativité statistique (p=0.15) (Figure 97). Le phénotype CD44⁻/CD24⁺ n'était pas associé du tout à la survie (p=0.91) (Figure 98). Aucun lien significatif n'a pu être établi entre les scores et la survie pour l'un ou l'autre des phénotypes ou marqueurs.

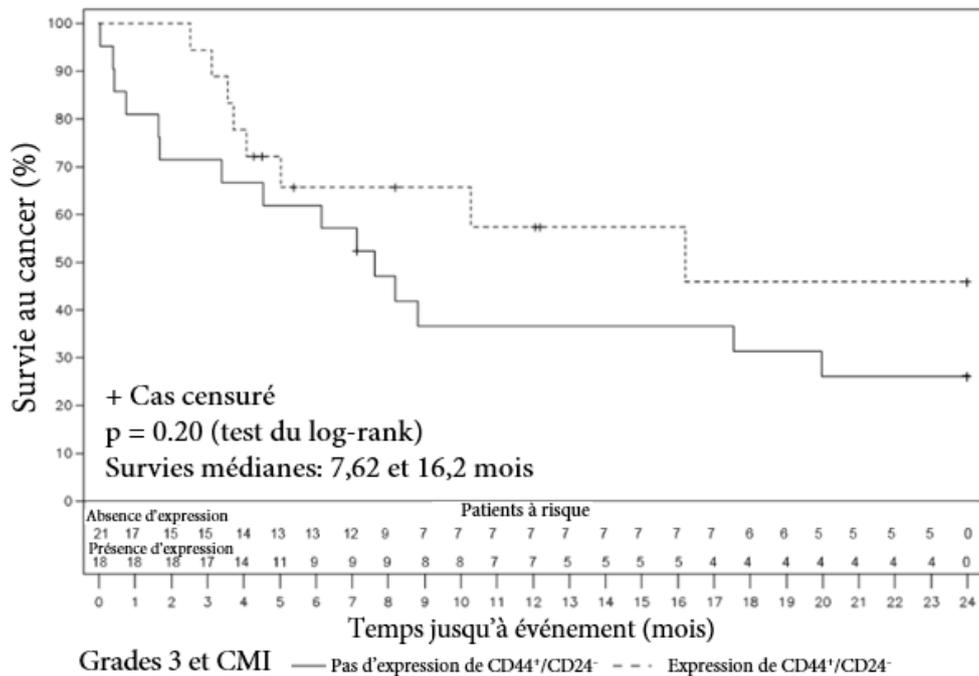


Figure 97. Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des 39 chiennes faisant partie du groupe de mauvais pronostic (grades 3 et CMI) au cours du temps, en fonction du phénotype CD44⁺/CD24⁻. Les nombres sous l'axe des X correspondent au nombre de chiennes vivantes à un temps t, en fonction du phénotype CD44⁺/CD24⁻.

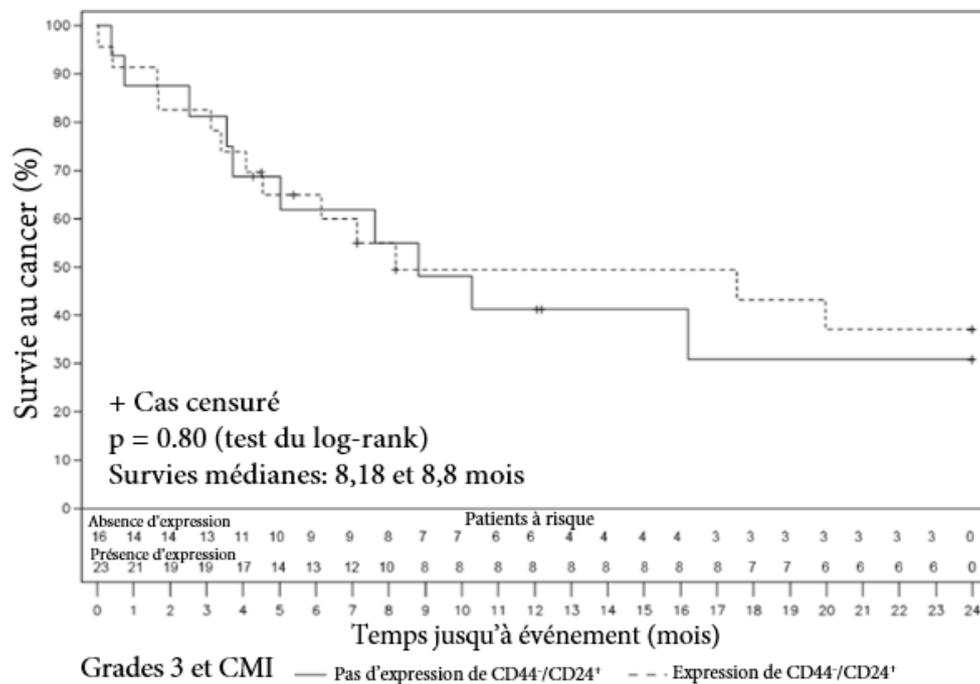


Figure 98. Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des 39 chiennes faisant partie du groupe de mauvais pronostic (grades 3 et CMI) au cours du temps, en fonction du phénotype CD44⁻/CD24⁺. Les nombres sous l'axe des X correspondent au nombre de chiennes vivantes à un temps t, en fonction du phénotype CD44⁻/CD24⁺.

Ces résultats font l'objet d'un article accepté dans le journal Veterinary Pathology :

CD44 and CD24 expression and prognostic significance in canine mammary tumors

Authors

Bernadette ROGEZ, Quentin PASCAL, Audrey BOBILLIER, François MACHURON, Chann LAGADEC, Dominique TIERNY, Xuefen LE BOURHIS*, Valérie CHOPIN*.

1 - University of Lille, building SN3, INSERM U908 "Cell plasticity and Cancer", 59655 Villeneuve d'Ascq, France **(BR, CL, XLB, VC)**.

2 – OCR (Oncovet Clinical Research), Parc Eurasanté, Lille Métropole, 80 rue Docteur Yersin, 59120 Loos, France **(BR, QP, DT)**.

3 – VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon, 1 Avenue Bourgelat 69280 Marcy l'Etoile, France **(AB)**.

4 – University of Lille, CHU Lille, EA 2694 - Santé publique : épidémiologie et qualité des soins, F-59000 Lille, France **(FM)**.

5 - University of Picardie Jules Verne, UFR Sciences, 80 000 Amiens, France **(VC)**

*** Contributed equally to this work**

Corresponding author :

Xuefen LE BOURHIS

Address : University of Lille, building SN3, INSERM U908 "Cell plasticity and Cancer", 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Tél. 33.20.43.40.97

Fax. 33.20.43.40.38

Email : xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr

III. Etude de l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs

A. Résultats IHC

1. Expression du proNGF et du BDNF

Le proNGF et le BDNF (Figure 99) étaient exprimés majoritairement au niveau cytoplasmique. L'expression du proNGF (Tableau 25) était associée de façon significative à la composante tumorale ($p < 0.001$), avec une prédominance des composantes luminale et diffuse sur la composante myoépithéliale ($p < 0.001$ dans les deux cas). L'expression du BDNF (Tableau 26) était également associée à la composante tumorale ($p = 0.025$), avec une prédominance de la composante luminale sur la composante myoépithéliale ($p = 0.02$). Les deux marqueurs étaient moins souvent exprimés dans la composante myoépithéliale.

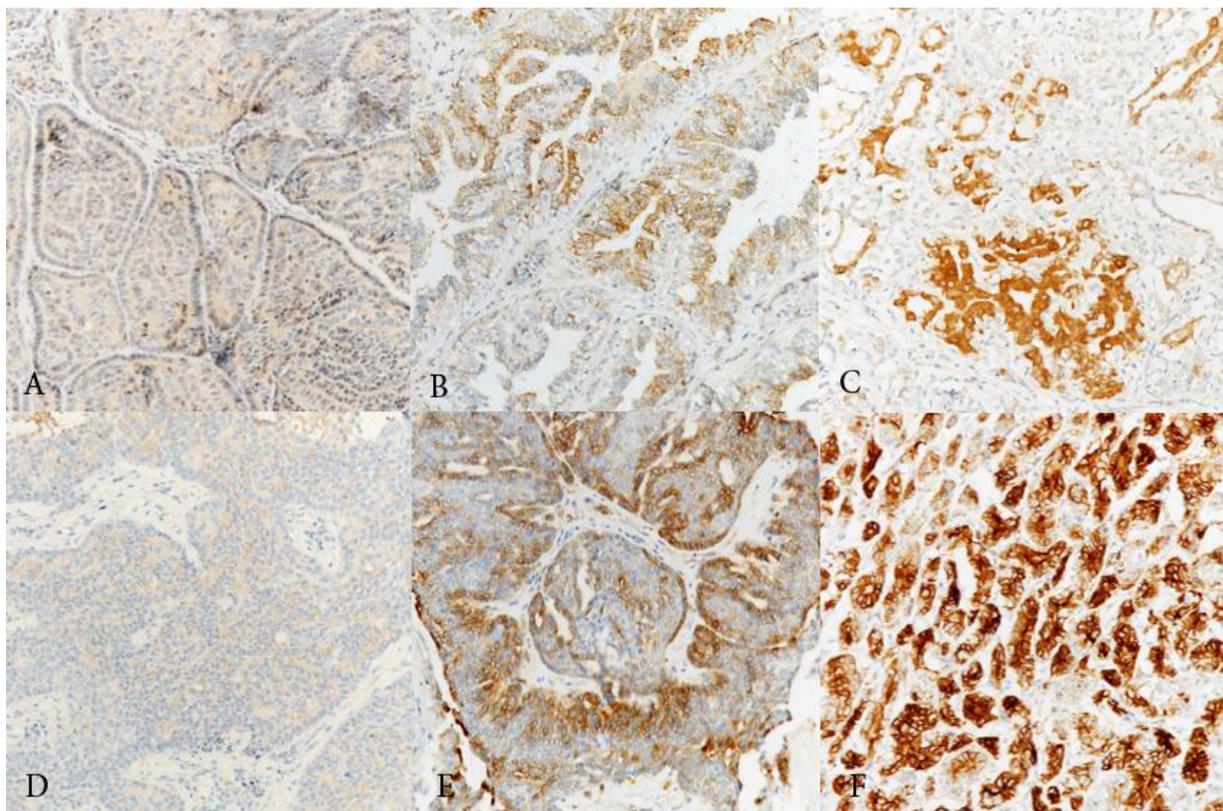


Figure 99 Tumeurs mammaires malignes, chien. Exemples d'immunomarquages par le proNGF (A à C) ou le BDNF (D à F). A. Faible marquage par le proNGF dans un carcinome solide de grade 3. B. Marquage modéré et localisé par le proNGF dans un carcinome tubulaire de grade 1. C. Marquage intense par le proNGF dans un carcinome tubulaire simple de grade 2. D. Faible marquage par le BDNF dans un carcinome solide de grade 3. E. Marquage modéré de type myoépithélial dans un carcinome solide de grade 3. F. Marquage BDNF intense et généralisé dans un carcinome tubulaire de grade 1.

Le proNGF était exprimé dans 71/96 tumeurs (74%) et le BDNF dans 79/96 tumeurs (82%). L'expression du proNGF ou du BDNF n'était pas associée à des paramètres clinicopathologiques, que ce soit le grade ($p=0.40$ et $p=0.85$ respectivement), le type histologique ($p=0.68$ et $p=0.93$ respectivement), la présence d'embolies ($p=0.46$ et $p=0.28$), le statut du NL ($p=0.60$ pour le proNGF), la récurrence tumorale ($p=1.00$ et $p=0.45$ et $p=1$ respectivement), et les métastases à distance ($p=0.74$ et $p=0.75$ respectivement). L'analyse statistique relative au statut du NL n'a pas pu être réalisée pour le BDNF à cause d'un nombre insuffisant de tumeurs non marquées ($n<8$).

Le score de marquage pour le proNGF variait de 0 à 60 avec une médiane de 18 (Q1:10.5 ; Q3:28.5). Le score de marquage du BDNF variait de 0 à 90 (score maximum). Les tumeurs positives présentaient une médiane de 24 (Q1:14.0 ; Q3:19.0). Aucun lien n'a pu être établi entre le score de marquage et le grade ($n<8$ pour le proNGF, $p=0.79$ pour le BDNF), le type histologique ($p=0.21$ et $p=0.27$ respectivement), la présence d'embolies ($p=0.78$ et $p=0.34$), le statut des NL ($p=0.77$ et $p=0.99$), la récurrence tumorale ($p=0.063$ et $p=0.41$) ou les métastases à distances ($p=0.36$ et $p=0.056$).

Nos données indiquent que le proNGF et le BDNF ne sont pas associés à des paramètres clinicopathologiques de bon ou de mauvais pronostic, mais différents patterns de marquage ont pu être observés.

Paramètres clinicopathologiques		Expression du proNGF	Score de marquage (/90)
Composante tumorale	Luminale (n=75)	54 (72.0) ^M	-
	Myoépithéliale (n=37)	4 (10.8) ^{LD}	-
	Diffuse (n=68)	37 (54.4) ^M	-
	p-value	< 0.001	-
Grade	Grade 1 (n=30)	23 (76.7)	19.0 (12.0 ; 23.0)
	Grade 2 (n=19)	15 (78.9)	14.0 (6.0 ; 29.0)
	Grade 3 (n=34)	26 (76.5)	17.5 (7.0 ; 29.0)
	CMI (n=13) ^{REF}	7 (53.8)	21.0 (11.0 ; 33.0)
	p-value	0.40	NA (n<8)
Type histologique	Tubulaire simple (n=31)	24 (77.4)	14.5 (9.5 ; 23.0)
	Tubulaire complexe (n=17)	14 (82.4)	19.5 (12.0 ; 32.0)
	Solide (n=34)	23 (67.6)	20.0 (12.0 ; 30.0)
	Anaplasique (n=14) ^{REF}	10 (71.4)	11.0 (10.0 ; 24.0)
	p-value	0.68	0.27
Emboles	Présence (n=29)	20 (69.0)	23.5 (9.0 ; 30.5)
	Absence (n=67)	51 (76.1)	17.0 (10.0 ; 26.0)
	p-value	0.46	0.34
Infiltration du nœud lymphatique	Présence (n=17)	11 (64.7)	20.0 (6.0 ; 39.0)
	Absence (n=32)	23 (71.9)	20.0 (13.0 ; 29.0)
	p-value	0.60	0.77
Récidive tumorale	Présence (n=13)	10 (76.9)	12.5 (3.0 ; 20.0)
	Absence (n=71)	55 (77.5)	19.0 (11.0 ; 29.0)
	p-value	1.00	0.063
Métastases à distance	Présence (n=24)	18 (75.0)	13.0 (7.0 ; 30.0)
	Absence (n=60)	47 (78.3)	19.0 (13.0 ; 28.0)
	p-value	0.74	0.36

Tableau 25. Expression et score de marquage par le proNGF en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques. Pour la composante tumorale, les valeurs sont présentées en fréquence (pourcentage). ^L groupe significativement différent du groupe luminal ; ^D groupe significativement différent du groupe diffus ; ^M groupe significativement différent du groupe myoépithélial. Pour les paramètres clinicopathologiques, les valeurs sont présentées en médiane (Premier quartile ; Dernier quartile) ; ^{REF} Groupe de référence pour les comparaisons post-hoc. NA : non applicable ; * Groupe significativement différent du groupe de référence.

Paramètres clinicopathologiques		Expression de BDNF	Score de marquage (/90)
Composante tumorale	Luminale (n=75)	58 (77.3) ^M	-
	Myoépithéliale (n=37)	19 (51.4) ^L	-
	Diffuse (n=68)	48 (70.6)	-
	p-value	0.025	-
Grade	Grade 1 (n=30)	24 (80.0)	33.0 (12.5 ; 47.0)
	Grade 2 (n=19)	17 (89.5)	25.0 (17.0 ; 42.0)
	Grade 3 (n=34)	27 (79.4)	23.0 (15.0 ; 35.0)
	CMI (n=13) ^{REF}	11 (84.6)	18.0 (12.0 ; 34.0)
p-value	0.85	0.79	
Type histologique	Tubulaire simple (n=31)	26 (83.9)	25.5 (15.0 ; 45.0)
	Tubulaire complexe (n=17)	13 (76.5)	13.0 (8.0 ; 32.0)
	Solide (n=34)	28 (82.4)	28.0 (17.5 ; 35.5)
	Anaplasique (n=14) ^{REF}	12 (85.7)	20.5 (9.5 ; 44.0)
p-value	0.93	0.21	
Emboles	Présence (n=29)	22 (75.9)	25.0 (15.0 ; 41.0)
	Absence (n=67)	57 (85.1)	24.0 (13.0 ; 38.0)
	p-value	0.28	0.78
Infiltration du nœud lymphatique	Présence (n=17)	14 (82.4)	22.5 (12.0 ; 49.0)
	Absence (n=32)	28 (87.5)	21.0 (14.0 ; 40.5)
	p-value	NA (n<8)	0.99
Récidive tumorale	Présence (n=13)	12 (92.3)	26.5 (14.5 ; 39.0)
	Absence (n=71)	57 (80.3)	27.0 (16.0 ; 45.0)
	p-value	0.45	0.41
Métastases à distance	Présence (n=24)	19 (79.2)	18.0 (14.0 ; 34.0)
	Absence (n=60)	50 (83.3)	31.5 (17.0 ; 45.0)
	p-value	0.75	0.056

Tableau 26. Expression et score de marquage par le BDNF en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques. Pour la composante tumorale, les valeurs sont présentées en fréquence (pourcentage). ^L groupe significativement différent du groupe luminal; ^M groupe significativement différent du groupe myoépithélial. Pour les paramètres clinicopathologiques, les valeurs sont présentées en médiane (Premier quartile ; Dernier quartile); ^{REF} Groupe de référence pour les comparaisons post-hoc. NA : non applicable; *Groupe significativement différent du groupe de référence.

2. Expression de TrkA

L'expression de TrkA était majoritairement cytoplasmique. TrkA était exprimé dans 98% des tumeurs (96/98 ; Tableau 27). Aucune analyse statistique n'a pu être réalisée concernant son expression dans les différentes composantes tumorales ou selon les paramètres clinicopathologiques à cause de sa très forte prévalence. Le score de marquage de TrkA variait de 0 à 90 (score maximum). Les tumeurs positives présentaient une médiane de 42 (Q1:30.0 ; Q3:57.0). Aucune relation n'a été mise en évidence entre le score de marquage de TrkA et le grade ($p=0.26$), la présence d'emboles ($p=0.51$), l'infiltration des NL ($p=0.35$), les récurrences tumorales ($p=0.71$), et les métastases à distance ($p=0.33$). Le score de marquage de TrkA était par contre associé au type histologique ($p=0.046$). Cependant, aucune association n'a été mise en évidence dans les comparaisons 2 à 2, même en comparant les sous-groupes les plus différents, les tumeurs tubulaires simples et les tumeurs anaplasiques ($p=0.078$).

Globalement, nos données indiquent que TrkA n'est pas un marqueur pronostic, mais différents patterns de marquage ont pu être observés (Figure 100).

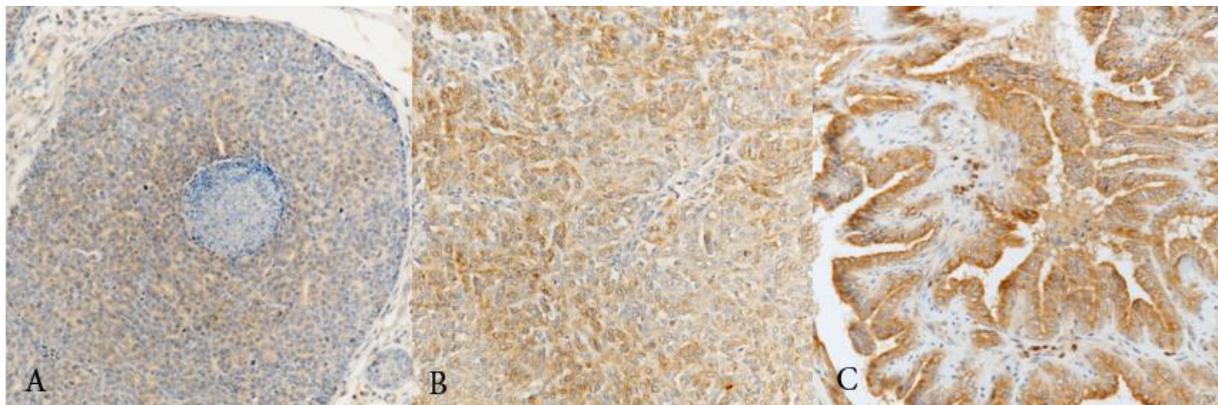


Figure 100. Tumeurs mammaires malignes, chien. Exemples d'immunomarquages par TrkA. A. Carcinome solide, cellules en plages solides présentant un faible marquage TrkA. **B.** Carcinome solide, cellules en plages solides présentant un marquage TrkA modéré. **C.** Carcinome tubulaire simple, cellules luminales présentant un fort marquage TrkA.

Paramètres clinicopathologiques	Expression de TrkA	Score de marquage (/90)	
Composante tumorale	Luminale (n=75)	71 (94.7)	-
	Myoépithéliale (n=37)	18 (48.6)	-
	Diffuse (n=68)	68 (100)	-
	p-value	NA (n<8)	-
Grade	Grade 1 (n=30)	29 (96.7)	42.0 (33.0 ; 54.0)
	Grade 2 (n=19)	18 (94.7)	48.0 (39.0 ; 60.0)
	Grade 3 (n=34)	34 (100.0)	44.5 (30.0 ; 60.0)
	CMI (n=13) ^{REF}	13 (100.0)	33.0 (30.0 ; 48.0)
	p-value	NA (n<8)	0.26
Type histologique	Tubulaire simple (n=31)	29 (93.5)	54.0 (39.0 ; 60.0)
	Tubulaire complexe (n=17)	17 (100.0)	42.0 (30.0 ; 51.0)
	Solide (n=34)	34 (100.0)	42.0 (30.0 ; 51.0)
	Anaplasique (n=14) ^{REF}	14 (100.0)	35.5 (27.0 ; 57.0)
	p-value	NA (n<8)	0.046
Emboles	Présence (n=29)	29 (100)	42.0 (30.0 ; 51.0)
	Absence (n=67)	65 (97.0)	42.0 (30.0 ; 57.0)
	p-value	NA (n<8)	0.51
Infiltration du nœud lymphatique	Présence (n=17)	17 (100.0)	45.0 (33.0 ; 60.0)
	Absence (n=32)	31 (96.9)	39.0 (30.0 ; 57.0)
	p-value	NA (n<8)	0.35
Récidive tumorale	Présence (n=13)	13 (100.0)	43.0 (36.0 ; 45.0)
	Absence (n=71)	69 (97.2)	44.0 (30.0 ; 60.0)
	p-value	NA (n<8)	0.71
Métastases à distance	Présence (n=24)	24 (100.0)	41.5 (30.0 ; 57.0)
	Absence (n=60)	58 (96.7)	44.5 (33.0 ; 60.0)
	p-value	NA (n<8)	0.33

Tableau 27. Expression et score de marquage par TrkA en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques. Pour la composante tumorale, les valeurs sont présentées en fréquence (pourcentage). Pour les paramètres clinicopathologiques, les valeurs sont présentées en médiane (Premier quartile ; Dernier quartile) ; ^{REF} Groupe de référence pour les comparaisons post-hoc. NA : non applicable.

3. Expression de TrkB

L'expression de TrkB était presque exclusivement cytoplasmique. Un marquage aspécifique a été observé dans 9 tumeurs sur les 96 marquées : 2 d'entre elles présentaient un signal aspécifique étendu (une tumeur de grade 3 et un CMI), 2 présentaient un signal aspécifique modéré (une tumeur de grade 1 et un CMI) et 5 présentaient un signal aspécifique minime qui n'affectait pas l'interprétation du marquage. Le marquage aspécifique était plus fréquent au niveau des emboles.

L'expression de TrkB (Tableau 28) n'était pas significativement associée à la composante tumorale ($p=0.71$), et TrkB était exprimé indifféremment à la fois dans les composantes luminale, myoépithéliale ou diffuse.

TrkB était exprimé dans 35/96 tumeurs (36.5%). L'expression de TrkB était significativement associée à des tumeurs de bas grade ($p=0.004$), des types histologiques peu agressifs ($p=0.014$), des NL non infiltrés ($p=0.009$), l'absence de métastases à distance ($p=0.002$). Les tumeurs de grade I et de grade II étaient significativement moins souvent marquées que les CMI ($p=0.002$ et $p=0.031$ respectivement), et les tumeurs tubulaires complexes étaient significativement moins souvent marquées que les tumeurs anaplasiques ($p=0.027$). TrkB était plus souvent exprimé en absence d'emboles mais sans atteindre une différence significative ($p=0.099$), et n'était pas associé à la récurrence tumorale ($p=0.55$).

Le score de marquage de TrkB variait de 0 à 90 (score maximum). Les tumeurs positives présentaient un score médian de 11 (Q1:5.5; Q3:32.5). A cause d'un nombre insuffisant d'échantillons tumoraux dans différents sous-groupes, aucune analyse statistique n'a pu être réalisée sur les scores de marquage.

Collectivement, nos données indiquaient que TrkB était associé à des paramètres clinicopathologiques favorables. Comme pour les marqueurs précédents, différents patterns de marquage pouvaient être observés (Figure 101).

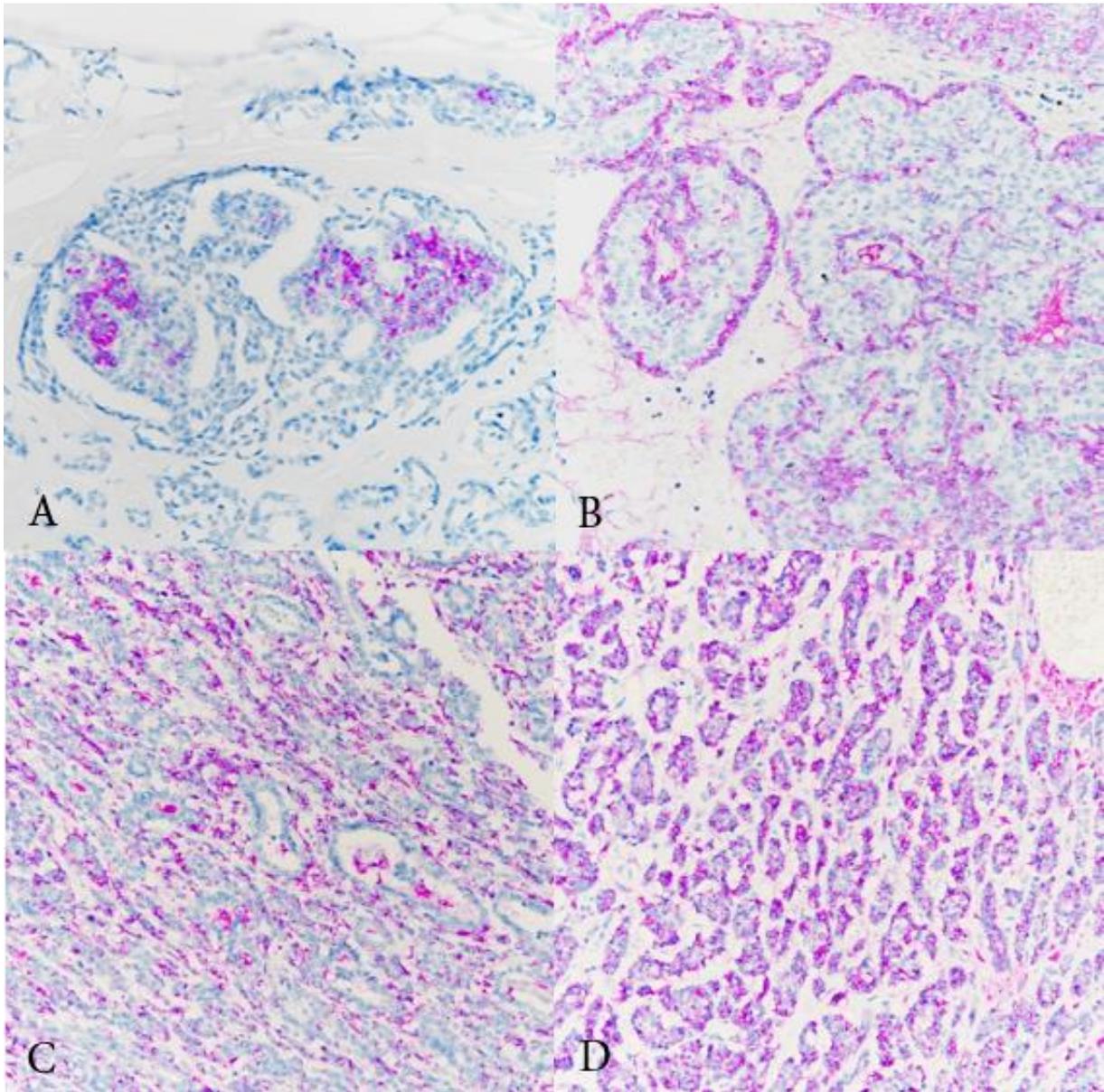


Figure 101. Tumeurs mammaires malignes, chien. Exemples d'immunomarquages par TrkB. A. Carcinome tubulaire, cellules luminales présentant un marquage par TrkB fort, restreint sur une petite zone de la tumeur (seul marquage sur la tumeur). **B.** Carcinome tubulaire, cellules myoépithéliales-like – localisées sur la couche externe des acini – présentant un fort marquage TrkB. **C.** Carcinome tubulaire, cellules myoépithéliales-like présentant un fort marquage TrkB. **D.** Carcinome tubulaire, cellules luminales présentant un fort marquage TrkB.

Paramètres clinicopathologiques	Expression de TrkB	Score de marquage (/90)	
Composante tumorale	Luminale (n=75)	21 (28.0)	-
	Myoépithéliale (n=37)	10 (27.0)	-
	Diffuse (n=68)	22 (32.4)	-
	p-value	0.71	-
Grade	Grade 1 (n=30)	16 (53.3)*	8.5 (4.5 ; 28.5)
	Grade 2 (n=19)	8 (42.1)*	20.5 (10.0 ; 53.0)
	Grade 3 (n=34)	11 (32.4)	16.0 (4.0 ; 32.0)
	CMI (n=13) ^{REF}	0 (0.0)	-
	p-value	0.004	NA (n<8)
Type histologique	Tubulaire simple (n=31)	8 (25.8)	22.5 (9.0 ; 67.5)
	Tubulaire complexe (n=17)	11 (64.7)*	6.0 (4.0 ; 34.0)
	Solide (n=34)	14 (41.2)	10.0 (4.0 ; 30.0)
	Anaplasique (n=14) ^{REF}	2 (14.3)	17.5 (16.0 ; 19.0)
	p-value	0.014	NA (n<8)
Emboles	Présence (n=29)	7 (24.1)	9.0 (4.0 ; 19.0)
	Absence (n=67)	28 (41.8)	11.5 (6.0 ; 38.0)
	p-value	0.099	NA (n<8)
Infiltration du nœud lymphatique	Présence (n=17)	3 (17.6)	19.0 (4.0 ; 33.0)
	Absence (n=32)	18 (56.3)	11.5 (7.0 ; 42.0)
	p-value	0.009	NA (n<8)
Récidive tumorale	Présence (n=13)	6 (46.2)	9.5 (7.0 ; 13.0)
	Absence (n=71)	26 (36.6)	15.5 (4.0 ; 42.0)
	p-value	0.55	NA (n<8)
Métastases à distance	Présence (n=24)	3 (12.5)	19.0 (7.0 ; 33.0)
	Absence (n=60)	29 (48.3)	12.0 (4.0 ; 34.0)
	p-value	0.002	NA (n<8)

Tableau 28. Expression et score de marquage par TrkB en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques. Pour la composante tumorale, les valeurs sont présentées en fréquence (pourcentage). Pour les paramètres clinicopathologiques, les valeurs sont présentées en médiane (Premier quartile ; Dernier quartile) ; ^{REF} Groupe de référence pour les comparaisons post-hoc. NA : non applicable ; * Groupe significativement différent du groupe de référence

4. Expression du récepteur commun aux neurotrophines : p75^{NTR}

P75^{NTR} présentait à la fois une localisation cytoplasmique et membranaire. L'expression de p75^{NTR} (Tableau 29) était fortement associée avec la composante tumorale ($p < 0.001$). La composante myoépithéliale était plus souvent marquée que les composantes luminale et diffuse ($p < 0.001$ dans les deux cas).

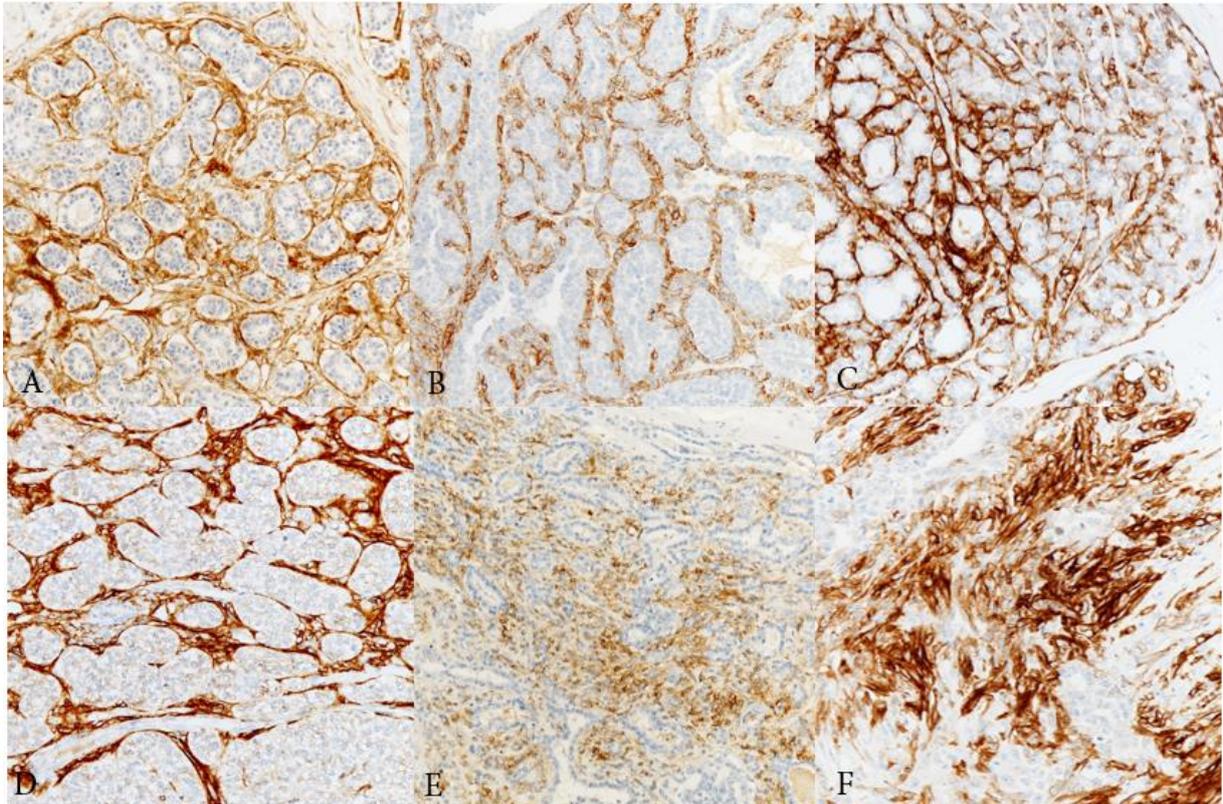


Figure 102. Tumeurs mammaires malignes, chien. Exemples d'immunomarquages par p75^{NTR} A. Tissu mammaire sain en marge d'une tumeur mammaire, marquage modéré p75^{NTR} localisé au niveau des cellules myoépithéliales physiologiques. B. Carcinome tubulaire simple, marquage p75^{NTR} modéré. C et D. Carcinomes solides, marquage p75^{NTR} fort localisé au niveau des cellules myoépithéliales. E. Carcinome tubulaire complexe, marquage p75^{NTR} modéré au niveau des cellules myoépithéliales-like. F. Carcinome tubulaire complexe, marquage p75^{NTR} fort au niveau des cellules myoépithéliales-like.

P75^{NTR} était exprimé dans 44/96 tumeurs (46%). L'expression de p75^{NTR} était significativement associée à des tumeurs de bas grade ($p = 0.008$), des types histologiques moins agressifs ($p = 0.003$), l'absence d'embolies ($p < 0.001$), un NL non infiltré ($p = 0.001$), et à l'absence de métastases à distance ($p = 0.004$). Les tumeurs de grade I et II étaient significativement moins souvent marquées que les CMI ($p = 0.043$ et $p = 0.002$ respectivement), et les tumeurs tubulaires

complexes étaient moins souvent marquées que les tumeurs solides ($p=0.047$) ou anaplasiques ($p=0.002$). L'expression de $p75^{NTR}$ n'était pas associée à la récurrence tumorale ($p=0.59$).

Le score de marquage de $p75^{NTR}$ variait de 0 à 59 avec un score médian pour les tumeurs positives de 20 (Q1:11.0 ; Q3:29.25). Aucune analyse statistique n'a pu être réalisée sur le score de marquage à cause d'un nombre insuffisant de tumeurs dans les sous-groupes ($n<8$).

Globalement, l'expression de $p75^{NTR}$ était fortement associée à des paramètres clinicopathologiques favorables.

Paramètres clinicopathologiques	Expression de $p75^{NTR}$	Score de marquage (/90)	
Composante tumorale	Luminale (n=75)	9 (12.0) ^M	-
	Myoépithéliale (n=37)	35 (94.6) ^{LD}	-
	Diffuse (n=68)	19 (28.0) ^M	-
	p-value	<0.001	-
Grade	Grade 1 (n=30)	15 (50.0) [*]	12.0 (4.0 ; 17.0)
	Grade 2 (n=19)	13 (68.4) [*]	29.0 (24.0 ; 30.0)
	Grade 3 (n=34)	15 (44.1)	21.0 (8.0 ; 32.0)
	CMI (n=13) ^{REF}	1 (7.7)	14.0 (14.0 ; 14.0)
	p-value	0.008	NA (n<8)
Type histologique	Tubulaire simple (n=31)	11 (35.5)	25.0 (12.0 ; 42.0)
	Tubulaire complexe (n=17)	14 (82.4) [*]	13.5 (5.0 ; 24.0)
	Solide (n=34)	16 (47.1)	23.5 (16.0 ; 29.5)
	Anaplasique (n=14) ^{REF}	3 (21.4)	14.0 (3.0 ; 32.0)
	p-value	0.003	NA (n<8)
Emboles	Présence (n=29)	5 (17.2)	14.0 (14.0 ; 27.0)
	Absence (n=67)	39 (58.2)	21.0 (8.0 ; 30.0)
	p-value	< 0.001	NA (n<8)
Infiltration du nœud lymphatique	Présence (n=17)	2 (11.8)	20.5 (14.0 ; 27.0)
	Absence (n=32)	19 (59.4)	16.0 (8.0 ; 25.0)
	p-value	0.001	NA (n<8)
Récidive tumorale	Présence (n=13)	5 (38.5)	17.0 (8.0 ; 24.0)
	Absence (n=71)	33 (46.5)	21.0 (12.0 ; 29.0)
	p-value	0.59	NA (n<8)
Métastases à distance	Présence (n=24)	5 (20.8)	17.0 (14.0 ; 25.0)
	Absence (n=60)	33 (55.0)	21.0 (8.0 ; 30.0)
	p-value	0.004	NA (n<8)

Table 29. Expression et score de marquage de $p75^{NTR}$ en fonction de la composante tumorale et des paramètres clinicopathologiques. Pour la composante tumorale, les valeurs sont présentées en fréquence (pourcentage). Pour les paramètres clinicopathologiques, les valeurs sont présentées en médiane (Premier quartile ; Dernier quartile) ; ^{REF} Groupe de référence pour les comparaisons post-hoc. NA : non applicable ; ^{*} Groupe significativement différent du groupe de référence

IV. Etude des colocalisations entre (pro)neurotrophines et récepteurs

Les coupes sériées ont permis d'étudier la répartition relative des neurotrophines et leurs récepteurs. La forte expression de TrkA (96/98 cas, 98% des tumeurs) rend difficile l'interprétation des résultats de colocalisation. En règle générale, nous avons pu constater que les neurotrophines BDNF et proNGF sont souvent exprimées toutes les deux en même temps (Figure 103).

BDNF 18	BDNF/proNGF 61	proNGF 10
BDNF 44	BDNF/p75 ^{NTR} 35	p75 ^{NTR} 9
BDNF 51	BDNF/TrkB 28	TrkB 7
proNGF/TrkA 71		TrkA 23
proNGF 40	proNGF/p75 ^{NTR} 31	p75 ^{NTR} 13
TrkA 52	TrkA/p75 ^{NTR} 42	p75 ^{NTR} 2
TrkB 15	TrkB/p75 ^{NTR} 20	p75 ^{NTR} 24

Figure 103 : Représentation graphique des colocalisations entre deux marqueurs (neurotrophines ou récepteurs). Les aires blanches représentent le nombre de tumeurs dans lesquelles chaque neurotrophine ou récepteur est exprimé seul. Les aires grises représentent le nombre de tumeurs dans lesquelles chaque marqueur était exprimé au moins une fois sur le même champ.

Le BDNF ne montre pas de ségrégation vis-à-vis de l'un ou l'autre de ses récepteurs (p75^{NTR} ou TrkB). Le proNGF est très souvent associé à TrkA mais cette observation est liée au fait que TrkA est exprimé dans quasiment toutes les tumeurs. Quand le proNGF est présent, il est associé dans moins de la moitié des cas à p75^{NTR}. Concernant les récepteurs entre eux, il n'y a quasiment pas de tumeurs où p75^{NTR} est seul car TrkA est très souvent exprimé. TrkA est exprimé seul dans la moitié des tumeurs et associé à p75^{NTR} dans l'autre moitié des cas. TrkB est exprimé seul dans la moitié des cas, et associé à p75^{NTR} dans l'autre moitié. L'association de ces

deux derniers récepteurs est sans doute liée à leurs propensions respectives à marquer les cellules myoépithéliales. De façon générale, nous n'avons pas observé de ségrégations fortes entre un ligand et soit son récepteur de basse affinité soit son récepteur de haute affinité.

Etant donné que nous n'avons pas réussi à identifier les CSC canines, nous n'avons pas pu corrélérer la présence des CSC avec les neurotrophines ou leurs récepteurs dans les tumeurs mammaires canines.

C. Mise en relation des données IHC et de la survie

La survie n'a pas pu être analysée pour TrkA à cause de son expression ubiquitaire. Aucune corrélation n'a été observée entre l'expression du proNGF ou du BDNF. Dans la cohorte, à la fois p75^{NTR} et TrkB étaient significativement associés à une meilleure survie ($p=0.004$ et $p=0.002$ respectivement) (Figures 104 et 105).

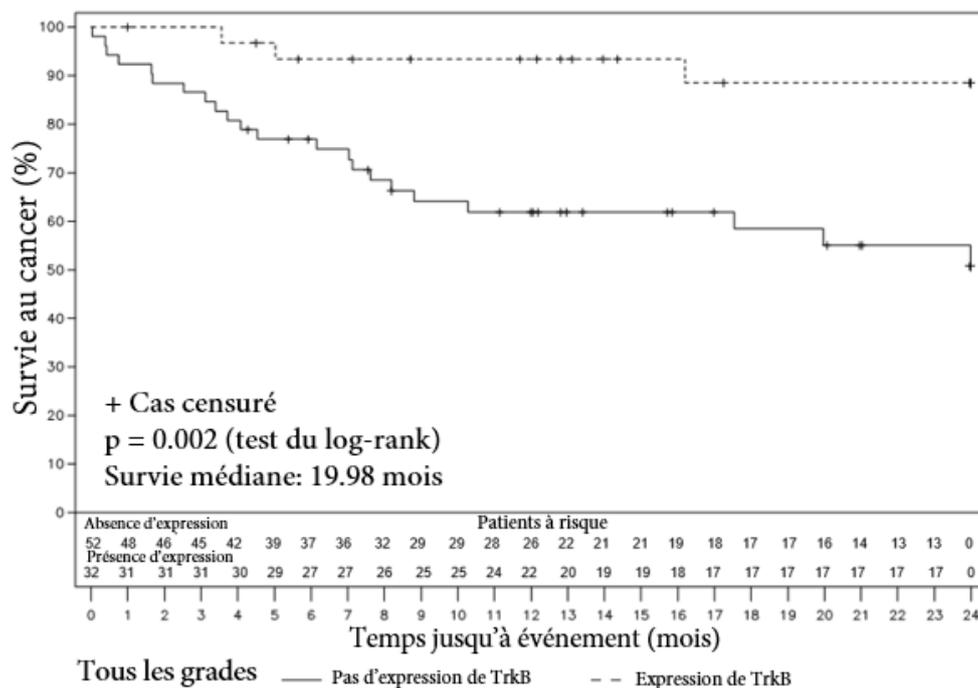


Figure 104. Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des 86 chiennes au cours du temps, en fonction de l'expression ou non de TrkB. Les nombres sous l'axe des X correspondent au nombre de chiennes vivantes à un temps t, en fonction de TrkB.

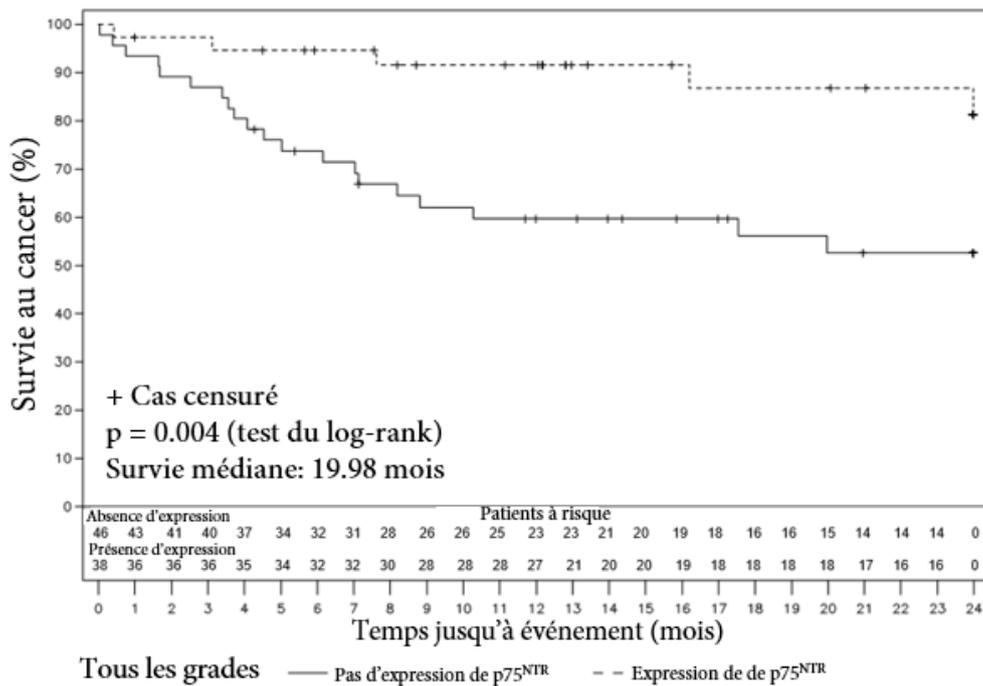


Figure 105. Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des 86 chiennes au cours du temps, en fonction de p75^{NTR}. Les nombres sous l'axe des X correspondent au nombre de chiennes vivantes à un temps t, en fonction de p75^{NTR}.

La cohorte était ensuite divisée en deux groupes d'agressivité différente telle que définie par le grade. Encore une fois, dans le groupe de mauvais pronostic, à la fois TrkB et p75^{NTR} étaient significativement associés à une meilleure survie (p=0.033 et p=0.021 respectivement) (Figures 106 et 107).

Ces résultats font l'objet d'un article soumis dans le journal Veterinary Pathology :

Expression and prognostic significance of (pro)neurotrophins proNGF and BDNF and their receptors TrkA, TrkB and p75^{NTR} in canine mammary tumors

Authors

Bernadette ROGEZ, Quentin PASCAL, Audrey BOBILLIER, François MACHURON, Robert-Alain TOILLON, Dominique TIERNY, Valérie CHOPIN*, Xuefen LE BOURHIS*

1 – University of Lille, building SN3, INSERM U908 "Cell plasticity and Cancer" 59655 Villeneuve d'Ascq, France **(BR, RAT, XLB, VC)**.

2 – OCR (Oncovet Clinical Research), Parc Eurasanté, Lille Métropole, 80 rue Docteur Yersin, 59120 Loos, France **(BR, QP, DT)**.

3 – VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon, 1 Avenue Bourgelat 69280 Marcy l'Etoile, France **(AB)**.

4 – Univ. Lille, CHU Lille, EA 2694 - Santé publique : épidémiologie et qualité des soins, F-59000 Lille, France **(FM)**.

5 – University of Picardie Jules Verne, UFR Sciences, 33 rue Saint Leu, 80000 Amiens, France **(VC)**.

*Contributed equally to this work

Corresponding author :

Xuefen Le Bourhis

Address: University of Lille, building SN3, INSERM U908 "Cell plasticity and Cancer" 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Tél. 33.20.43.40.97

Email : xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr

Discussion

I. Etude des CSC dans les lignées cancéreuses de sein *in vitro* : comment les identifier avec certitude ?

Au cours de ma thèse, nous avons montré que non seulement le couple NGF/proNGF mais aussi le couple BDNF/proBDNF peuvent mener à l'enrichissement du compartiment de CSC dans plusieurs lignées cancéreuses de sein *in vitro*. Concernant les voies de transduction impliquées, nous avons montré que l'enrichissement en CSC induit par le NGF implique p75^{NTR} et TrkA tandis que les effets du proNGF impliquent p75^{NTR}, TrkA et EphA2. Enfin, nous avons testé l'utilisation de systèmes rapporteurs, notamment le système pNanog-GFP, dans la lignée MDA-MB-231 afin d'enrichir la population en CSC dans cette lignée.

A. Tests fonctionnels *in vitro*, test Aldefluor et marqueurs cellulaires : des méthodes fiables pour identifier les CSC ?

Les expériences réalisées ont mis en évidence la difficulté d'étudier et d'isoler les CSC de sein dans des lignées cellulaires *in vitro*. Elles soulignent en particulier la nécessité de combiner plusieurs tests pour identifier les CSC, d'une part parce que les CSC sont une population cellulaire avec une forte plasticité qui les rend d'autant plus difficile à identifier, et d'autre part parce que ces tests ont des limites, et ne sont pas tous utilisables selon la lignée cellulaire étudiée.

Le test de formation de sphères ne s'est pas révélé adapté pour toutes nos lignées cellulaires. Les MDA-MB-231 en particulier montraient des capacités d'adhérence en plaques 96 puits low-binding. Pour réaliser le test de mise en sphères en milieu sans ancrage, nous avons réalisé un coatage par du polyHEMA, mais les MDA-MB-231 ont encore une fois montré des capacités d'adhérence dans quelques puits. L'utilisation de Matrigel s'est également révélée décevante, les MDA-MB-231 montrant des capacités de tubulogénèse dans ce milieu. Enfin, l'utilisation de l'agar mou a été éliminée dans le cadre de nos expériences à cause de la difficulté d'obtenir une faible concentration en sérum dans le mélange milieu/agar.

Nous avons également rencontré des problèmes de fusions de sphères dans plusieurs lignées (HCC70, BT-474 et T-47D). Les phénomènes de fusions étaient plus fréquents dans les

puits où le nombre de cellulesensemencées est le plus important. Les sphères obtenues étaient alors difformes, mettant en évidence des phénomènes de coalescence. Nous avons réussi à contourner cette difficulté en comptant le nombre de « protubérances » ou en ayant recours à un comptage anticipé (J+4 pour les HCC70, avec nouveau comptage à J+7 pour vérifier si le même nombre de sphères était obtenu). Les fusions provenaient également de phénomènes de vibrations dans les étuves où étaient stockées les plaques 96 puits. Ce phénomène a notamment été observé dans les BT-474 où une sphère unique était observée par puits, avec des sphères de plus en plus petites à mesure que le nombre de cellulesensemencées par colonne décroissait. Ce problème de fusions peut désormais être résolu par l'utilisation des plaques Aggrewells™, Stem Cell Technologies.

Un problème plus global d'harmonisation des résultats obtenus par les tests de mise en sphères se pose, que ce soit dans l'évaluation de nos résultats ou pour pouvoir les comparer entre études. Tout d'abord il n'existe pas de valeur seuil définie permettant de différencier une réelle mammosphère d'un amas cellulaire. Nous avons arbitrairement considéré qu'une sphère devait être constituée de 20 cellules au minimum. Par ailleurs le comptage était parfois difficilement réalisable. Un autre critère qui n'a pas été noté dans notre étude est la taille des sphères formées. Ce paramètre aurait pu être particulièrement intéressant dans les cas de suspicions de fusions. Enfin, il apparaît nécessaire d'harmoniser le traitement des données des tests de sphères (nombre de colonnes prises en compte, taille des sphères,...) afin de pouvoir comparer les résultats obtenus entre les études. Les difficultés liées au test de formation de sphère sont abordées dans un article de revue critique du test de sphère (Pastrana et al, 2011).

Nous avons également rencontré des difficultés avec le test Aldefluor. Au cours de notre étude, quelle que soit la lignée testée (MCF-7, MDA-MB-231, SUM-159PT,...) nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une population de CSC ou du moins une modulation de cette population en utilisant le test Aldefluor. Ce test est soumis à débat dans la littérature, plusieurs études montrant des résultats contradictoires sur l'apport respectif des enzymes ALDH1A1 ou ALDH1A3 dans le signal fluorescent obtenu. Certaines études suggèrent que l'ALDH1A1 en est responsable, alors que d'autres suggèrent que c'est l'ADLH1A3 (Marcato et al, 2011 ; Chute et al, 2006). Or seul une activité élevée de l'ALDH1A1 est un marqueur de CSC. Une étude récente

a ainsi montré qu'une expression réduite de l'ADLH1A3 mais pas de l'ALDH1A1 réduisait l'activité de l'ALDH mesurée par le test Aldefluor, ce qui suggère que l'enzyme ALDH1A3 serait à l'origine de la majeure partie du signal obtenu (Croker et al, 2017).

Enfin, l'utilisation de marqueurs cellulaires par cytométrie en flux a également soulevé des difficultés. Par exemple, le phénotype CD44⁺/CD24⁻ est surexprimé dans les lignées basales, comme les MDA-MB-231. Le phénotype n'était donc pas utilisable dans cette lignée. Nous avons testé un marquage par le CD133, qui s'est révélé cette fois totalement négatif. A priori, l'anticorps n'était pas en cause car nous n'avons pas rencontré de problème de marquage sur notre contrôle positif, la lignée de gliome DIPG013. Enfin, nous avons testé un autre marqueur potentiel de CSC, le CD49f, qui cette fois marquait toutes nos cellules.

Si l'on parcourt la littérature, les résultats concernant les marqueurs de CSC sont variables en fonction de la lignée cellulaire choisie, mais aussi en fonction du laboratoire ou des études (avec les mêmes anticorps et le même protocole des résultats différents peuvent être obtenus), en effet CD133 et CD49f ont été reportés comme marqueurs de CSC dans les MDA-MB-231 (Liu et al, 2013 ; Thiagarajan et al, 2015), ce qui n'est pas le cas pour nous. Globalement, ces marqueurs sont loin d'être robustes et satisfaisants, d'où la difficulté d'étude des CSC.

B. L'isolement d'une population enrichie en CSC : un préalable indispensable à leur étude ?

Nous avons également rencontré des problèmes liés à la difficulté d'isoler une population enrichie en CSC.

Nous avons choisi de tester les Protein arrays sur population totale, mais les résultats obtenus ont été décevants. D'une expérience à l'autre, les résultats obtenus étaient très variables. Nous les avons attribués en partie à des problèmes de bruit de fond non homogène sur la totalité des membranes de nitrocellulose, mais aussi à des différences trop importantes entre une très forte intensité du signal sur les contrôles positifs et un signal beaucoup plus faible sur les spots testés, avec par ailleurs des différences minimales entre nos conditions testées (quasiment invisibles à l'œil nu). La méthode des Protein arrays permet de définir des cibles potentielles

mais nécessite d'avoir un changement flagrant d'expression/de phosphorylation de la cible, ce qui s'est révélé impossible sur population totale. Il serait indispensable d'analyser la phosphorylation des protéines en travaillant sur des populations plus enrichies en CSC.

Les perspectives de ce travail sont donc orientées vers la nécessité de trouver un moyen d'isoler et enrichir un pool de CSC. Dans ce sens, il paraît cohérent de poursuivre la recherche dans l'établissement de clones stables, par exemple les MDA-MB-231 pNanog-GFP. Ces modèles rapporteurs pourraient éventuellement bénéficier de l'utilisation du test AldeRed ALDH Detection Assay de Merck (ref SCR150) (Minn et al, 2013) qui a comme particularité d'avoir un substrat rouge pour l'ALDH, ce qui permet d'utiliser ce test en cytométrie en flux même avec des lignées cellulaires exprimant la GFP. Nous avons également envisagé d'utiliser un autre promoteur, l'ADLH1A1. Un système rapporteur de l'ALDH1A1 a par ailleurs déjà été utilisé avec succès dans les CSC de sein (Gener et al, 2015). Au sein du laboratoire U908, des études préliminaires d'analyse transcriptomique par puces à ARN ont mis en évidence que les CSC, triées sur la base de l'activité des ALDH, surexpriment jusqu'à 30 fois plus l'isoforme ALDH1A1.

Une autre perspective serait de parvenir à amplifier les sphères, comme cela avait été fait par Elisa Tomellini. En cultivant les sphères en flasks de 75cm² non adhérentes et en reproduisant l'expérience sur plusieurs générations, Elisa Tomellini avait réussi à enrichir de façon significative le pool de CSC. Il est à noter que lors de ces expériences, l'enrichissement en CSC était plus important au bout de la 2^{ème} ou 3^{ème} génération, avec peu d'effet obtenu sur la 1^{ère} génération. Il semble donc que plusieurs générations de sphères soient nécessaires pour éliminer les cellules non CSC, ainsi que les cellules sénescents ou mortes contenues dans les sphères. Ces résultats sont à rapprocher de nos expériences de tests de formations de sphères où les traitements aux neurotrophines (que ce soit en pré-traitement ou en traitement continu) n'ont donné que des résultats mitigés. Le but serait alors d'amplifier suffisamment les sphères enrichies en CSC et cellules progénitrices pour réaliser une extraction protéique. Une autre possibilité serait de tenter d'inclure ces sphères en paraffine pour réaliser des marquages en IHC des cibles d'intérêt. La valeur ajoutée de cette expérience serait en plus, de pouvoir conserver l'aspect 3D des sphères.

C. Etude de l'effet des neurotrophines sur la population de CSC : sous quelles conditions ?

Concernant l'étude plus spécifique de l'effet des neurotrophines, plusieurs questions se sont posées. Nous avons caractérisé nos lignées en termes de niveau d'expression des neurotrophines, de leurs récepteurs et de quelques co-récepteurs, par RT-Q-PCR. Nos résultats indiquent que toutes les lignées expriment les (pro)neurotrophines et leurs récepteurs avec des niveaux très variables au niveau des ARNm. On peut donc supposer que l'effet des neurotrophines sera différent dans les différentes lignées cellulaires, même si d'autres études sont nécessaires afin de quantifier le niveau d'expression des protéines (immunohistochimie, western blot).

Nous nous sommes également posé la question de la dose de neurotrophines la plus adaptée à nos expériences et avait montré que les doses optimales pour augmenter le pool de CSC était différentes des expériences de migration/invasion ou de formation de sphères, avec la supposition de mécanismes d'action différents en fonction de la concentration de neurotrophines utilisée (courbes biphasiques). Il serait intéressant de connaître la « concentration » en neurotrophines dans les échantillons tumoraux afin de savoir si les concentrations utilisées sont proches ou non des concentrations biologiques des neurotrophines.

Nous nous sommes ensuite demandé si la présence de facteurs de croissance dans le SVF pouvait inclure un biais vis-à-vis des facteurs de croissance étudiés, les neurotrophines. Nous avons choisi de tester l'utilisation d'un « pseudo-sevrage » à 0,5% ou 1% de SVF. Cependant, le fait d'utiliser un sevrage pourrait également induire un biais, les CSC étant plus résistantes en milieu stringent, et induire en lui-même une modification du pool de CSC et/ou changer leur réponse vis-à-vis des neurotrophines.

Enfin, concernant le test de sphères, nous avons rencontré des difficultés pour étudier le rôle des neurotrophines. Le pourcentage de sphères formées était souvent plus important en présence d'EGF/bFGF (la condition standard de culture de sphères) qu'en présence de neurotrophines. L'EGF/bFGF semblait nécessaire dans certaines lignées (SUM-159PT par

exemple) pour permettre la formation de sphères. Il aurait alors été intéressant de tester des conditions associant à la fois l'EGF/bFGF et les neurotrophines testées au lieu de ne tester que les neurotrophines seules.

Pour étudier les neurotrophines, il convient donc de revoir les conditions de culture des cellules. Il pourrait être intéressant de tenir compte du micro-environnement, grâce à des modèles complexes *in vitro*, ou en passant à des expériences *in vivo*, avec un micro-environnement tumoral intact.

Enfin, un point que nous n'avons pas eu l'occasion de développer au cours de ce travail de thèse mais qui pourrait se révéler très informatif sur le mode d'action des neurotrophines sur les CSC est de déterminer si l'action des neurotrophines passe par la modification du ratio entre les divisions symétriques et asymétriques, et/ou par la reprogrammation de non CSC en CSC.

II. Le modèle canin de carcinogénèse mammaire spontanée tient-il toutes ses promesses ?

L'étude menée sur les tumeurs mammaires canines avait trois objectifs. Le premier était de vérifier si le marquage CD44⁺/CD24⁻ était susceptible d'identifier une population de CSC dans les tumeurs mammaires canines. Le deuxième objectif consistait à obtenir des premières données de répartition des neurotrophines et récepteurs dans les tumeurs mammaires canines. Enfin le troisième objectif consistait à corrélérer la localisation entre les marqueurs des CSC et les neurotrophines ou leurs récepteurs dans les tumeurs mammaires canines.

A. Le phénotype CD44⁺/CD24⁻ : marqueur de CSC ?

Depuis la découverte du phénotype CD44⁺/CD24⁻ comme marqueur des CSC de sein, de nombreuses études ont été menées pour évaluer sa valeur clinique à la fois dans les cancers du sein et les tumeurs mammaires canines, avec des résultats parfois contradictoires (Al-Hajj et al, 2003). Dans notre étude, nous avons étudié l'expression individuelle de CD44 et CD24 ainsi

que leurs phénotypes associés dans une cohorte de carcinomes mammaires canins et les avons corrélés avec le grade tumoral, le type histologique, la présence d'embolies, l'infiltration du NL, les récurrences, les métastases à distance et la survie. Notre cohorte nous a permis d'obtenir une vision d'ensemble de l'expression de CD44 et CD24 dans les carcinomes mammaires canins.

Nous avons montré que la présence et/ou le niveau d'expression global de CD44 n'était pas associé avec des paramètres pronostiques tels que le grade, la présence d'embolies ou l'infiltration des NL, mais était associé à certains types histologiques et plus spécifiquement au type tubulaire complexe. Concernant la répartition de l'expression de CD44 dans les carcinomes mammaires canins, nos résultats sont cohérents avec ceux d'études précédentes, qui montraient que l'expression de CD44 était fréquente et abondante dans les carcinomes anaplasiques et tubulaires, avec une expression basolatérale dans les carcinomes tubulaires, alors que l'expression de CD44 était moins fréquente dans les carcinomes solides (Madrazo et al, 2009 ; Magalhaes et al, 2012 ; Magalhaes et al, 2013).

De façon intéressante, nous avons montré que l'expression de CD24 était associée à des paramètres clinicopathologiques défavorables : CD24 était plus fréquemment exprimé dans des carcinomes solides, un type histologique de mauvais pronostic, dans des tumeurs de grade élevé et présentant des embolies. De plus, l'expression du phénotype CD44⁻/CD24⁺ était également associée à de nombreux paramètres d'agressivité tumorale (grade élevé, présence d'embolies, infiltration des NL, métastases à distance). A notre connaissance, notre étude est la première à montrer que le marqueur CD24 et le phénotype CD44⁻/CD24⁺ sont associés à des paramètres clinicopathologiques défavorables. L'hypothèse selon laquelle CD24 est potentiellement un marqueur de mauvais pronostic dans les carcinomes mammaires canins est cohérente avec les données connues dans les cancers du sein (Fogel et al, 1999; Kristiansen et al, 2003 ; Bernardi et al, 2012). La surexpression de CD24 a été rapportée comme un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein, tout spécialement dans les sous-types luminal A et triple-négatif (Kwon et al, 2015). Cependant, nous n'avons pas montré d'association entre l'expression de CD24 ou du phénotype CD44⁻/CD24⁺ dans notre étude même si ce dernier tend fortement à être associé à une moins bonne survie.

La faiblesse de notre étude de survie dans le cadre de CD44 et CD24 peut être liée aux limitations des études rétrospectives. Par exemple, les études rétrospectives ne garantissent pas un suivi clinique optimal ou même rigoureux. Les données cliniques n'ont pas pu être collectées pour un certain nombre de cas inclus dans la cohorte, et certains cas de décès n'ont pas pu être reliés avec certitude au processus cancéreux, ces cas ont donc dû être censurés. De plus, dans notre étude de survie, aucun ajustement n'a pu être fait concernant les modalités de traitement, car les traitements administrés étaient parfois différents entre les chiens, en termes de type de chirurgie et de traitements adjuvants. Par exemple, les chimiothérapies différaient en regard des molécules utilisées et du plan thérapeutique. Les dates de début et fin de traitement auraient été nécessaires pour ajuster cette variable en fonction du temps. Des études plus approfondies avec des paramètres bien définis de suivi clinique sont clairement nécessaires.

Concernant le phénotype CD44⁺/CD24⁻, marqueur potentiel des CSC mammaires canines, nos résultats ont montré que ce phénotype n'était pas associé à des paramètres clinicopathologiques défavorables tels qu'un grade élevé, la présence d'embolies ou l'infiltration des NL, mais était corrélé au type histologique et à l'absence de métastases à distance. Au contraire, ce phénotype est même associé de façon significative à une meilleure survie. Nos résultats vont à l'encontre d'études précédentes ayant démontré une association du phénotype CD44⁺/CD24⁻ avec des carcinomes mammaires canins de haut grade. Les auteurs de ces études concluaient par ailleurs que l'utilisation du phénotype CD44⁺/CD24⁻ en IHC permettait la détection des CSC dans les tumeurs mammaires canines (Im et al, 2015 ; Magalhaes et al, 2013). Les incohérences entre nos résultats et les résultats des études précédentes pourraient être dus en partie à la différence de taille et de composition des différentes cohortes, aux anticorps et protocoles utilisés pour l'analyse IHC ainsi qu'aux différentes méthodes de scoring en IHC. Par exemple, les études mentionnées ne décrivaient pas précisément la composition de leur cohorte en termes de grade et de type histologique, ce qui rend la comparaison difficile entre les études. De plus, la validation de la spécificité des anticorps dans les tissus canins n'était pas détaillée : dans l'étude de Barbieri, aucun tissu n'était marqué par l'anticorps CD24, ce qui pose question concernant la validité de cet anticorps chez le chien et la valeur du prétendu « phénotype CD44⁺/CD24⁻ » associé. Dans l'étude de Magalhaes, seules 100 cellules étaient prises en compte

pour déterminer le pourcentage de cellules marquées. Par ailleurs dans le sous-groupe des tumeurs mixtes, seules les cellules épithéliales étaient comptées, les cellules myoépithéliales et mésenchymateuses n'étant pas comptabilisées car ne présentant jamais de marquage (Magalhaes et al, 2013). Enfin, l'étude menée par Im ne spécifiait pas le nombre de cellules analysées. Dans cette étude, le phénotype CD44⁺/CD24⁻ était considéré comme positif quand plus de 10% des cellules tumorales étaient marquées (Im et al, 2015).

Nous avons pour notre part trouvé que le phénotype CD44⁺/CD24⁻ était exprimé dans la majorité des tumeurs (65%), avec des niveaux d'expression élevés difficilement compatibles avec un phénotype identifiant les CSC. Nos résultats rejoignent les observations de l'étude de Blacking de 2011, dans laquelle il était suggéré que CD44 était associé à la prolifération plutôt qu'à un phénotype CSC dans les tumeurs mammaires canines (Blacking et al, 2011).

Une autre voie de recherche peut être proposée pour expliquer les résultats obtenus. Les cancers du sein ont été classifiés selon leur profil d'expression génique en 5 sous-types intrinsèques : luminal A et B, basal-like, HER2⁺ et normal-like (Perou et al, 2000 ; Sorlie et al, 2001 et 2003 ; Hu et al, 2006). Gama et collègues ont démontré en 2008 que la même classification moléculaire pouvait être appliquée aux tumeurs mammaires canines (Gama et al, 2008), et d'autres études plus récentes ont confirmé cette hypothèse (Sassi et al, 2010 ; Kim et al, 2013 ; Im et al, 2014 ; Abadie et al, 2018). Une hypothèse pour expliquer la fréquence élevée du phénotype CD44⁺/CD24⁻ dans notre cohorte pourrait alors être la prédominance de certains sous-types moléculaires. Par exemple, le phénotype CD44⁺/CD24⁻ est connu pour être enrichi dans le sous-groupe basal-like, généralement considéré comme un sous-type plus agressif (Honeth et al, 2008 ; Klingbeil et al, 2010 ; Park et al, 2010). Au contraire, le phénotype CD44⁻/CD24⁺ était plus souvent détecté dans le sous-type HER2⁺, une autre forme agressive de cancer du sein (Honeth et al, 2008). Alors que de nombreux travaux ont démontré que la classification moléculaire des cancers du sein pouvait également s'appliquer au chien il pourrait être intéressant de corrélérer l'expression de nos marqueurs aux différents sous types moléculaires de tumeurs canines.

En conclusion, notre étude montre pour la première fois que CD24 et plus encore CD44⁻/CD24⁺ sont associés à des paramètres clinicopathologiques péjoratifs dans les carcinomes

mammaires canins. Des études plus poussées sont nécessaires mais CD24 pourrait être un marqueur d'agressivité dans les carcinomes mammaires canins. De plus, la fréquence élevée d'expression du phénotype CD44⁺/CD24⁻, à des forts niveaux d'expression, ainsi que son association avec une meilleure survie indiquent que ce phénotype n'est pas approprié pour détecter les CSC dans une cohorte de carcinomes mammaires canins. Pour affiner les résultats concernant les valeurs cliniques de CD44 et CD24, des études complémentaires sont nécessaires. Idéalement, elles devraient être réalisées sur une cohorte plus large, respectant des méthodes standardisées (composition des cohortes et caractérisation histologique, validation des anticorps, méthodes de scoring immunohistochimiques, paramètres de suivi clinique) et comprenant un nombre suffisant de tumeurs des différents sous-types moléculaires, comme cela a été fait chez la femme. Finalement, il serait également important d'analyser l'expression des autres marqueurs de CSC comme l'ALDH1A1, CD133, Sca-1, CD10, CD34 ou CD49f dans les différents sous-types de tumeurs canines (Ferletta et al, 2011 ; Michishita et al, 2012 ; Michishita et al, 2011 ; Ryicka et al, 2016 ; Rybicka et al, 2015).

B. Expression des neurotrophines et de leurs récepteurs : des premières données cohérentes avec l'homme ?

Notre étude nous a permis d'obtenir les premières données de répartition des (pro)neurotrophines proNGF et BDNF et de leurs récepteurs TrkA, TrkB et p75^{NTR} dans une cohorte de carcinomes mammaires canins. De la même façon que pour CD44 et CD24, nous avons ensuite corrélé leur expression et leur score de marquage avec le grade tumoral, le type histologique, la présence d'embolies, l'infiltration du NL, les récurrences, les métastases à distance et la survie.

Nous avons montré que le proNGF et le BDNF sont largement exprimés dans les carcinomes mammaires canins et que leur répartition ne semble pas associée à des paramètres clinicopathologiques de bon ou mauvais pronostic. TrkA est exprimé de façon quasi ubiquitaire dans les carcinomes mammaires canins, avec un niveau d'expression globalement élevé. TrkB et p75^{NTR} semblent être des facteurs de bon pronostic puisqu'ils sont associés à des critères de

faible agressivité et un pronostic plus favorable à la fois dans la cohorte globale et dans le groupe de mauvais pronostic. Comme chez la femme, p75^{NTR} pourrait également être un marqueur de cellules myoépithéliales chez la chienne.

La colocalisation des neurotrophines et de leurs récepteurs de faible ou haute affinité a été étudiée. Sur la même zone tumorale, les neurotrophines pouvaient être exprimées alors que les récepteurs correspondants ne l'étaient pas et vice versa. Aucune prédominance n'a pu être mise en évidence entre la colocalisation d'une neurotrophine et son récepteur de faible ou haute affinité.

Des articles précédents ont décrit une corrélation de TrkA avec l'agressivité tumorale *in vitro* ou *in vivo* et une moins bonne survie dans les cancers du sein (Lagadec et al, 2009 ; Zhang et al, 2015 ; Aubert et al, 2015). Dans une étude de Sakamoto de 2001, l'immunoréactivité de TrkA était détectée dans 62% des cancers du sein canaux invasifs (Sakamoto et al, 2001). Dans notre étude, TrkA a été détecté dans presque tous les échantillons de carcinomes mammaires canines. TrkA peut être le récepteur du NGF, connu pour être sécrété par les cellules cancéreuses mammaires, mais peut aussi être le récepteur du proNGF, qui peut lui induire une stimulation autocrine de l'invasion des cellules cancéreuses de sein via l'activation de TrkA (Descamps, 2001 ; Dollé, 2003 ; Demont et al, 2012). Dans notre étude, le proNGF est détecté dans la majorité des tumeurs, comme cela a été démontré pour le NGF et le proNGF dans les cancers du sein (Sakamoto et al, 2001 ; Adriaenssens et al, 2008 ; Demont et al, 2012). L'expression fréquente du proNGF et de TrkA dans nos échantillons suggère qu'ils pourraient être impliqués dans la tumorigénèse mammaire canine.

La signalisation BDNF/TrkB joue des rôles importants dans le phénomène de métastase tumorale, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des cancers du sein (Desmet et al, 2006 ; Roesler et al, 2011, Tajbakhsh et al, 2017). La surexpression de BDNF et TrkB est prédictive d'une moins bonne survie globale chez les patients atteints d'un cancer de la vessie, de neuroblastomes ou des carcinomes mammaires (Lai et al, 2010 ; Hua et al, 2016 ; Vanhecke et al, 2011 ; Tajbakhsh et al, 2017). Plus particulièrement, la surexpression de la voie de signalisation BDNF/TrkB semble être impliquée dans des récives précoces dans les cancers du sein triple négatifs (Tsai et al, 2017). Dans notre étude, BDNF était exprimé largement dans

les carcinomes mammaires canins mais son expression n'a pas pu être associée à des paramètres clinicopathologiques défavorables ou à la survie.

Contrairement à ce qui a été montré dans les cancers du sein chez la femme, dans notre étude TrkB était associé à des paramètres clinicopathologiques favorables et à une meilleure survie. Même si des marquages aspécifiques ont été décrits suite à l'utilisation d'un système d'amplification, ils sont restés marginaux, et étaient observés dans les mêmes proportions dans des tumeurs de bas et de haut grade. Ainsi, ce marquage aspécifique a pu cacher un vrai marquage TrkB dans une petite proportion de nos tumeurs mais sans avoir d'impact sur nos résultats.

Un premier élément de réponse pour expliquer l'association de TrkB avec un pronostic favorable peut provenir du pattern de marquage de TrkB. TrkB était trouvé de façon indifférente dans des composantes de faible agressivité (luminale) de forte agressivité (diffuse) ou dans la composante myoépithéliale. L'expression de TrkB a déjà été détectée dans les cellules myoépithéliales de glande mammaire ovine, où il jouerait un rôle dans la contraction des acini mammaires pour l'éjection du lait (Colitti et al, 2015). Comme une prolifération myoépithéliale est fréquente dans les carcinomes mammaires canins, un marquage par TrkB chez le chien pourrait refléter à la fois certaines caractéristiques de la tumeur et des fonctions biologiques indépendantes de la tumorigénèse.

Finalement, dans notre étude, p75^{NTR} est associé à des paramètres clinicopathologiques favorables et à un bon pronostic. Des études dans les lignées cancéreuses de sein ont montré que la signalisation de p75^{NTR} pouvait induire la survie des cellules cancéreuses de sein (Descamps et al, 2001 ; El-Yazidi-Belkoura et al, 2003 ; Verbeke et al, 2010). D'un autre côté, l'expression de p75^{NTR} a été associée à un bon pronostic dans les cancers du sein primaires (Aragona et al, 2001 ; Reis-Filho et al, 2006, Sakamoto et al, 2001). Un élément peut expliquer la corrélation de p75^{NTR} avec un bon pronostic dans les carcinomes mammaires canins. Plusieurs études ont démontré que p75^{NTR} est un marqueur des cellules myoépithéliales mammaires chez la femme (Popnikolov et al, 2005 ; Reis-Filho et al, 2006). Ces cellules sont peu étudiées chez la femme à cause de leur rareté mais pourraient être de bon pronostic (Deugnier et al, 2002 ; Lakhani et al, 2001). Les cellules myoépithéliales seraient des suppresseurs

paracrines naturels d'invasion et de métastase et pourraient spécifiquement réguler la transition d'un carcinome in situ à un carcinome invasif (Sternlicht, 1997). En se basant sur ces fonctions, les cellules myoépithéliales mammaires normales ont été appelées suppresseurs de tumeurs naturelles (Polyak et al, 2005). D'après nos observations, p75^{NTR} pourrait être un marqueur de cellules myoépithéliales mammaires chez le chien : il était dans la plupart des cas exprimé dans la composante myoépithéliale des échantillons tumoraux et a été observé dans les cellules myoépithéliales physiologiques dans les zones de tissus sains présentes dans les blocs tumoraux. Ces observations sont cohérentes avec la prédominance de p75^{NTR} dans les tumeurs tubulaires complexes, un type tumoral spécifique du chien dans lequel la tumeur présente à la fois une prolifération épithéliale et myoépithéliale (Misdorp et al, 1999). L'identification de cellules myoépithéliales était basée sur une estimation visuelle réalisée par deux personnes incluant un anatomopathologiste vétérinaire. D'autres études sont nécessaires pour confirmer l'expression de p75^{NTR} dans les cellules myoépithéliales, en utilisant des marqueurs spécifiques comme le SMA (Smooth Muscle actine), la calponine, p63, CD10/CALLA, les cytokératines CK 5/6 ou CK14 ou CK17, ou encore l'EGFR (Sanchez-Cespedes et al, 2011 et 2016 ; Rasotto et al, 2014). Plusieurs études ont déjà commencé à relier l'expression des neurotrophines et leurs récepteurs dans les sous-types moléculaires de cancers du sein. P75^{NTR} a été associé aux récepteurs aux oestrogènes (Aragona et al, 2001) et pourrait être un marqueur pour les sous-types basal-like ou luminal B (Tsang et al, 2013). Il a également été démontré que la coopération de TrkB avec HER2 dans les cellules cancéreuses de sein pouvait faciliter les métastases cérébrales, reliant TrkB au sous-groupe HER2+ (Choy et al, 2017).

En conclusion, notre étude est la première à démontrer la répartition et la signification pronostique des neurotrophines et de leurs récepteurs dans les tumeurs mammaires canines. Les résultats doivent encore être précisés mais des premières tendances ont été dessinées. Spécifiquement, TrkB et p75^{NTR} pourraient être liés aux cellules myoépithéliales, ce qui souligne l'intérêt potentiel du modèle canin pour étudier le rôle des cellules myoépithéliales dans le développement et l'invasion des tumeurs mammaires. Comme les inhibiteurs de Trk sont actuellement en cours d'investigation comme des potentielles options thérapeutiques dans les cancers du sein ainsi que dans plusieurs tumeurs mammaires canins, ces données pourraient

ouvrir la voie à des études futures visant à évaluer les potentialités thérapeutiques des inhibiteurs de Trk dans le traitement des tumeurs mammaires canines. Finalement, notre étude souligne la nécessité de réaliser la même classification moléculaire dans les cohortes de tumeurs mammaires canines que dans les cancers du sein afin de pouvoir mieux comprendre les résultats obtenus et de les comparer entre les deux espèces.

C. Les limites du modèle canin et quelques pistes pour y remédier

Notre étude a mis en évidence les difficultés inhérentes au modèle canin, et aux particularités du milieu vétérinaire.

Les démarches diagnostiques et cliniques sont très hétérogènes d'un vétérinaire à l'autre, d'une clinique vétérinaire « rurale » à un grand centre de référent, et même entre grands centres vétérinaires. La plupart des cliniciens vétérinaires ne sont pas cancérologues, ce qui peut causer des pertes d'informations (non inclusion du NL de drainage dans les pièces d'exérèse envoyées pour l'examen anatomopathologique, bilan d'extension et suivi clinique *a minima*,...)

Au sein des études pronostiques, les populations d'études sont souvent petites et non comparables, avec par exemple une absence de consensus dans les traitements (type de chirurgie, protocole de chimiothérapie quand elle est réalisée). Pour une même pathologie, différents systèmes de classification et de grading peuvent exister.

Au niveau des travaux de recherche en eux-mêmes, les marqueurs et protocoles d'immunohistochimie sont variables, ce qui peut mener à des résultats discordants.

Enfin, les variables utilisées pour évaluer l'issue médicale sont diverses et parfois difficiles à déterminer à cause d'un suivi clinique trop faible, et non standardisé. Chez le chien, différents critères d'évaluation pouvant être utilisés comme point de fin dans une étude de survie : le temps de survie globale, le temps de survie sans progression, le temps de survie sans métastases. Dans cette espèce, le temps de survie globale dépend de la décision des propriétaires vis-à-vis de l'euthanasie. La censure peut être un problème car beaucoup de cas sont perdus de vue, les propriétaires ne retournant pas forcément chez le (même) vétérinaire après le diagnostic. Des tumeurs mammaires récidivantes peuvent avoir un impact vis-à-vis d'autres

décisions liées à la santé de l'animal. La durée de survie sans progression est le point de fin traditionnel dans les études sur les tumeurs solides, et inclut tous les événements liés aux tumeurs : récurrence locale, apparition de nouvelles tumeurs, métastases à distance, or l'apparition de nouvelles tumeurs peut ou non avoir un impact clinique : cela dépend de la décision des propriétaires et du type de tumeur. Le temps de survie sans métastases (TTM pour Time To Metastasis ou MFS pour Metastasis-Free Survival) est biologiquement le point de fin le plus « propre » chez le chien, surtout en évaluant des facteurs pronostics, mais il demande un suivi clinique adéquat, qui n'est pas fréquemment réalisé (Kristiansen et al, 2016).

Un des mots d'ordre pour les futures études en cancérologie comparée est donc l'harmonisation des études pronostiques vétérinaires pour pouvoir les comparer entre elles, avec la médecine humaine, et leur donner leur juste poids scientifique. Pour cela, des articles guidelines existent mais ne sont pas toujours suivis, ou ne couvrent pas tous les cas de figures.

De façon générale, il est également nécessaire de mener des études avec un niveau de preuve plus élevé (Figure 108). Les études pronostiques sont encore bien souvent rétrospectives plutôt que prospectives, et univariées plutôt que multivariées. Dans un article de 2010, il est montré qu'il n'y a pas d'évolution de la qualité (niveau de preuve) des études alors qu'il y a une augmentation du nombre d'études en oncologie vétérinaire (Sahora et al, 2010). Notre étude ne fait pas exception, puisqu'en tant qu'étude rétrospective nous ne sommes qu'au deuxième palier en termes de niveau de preuve. L'idéal serait désormais de pouvoir réaliser une étude prospective, incluant plusieurs centres vétérinaires, en veillant à ce qu'il n'y ait pas de biais de recrutement (centres ne recevant que les cas les plus graves), standardisée vis-à-vis à la fois de la chirurgie réalisée, des pièces d'exérèses obtenues (incluant le NL de drainage), du staging réalisé sur la tumeur, avec un suivi régulier et complet (radiographie thoracique, échographie abdominale, voire scanner) pour déterminer la survenue de récurrences et, en cas de décès, pouvoir déterminer s'il est lié ou non au cancer.

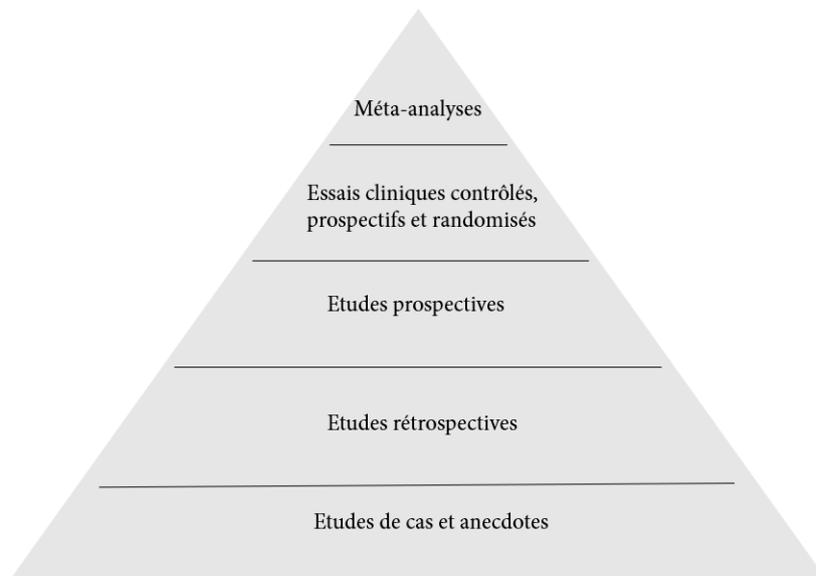


Figure 108. Niveaux de preuves dans la littérature en oncologie vétérinaire (adapté d'après Sahora et al, 2010). Les études de cas et anecdotes présentent le niveau de preuves le plus faible alors que les méta-analyses présentent le niveau de preuves le plus élevé.

Le deuxième point majeur qui a représenté un frein dans notre étude et qui représente un frein globalement dans les études sur les tumeurs mammaires canines, est la nécessité de réaliser de façon systématique une classification moléculaire. Chez la femme, les résultats sur des marqueurs pronostiques potentiels sont bien souvent dépendants du sous-type moléculaire : c'est le cas notamment dans le contexte des CSC qui peuvent représenter un % élevé de la population tumorale dans les tumeurs triple-négatives, avec un phénotype CD44⁺/CD24⁻ spécifique de ce sous-groupe ((Honeth et al, 2008 ; Klingbeil et al, 2010 ; Park et al, 2010). Or, chez la chienne, les dernières études indiquent que jusqu'à 75% des tumeurs seraient triple-négatives (Abadie et al, 2017), alors que chez la femme ce pourcentage est de l'ordre de 12-17% (Foulkes et al, 2011), ce qui peut représenter un biais phénoménal. Il est ainsi très difficile d'établir les mêmes corrélations pronostiques chez la chienne sans avoir en main tous les éléments nécessaires, et les études canines doivent de toute urgence se mettre au niveau des études humaines et systématiser la classification moléculaire.

Bibliographie

- Abadie J, Nguyen F, Loussouarn D, et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. *Breast Cancer Res Treat.* 2018; 167(2):459-468
- Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44⁺/CD24^{-low} cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:1154-1159
- Adams JM, Strasser A. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res.* 2008; 68(11):4018-4021
- Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P et al. Nerve Growth Factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* 2008; 68(2):346-51.
- Aebi S, Davidson T, Gruber G, et al. Primary breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals Oncol.* 2011; 22(6):vi12-vi24
- Agliano A, Calvo A, Box C. The challenge of targeting cancer stem cells to halt metastasis. *Sem Can Biol.* 2017; 44: 25-42
- Ahmed MAH, Aleskandarany MA, Rakha EA, et al. A CD44⁺/CD24⁺ phenotype is a poor prognostic marker in early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 133:979-995
- Al-Assar O, Muschel R, Mantoni T, et al. Radiation response of cancer stem-like cells from established human cell lines after sorting for surface markers. *Int J Radiat Oncol Biology Phys.* 2009; 75:1216–25
- Alderson RF, Curtis R, Alterman AL, et al. Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro. *Brain Res.* 2000; 871: 210–222
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(7):3983–3988
- Alison MR, Lin WR, Lim SML, et al. Cancer stem cells: in the line of fire. *Cancer Treat Rev.* 2012; 38:589–598
- Altamura G, degli Uberti B, Galiero G et al. Expression and activation of platelet-derived growth factor β receptor, mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in canine mammary tumors. *Res Vet Sci.* 2017; 110:29-33
- Amabile G, Meissner A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med.* 2009; 15:59–68
- Angeletti RH, Bradshaw RA. Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971; 68:2417–2420
- Animal Health Survey. In *Companion animal news*, Englewood, Colorado, 1998 and 2005, Morris Animal Foundation.
- Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 2003; 72:1117-1130

- Aragona M, Panetta S, Silipigni AM et al. Nerve Growth Factor Receptor immunoreactivity in breast cancer patients. *Cancer Invest.* 2001; 19(7):692-697
- Arenas C, Peña L, Granados-Soler JL, et al. Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case-control prospective study. *Vet Rec.* 2016; 179(5):125
- Arévalo JC, Wu SH. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63:1523–1537
- Arrighi N, Bodei S, Zani D, et al. Nerve growth factor signaling in prostate health and disease. *Growth Factors Chur Switz.* 2010; 28:191–201
- Aubert L, Guilbert M, Corbet C, et al. NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib. *Oncotarget.* 2015; 6(12):9807-9819
- Auffinger B, Tobias AL, Han Y, et al. Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death Differ.* 2014; 21:1119–31
- Avila-García M, Garcia-Sanchez G, Lira-Romera E et al. Characterization of progenitor cells during canine retinal development. *Stem Cells Int.* 2012, DOI: 10.1155/2012/675805
- Axlund SD, Sartorius CA. Progesterone regulation of stem and progenitor cells in normal and malignant breast. *Mol Cell Endocrinol.* 2013; 357(1-2):71-79
- Ayob AZ, Ramasamy TS. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci.* 2018; 25:20
- Backer LC, Grindem CB, Corbett WT et al. Pet dogs as sentinels for environmental contamination. *Sci Total Environ.* 2001; 274,161-169
- Bailey JM, Singh PK, Hollingsworth MA. Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: sonic Hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins. *J Cell Biochem.* 2007; 102(4):829–839
- Baldwin AN, Bitler CM, Welcher AA, et al. Studies on the structure and binding properties of the cysteine-rich domain of rat low affinity nerve growth factor receptor (p75NGFR). *J Biol Chem.* 1992; 267:8352–8359
- Balic M, Lin H, Young L, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(19):5615–5621
- Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1995; 7:148–155
- Barbieri F, Thellung S, Ratto A, et al. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of metformin on stem-like cells isolated from spontaneous canine mammary carcinomas: translational implications for human tumors. *BMC Cancer.* 2015; 15:228
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982; 1:549–553

- Barker N, van Oudenaarden A, Clevers H. Identifying the stem cell of the intestinal crypt: strategies and pitfalls. *Cell Stem Cell*. 2012; 11: 452–460
- Barutello G, Rolih V, Arigoni M, et al. Strengths and weaknesses of pre-clinical models for human melanoma treatment: dawn of dogs' revolution for immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 2018; 19:799
- Baum B, Settleman J, Quinlan MP. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Sem Cell Dev Biol*. 2008; 19:294–308
- Baumann P, Cremers N, Kroese F, et al. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res*. 2005; 65(23):10783–10793
- Beauvais W, Cardwell JM, Brodbelt DC. The effect of neutering on the risk of mammary tumors in dogs – a systematic review. *J Small Anim Pract*. 2012; 53:314–322
- Becker AJ, McCulloch A, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963; 192:4945–4947
- Beer P, Pozzi A, Rohrer Bley C, et al. The role of sentinel lymph node mapping in small animal veterinary medicine: a comparison with current approaches in human medicine. *Vet Comp Oncol*. 2017; 1–10
- Belot A, Grosclaude P, Bossard N, et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980–2005. *Rev Ep Santé Pub*. 2008; 56:159–175
- Benjamin SA, Lee AC, Saunders WJ. Classification and behaviour of canine mammary epithelial neoplasms base on life-span observations in beagles. *Vet Pathol*. 1999; 36:423–436
- Berg JW. The significance of axillary node levels in the study of breast carcinoma. *Cancer*. 1955; 8:776–778
- Bergman PJ, McKnight J, Novosad A, et al. Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase : a phase I trial. *Clin Can Res*. 2003; 9:1284–1290
- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, et al. Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron*. 1991; 7:857–866
- Bernardi MA, Logullo AF, Pasini FS, et al. Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncol Rep*. 2012; 27:28–38
- Bernards R, Weinberg RA. A progression puzzle. *Nature*. 2002; 418:82
- Beserra HEO, Grandi F, Dufloth RM, et al. Metastasis of mammary carcinoma in bitches: evaluation of the sentinel lymph node technique. *Adv Breast Cancer Res*. 2016; 5:58–65
- Bhakar AL, Howell JL, Paul CE, et al. Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2003; 23: 11373–11381
- Biffo S, Offenhäuser N, Carter BD, et al. Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Dev Camb Engl*. 1995; 121: 2461–2470
- Biller B, Berg J, Garrett L, et al. 2016 AAHA Oncology guidelines for dogs and cats. *J Am Anm Hosp Assoc*. 2016; 52:181–204

Blacking TM, Waterfall M, Argyle DJ. CD44 is associated with proliferation, rather than a specific cancer stem cell population, in cultured canine cancer cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;141:46-57

Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006; 22:339-373

Blostin R, Boussarie D, Christen O. Le *Viscum album* en médecine vétérinaire. *Editions Médicales Anthroposophiques.* 2017

Boland GP, Butt IS, Prasad R, et al. COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ. *Br J Cancer.* 2004; 90:423-429

Bombelli S, Zipeto MA, Torsello B, et al. PKH(high) cells within clonal human nephrospheres provide a purified adult renal stem cell population. *Stem Cell Res.* 2013; 11(3):1163-77

Bonkobara M. Dysregulation of tyrosine kinases and use of imatinib in small animal practice. *Vet J.* 2015; 205:180-188

Bonnet D, Dick JE, Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine.* 1997;3(7):730-737

Bonnett BN, Egenvall A. Age patterns of disease and death in insured Swedish dogs, cats, and horses. *J Comp Pathol.* 2010; 142(1):S33-S38

Borena BM, Bussche L, Burvenich C, et al. Mammary stem cell research in veterinary science: an update. *Stem Cells Dev.* 2013; 22(12):1743-51

Bradshaw RA, Murray-Rust J, Ibáñez CF, et al. Nerve growth factor: structure/function relationships. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 1994; 3:1901-1913

Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353:793-802

Bresnahan PA, Leduc R, Thomas L, et al. Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J Cell Biol.* 1990; 111:2851-2859

Bretz N, Noske A, Keller S, et al. CD24 promotes tumor cell invasion by suppressing tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in a c-Src-dependent fashion. *Clin Exp Metastasis.* 2012;29:27-38

Breuzza L, Garcia M, Delgrossi MH, et al. Role of the membrane proximal O-glycosylation site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells. *Exp Cell Res.* 2002; 273:178-186

Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, et al. Trk Receptor Expression and Inhibition in Neuroblastomas. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:3244-3250

Bronfman FC. Metalloproteases and gamma-secretase: new membrane partners regulating p75 neurotrophin receptor signalling? *J Neurochem.* 2009; 103(1): 91-100

Bronson RT. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *Am J Vet Res.* 1982; 43:2057-2059

Brown CA, Elliott J, Schmiedt CW et al. Chronic kidney disease in aged cats: clinical features, morphology, and proposed pathogenesis. *Vet Pathol.* 2016; 53(2), 309-326

- Brown DC, Reetz J. Single agent polysaccharopeptide delays metastases and improves survival in naturally occurring hemangiosarcoma. *Ev Bas Comp Alt Med*. 2012;
- Buczek ME, Reeder SP, Regad T, et al. Identification and isolation of cancer stem cells using NANOG-EGFP reporter system. *Cancer Stem cells: methods and protocols*, In: Methods in molecular biology. 2018 Eds: Gianpaolo Papaccio and Vincenzo Desiderio
- Burgos-Ojeda D, Wu R, McLean K, et al. CD24+ ovarian cancer cells are enriched for cancer-initiating cells and dependent on JAK2 signaling for growth and metastasis. *Mol Cancer Ther*. 2015; 14(7):1717–1727
- Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013; 501(7467): 338–345
- Cabrera MC, Hollingsworth RE, Hurt EM. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World J Stem Cells*. 2015; 7(1):27–36
- Cardiff RD, Ward JM, Barthold SW. “One medicine – one pathology”: are veterinary and human pathology prepared? *Lab Invest*. 2008; 88,18-26
- Carlson RW, Allred C, Anderson BO, et al. Invasive breast cancer: Clinical practice guidelines in oncology. *J Nat Comp Can Net*. 2011; 9(2):136-222
- Caroleo MC, Carito V, Pingitore A, et al. Human kidney podocyte cell population as a novel biological target of nerve growth factor. *Growth Factors*. 2014
- Cassali GD, Bertagnolli AC, Ferreira E, et al. Canine mammary mixed tumours: a review. *Vet Med Int*. 2012
- Cassali GD, Lavalle GE, De Nardi AB, et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz J Vet Pathol*. 2011; 4(2):153-180
- Ceder JA, Jansson L, Ehrnström RA, et al. The characterization of epithelial and stromal subsets of candidate stem/progenitor cells in the human adult prostate. *Eur Urol*. 2008; 53: 524–531
- Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells Dayt. Ohio*. 2006; 24:3–12
- Chakravarthy R, Mnich K, Gorman AM. Nerve growth factor (NGF)-mediated regulation of p75^{NTR} expression contributes to chemotherapeutic resistance in triple negative breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Comm*. 2016; 478; 1541-1547
- Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003; 113:643–655
- Chan MM, Tahan SR. Low-affinity nerve growth factor receptor (P75NGFR) as a marker of perineural invasion in malignant melanomas. *J Cutan Pathol*. 2010; 37:336–343
- Chang SC, Chang CC, Chang TJ et al. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *JAVMA*. 2005; 227(10):1625-1629

Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neur.* 2003; 4:299–309

Chao MV, Bothwell MA, Ross AH, et al. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science.* 1986; 232:518-21

Chao MV, Hempstead BL. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci.* 1995; 18: 321–326.

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res.* 2009; 69:1302–1313

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16:45–55

Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(5):1368-76

Cheang, MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101(10):736-50

Chen FM, Wu LA, Zhang M, et al. Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: Promises, strategies, and translational perspectives. *Biomaterials.* 2011; 32: 3189–3209

Chen W, Dong J, Haiech J, et al. Cancer stem cell quiescence and plasticity as major challenges in cancer therapy. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:1740936

Chen CY, Cheng YY, Yen CYT, et al. Mechanisms of pluripotency maintenance in mouse embryonic stem cells. *Cell Mol Life Sci.* 2017; 74:1805-1817

Chijiwa K, Uchida K, Tateyama S. Immunohistochemical evaluation of canine peripheral nerve sheath tumors and other soft tissue sarcomas. *Vet Pathol.* 2004; 41:307-318

Choy C, Ansari KI, Neman J et al. Cooperation of neurotrophin receptor TrkB and Her2 in breast cancer cells facilitates brain metastases. *Breast Cancer Res.* 2017; 19:51

Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103:11707–11712

Ciancolo RE, Benali SL, Aresu L. Aging in the canine kidney. *Vet Pathol.* 2016; 53(2):299-308

Cleary MP. Impact of obesity on development and progression of mammary tumors in preclinical models of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2013; 18(0):333-343

Clemente M, Pérez-Alenza MD, Illera JC, et al. Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol.* 2010; 47(2):265-274

Cocola C, Anastasi P, Astigliano S, et al. Isolation of canine mammary cells with stem cells properties and tumour-initiating potential. *Reprod Dom Anim.* 2009; 44(2):214-217

- Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1954; 40(10):1014-1018
- Colitti M. Expression of NGF, BDNF and their high-affinity receptors in ovine mammary glands during development and lactation. *Histochem Cell Biol*. 2015
- Collina F, Bonito MD, Bergolis VL, et al. Prognostic value of cancer stem cells markers in triple-negative breast cancer. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:158682.
- Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P et al. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109980:2784–2789
- Copley MR, Beer PA, Eaves CJ. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage. *Cell Stem Cell*. 2012;10: 690–697
- Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, et al. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol*. 2002; 55:429-434
- Coulson EJ, Reid K, Baca M, et al. Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J Biol Chem*. 2000; 275:30537–30545
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351(8):781-91
- Croker AK, Goodale D, Chu J, et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med*. 2009; 13(8B):2236–2252
- Croker AK, Rodriguez-Torres M, Xia Y, et al. Differential functional roles of ALDH1A1 and ALDH1A3 in mediating metastatic behaviour and therapy resistance of human breast cancer cells. *Int J Mol Sci*. 2017; 18:2039
- Crozier C, Wood GA, Foster RA, et al. KRAS mutations in canine and feline pancreatic acinar cell carcinoma. *J Comp Path*. 2016; 155:24-28
- Dahlin E, Nelson GM, Haynes M, et al. Success rates for product development strategies in new drug development. *J Clin Pharm Ther*. 2016; 41:198-202
- Dang C, Zhang Y, Ma Q, et al. Expression of nerve growth factor receptors is correlated with progression and prognosis of human pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21(5):850-8
- Davidson B, Reich R, Lazarovici P, et al. Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003; 9:2248–2259
- Davis BW, Ostrander EA. Domestic dogs and cancer research: a breed-based genomics approach. *ILAR J*. 2014; 55(1):59-68
- De Araújo MR, Campos LC, Ferreira E, et al. Quantitation of the regional lymph node metastatic burden and prognosis in malignant mammary tumors of dogs. *J Vet Intern Med*. 2015; 29:1360-1367
- De Bruin C, Meij BP, Kooistra HS et al. Cushing's disease in dogs and humans. *Horm Res*. 2009; 71(1):140-143

- De la Cruz-Morcillo MA, Berger J, Sanchez-Prieto R, et al. P75 neurotrophin receptor and pro-BDNF promote cell survival and migration in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7(23):34480-97
- De Souza CH, Toledo-Piza E, Amorin R, et al. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Can Vet J*. 2009; 50:506-510
- Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Rev*. 2005;5:275-284
- Debeb B, Xu W, Woodward W. Radiation resistance of breast cancer stem cells: understanding the clinical framework. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2009; 14:11-7
- Dechant G, Barde YA. Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr Opin Neurobiol*. 1997; 7:413-418
- Decker WK, da Silva RF, Sanabria MH, et al. Cancer immunotherapy: historical perspective of a clinical revolution and emerging preclinical animal models. *Front Immunol*. 2017; 8:829
- Delsite R, Djakiew D. Characterization of nerve growth factor precursor protein expression by human prostate stromal cells: a role in selective neurotrophin stimulation of prostate epithelial cell growth. *Prostate*. 1999; 41:39-48
- Demir IE, Tieftrunk E, Schorn S et al. Nerve growth factor & TrkA as novel therapeutic targets in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1866:37-50
- Demont Y, Corbet C, Page A, et al. Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein. *J Biol Chem*. 2012; 287(3):1923-31
- Denkert C, Winzer K-J, Hauptmann S. Prognostic impact of Cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Clin Breast Can*. 2004; 4(6):428-433
- Department of Health and Human Services. *Canine Immunotherapy Trials and Correlative Studies (U01) RFA-CA-17-001* (2017). Available from: <https://grants.nih.gov/grants/guide/rfa-files/RFA-CA-17-001.html>.
- Descamps S, Le Bourhis X, Delehedde M et al. Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *Journal of Biological chemistry*. 1998;273(27):6659-16662
- Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E et al. Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem*. 2001;276(21):17864-70
- Desmet CJ, Peeper DS. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63:755-759
- Dessaud E, McMahon AP, Briscoe J. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development*. 2008; 135(15):2489-2503
- Destoumieux-Garzón D, Mavingui P, Boetsch G, et al. The One Health concept: 10 years old and a long road ahead. *Front Vet Sci*. 2018; 5:14

- Deugnier MA, Teuliere J, Faraldo MM, et al. The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res.* 2002;4(6):224-230
- Deutsch EW, Ball CA, Berman JJ, et al. Minimum Information Specification For In Situ Hybridization and Immunohistochemistry Experiments (MISFISHIE). *Nat Biotechnol.* 2008;26(3):305-312
- Dickinson PJ, LeCouteur RA, Higgins RJ, et al. Canine spontaneous glioma: a translational model system for convection-enhanced delivery. *Neuro Oncol.* 2010; 12(9):928-940
- Diehn M, Cho R, Lobo N, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature.* 2009; 458:780–3
- Dionne CA, Camoratto AM, Jani JP, et al. Cell cycle-independent death of prostate adenocarcinoma is induced by the trk tyrosine kinase inhibitor CEP-751 (KT6587). *Clin Can Res.* 1998; 4:1887-1898
- Dollé L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, et al. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene.* 2003; 22:5592-5601
- Dontu G, Abdallah WM, Foley JM et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 2003; 17(10):1253–1270
- Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif.* 2003; 36(Suppl 1):59–72
- Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, et al. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature.* 2004; 430:1034-1039
- Dobson JM, Samuel S, Milstein H, et al. Canine neoplasia in the UK : estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract.* 2002;43:240-246
- Dolka I, Czopowicz M, Gruk-Jurka A, et al. Diagnostic efficacy of smear cytology and Robinson's cytological grading of canine mammary tumors with respect to histopathology, cytomorphometry, metastases and overall survival. *Plos One.* 2018; 13(1):e0191595
- Donnay I, Raus J, Verstegen J. Influence des antécédents hormonaux sur l'apparition clinique des tumeurs mammaires chez la chienne. *Ann Med Vet.* 1994 ; 138 :109-117
- Doré M, Lanthier I, Sirois J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2003; 40:207-212
- Dorn CR, Taylor DON, Schneider R, et al. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst.* 1968; 40(2):307-318
- Dravid G, Ye Z, Hammond H, et al. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 2005; 23:1489–1501
- Duru N, Gernapudi R, Lo PK, et al. Characterization of the CD49^f/CD44⁺/CD24⁻ single-cell derived stem cell population in basal-like DCIS cells. *Oncotarget.* 2016; 7(30):47511-47525

Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, et al. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med.* 2005; 69:109-127

Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, et al. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilm's tumor. *J Clin Oncol.* 2001; 19:689-696

Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:4080-85

Eide FF, Vining ER, Eide BL, et al. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1996; 16:3123-3129

El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Dollé L, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2003;278(19):16952-16956

Ellis H, Mahadevan V. Anatomy and physiology of the breast. *Surgery.* 2013; 31(1):11-14

Ellsworth RE, Blackburn HL, Shriver CD, et al. Molecular heterogeneity in breast cancer: state of the science and implications for patient care. *Semin Cell Dev Biol.* 2016

Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008; 15(3):504-514

Esposito D, Patel P, Stephens RM, et al. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and TrkA receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem.* 2001; 276:32687-32695

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292:154-156

Fall T, Hansson Hamlin H, Hedhammar A, et al. Diabetes mellitus in a population of 180,000 insured dogs: incidence, survival, and breed distribution. *J Vet Intern Med.* 2007; 21:1209-1216

Fan TM, Barger AM, Sprandel IT et al. Investigating TrkA expression in canine appendicular osteosarcoma. *J Vet Intern Med.* 2008; 22:1181-1188

Fan M, Sun J, Wang W, et al. Tropomyosin-related kinase B promotes distant metastasis of colorectal cancer through protein kinase B-mediated anoikis suppression and correlates with poor prognosis. *Apoptosis Int J Program Cell Death.* 2014; 19:860-870

de Farias CB, Heinen TE, dos Santos RP, et al. BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 425:328-332

Fazekas J, Fördös I, Singer J, et al. Why man's best friend, the dog, could also benefit from an anti-HER-2 vaccine (Review). *Oncol Letters.* 2016; 12:2271-2276

Feldman EC, Nelson WN. Canine and feline endocrinology and reproduction. 3rd Edition, Saint-Louis, Missouri: WB Saunders, 2004, 1089p

- Fenger JM, London CA, Kisseberth WC. Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology. *ILAR J*. 2014; 55(1):69-85
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136,E359-E386
- Ferletta M, Grawé J, Hellmén E. Canine mammary tumors contain cancer stem-like cells and form spheroids with an embryonic stem cell signature. *Int J Dev Biol*. 2011; 55:791-799
- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Can*. 2003; 3:1-6
- Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2008; 10:R25
- Fiszman GL, Jasnis MA. Molecular mechanisms of Trastuzumab resistance in HER2 overexpressing breast cancer. *Int J Breast Cancer*. 2011; 2011:352182.
- Fitoussi A. Chirurgie du cancer du sein et reconstruction mammaire. 2^e édition. 2017. Editions Elsevier Masson.
- Fleming JM, Creevy DE, Promislow DE. Mortality in north American dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. *J Vet Intern Med*. 2011; 25:187-198
- Fogel M, Friederichs J, Zeller Y, et al. CD24 is a marker for human breast carcinoma. *Cancer Lett*. 1999;143:87-94
- Forbes S, Vig P, Poulsom R, et al. Hepatic stem cells. *J Pathol*. 2002; 197:510-518
- Froni C, Broggin M, Generali D, et al. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer Treat Rev*. 2012; 38:689-697
- Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363:1938-48
- Friedman WJ, Greene LA. Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res*. 1999; 253:131-142
- Fuchs E, Chen T. A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO reports*. 2013; 14(1):39-48
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. 2004; 116:769-778
- Gama A, Alves A, Schmitt F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch*. 2008; 453:123-132
- Gama A, Paredes J, Gartner F et al. Expression of E-cadherin, P-cadherin and β -catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *Vet J*. 2008;177:45-53
- Gan L, Yang Y, Li Q, et al. Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. *Biomark Res*. 2018; 6:10
- Garcia-Suarez O, Hannestad J, Esteban I et al. Neurotrophin receptor-like protein immunoreactivity in human lymph nodes. *The anatomical record*. 1997; 249:226-232

- Gardner HL, Fenger JM, London CA. Dogs as a model for cancer. *Annu Rev Anim Biosci*. 2016; 4:199-222
- Gearing DP, Virtue ER, Gearing RP et al. A fully caninised anti-NGF monoclonal antibody for pain relief in dogs. *BMC Vet Res*. 2013; 9:226
- Gelb HR, Freeman LJ, Rohleder JJ, et al. Feasibility of contrast-enhanced ultrasound-guided biopsy of sentinel lymph nodes in dogs. *Vet Radiol Ultrasound*. 2010; 51(6):628-633
- Gener P, Gouveia LP, Sabat GR, et al. Fluorescent CSC models evidence that targeted nanomedicines improve treatment sensitivity of breast and colon cancer stem cells. *Nanomedicine: Nanotech Biol Med*. 2015; 11:1883-1892
- Ghiaur G, Yegnasubramanian S, Perkins B, et al. Regulation of human hematopoietic stem cell self-renewal by the microenvironment's control of retinoic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(40):16121–16126
- Ghosh R, Narasanna A, Wang SE, et al. Trastuzumab has preferential activity against breast cancers driven by HER2 homodimers. *Cancer Res*. 2011; 71(5):1871-1882
- Gibbs EPJ. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. *Vet Rec*. 2014; 174:85-91
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(5):555–567
- Glickman LT, Raghavan M, Knapp DW, et al. Herbicide exposure and the risk of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in Scottish Terriers. *JAVMA*. 2004; 224(8):1290-97
- Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, et al. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 2011; 48(1):117-131
- Goldschmidt MH, Peña L, Zappulli V. Tumors of the mammary gland. In Tumors in Domestic animals. Editor: Donald J Meuten. 2016
- Gong Y, Cao P, Yu H, et al. Crystal structure of the neurotrophin-3 and p75NTR symmetrical complex. *Nature*. 2008; 454:789–793
- Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nature*. 1997; 3(12):1337-1345
- Goodell MA. Stem cell identification and sorting using the Hoechst 33342 side population (SP). *Curr Protoc Cytom*. 2005; Editor. Board J Paul Robinson Manag. Ed. A1 Chapter 9, Unit9.18.
- Gordon I, Paoloni M, Mazcko C, et al. The Comparative Oncology Trials Consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway. *Plos Med*. 2009; 6(10):e1000161
- Gray K, Ellis V. Activation of pro-BDNF by the pericellular serine protease plasmin. *FEBS Lett*. 2008; 582:907–910

- Greer KA, Canterberry SC, Murphy KE. Statistical analysis regarding the effects of height and weight on life span of the domestic dog. *Res Vet Sci.* 2007; 82:208-214
- Gronbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS.* 2007; 115:1039-1059
- Grosenbaugh DA, Leard AT, Bergman PJ, et al. Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *Am J Vet Res.* 2011; 72:1631-1638
- Guérin S, Laplanche A, Dunant A, et al. Mortalité attribuable à l'alcool en France en 2009. *BEH.* 2013 ; 16-17-18
- Guil-Luna S, Sánchez-Céspedes R, Millán Y, et al. Algepristone decreases proliferation in progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *J Vet Intern Med.* 2011; 25:518-523
- Gyles C. One Medicine, One Health, One World. *CVJ.* 2016; 57:345-346
- Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, et al. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res.* 2006; 312:3701–3710
- Hahn KA, Oglivie G, Rusk T et al. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med.* 2008; 22:1301-1309
- Hallböök F, Ibáñez CF, Persson H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron.* 1991; 6:845–858
- Hampe JF, Misdorp W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull Wld Hlth Org.* 1974; 50:111-133
- Hay M, Thomas DW, Craighead JL et al. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(1):40-51
- He S, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009; 25: 377–406
- Head E. Neurobiology of the aging dog. *Age.* 2011; 33:485-496
- Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, et al. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle.* 2009; 8(20):3274–3284
- Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, et al. Rich, Hypoxia-inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer.* 2010; 102 (5):789–795
- Hedlund CS. Mammary neoplasia. Small animal surgery. St.Louis: Mosby Elsevier Fossum TW 2007, 729-735
- Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* 2007; 1(3):313–323
- Herrup K, Shooter EM. Properties of the beta-nerve growth factor receptor in development. *J Cell Biol.* 1075; 67:118–125

- Hiley C, de Bruin EC, McGranahan N, et al. Deciphering intratumor heterogeneity and temporal acquisition of driver events to refine precision medicine. *Genome Biol.* 2014; 15(8): 453
- Hoffman JM, Creevy KE, Franks A et al. The companion dog as a model for human aging and mortality. *Aging Cell.* 2018; e12737
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, et al. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature.* 1990; 344: 339–341
- Holden PH, Asopa V, Robertson AG, et al. Immunoglobulin-like domains define the nerve growth factor binding site of the TrkA receptor. *Nat Biotechnol.* 1997; 15:668–672
- Holmes MD, Chen WY, Feskanich D, et al. Physical activity and survival after breast cancer diagnosis. *JAMA.* 2005; 293(20):2479-86
- Hondemarck H. Neurotrophins and their receptors in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012; 23:357-365
- Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, et al. The CD44⁺/CD24⁻ phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2008; 10(3):R53
- Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:13075-80
- Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, *National Cancer Institute.* 2009
- Horsley V, Aliprantis AO, Polak L, et al. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell.* 2008; 132:299–310
- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD, 2012. Retrieved September 7, 2012.
- Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics.* 2006; 7:96
- Hua Z, Gu X, Dong Y, et al. PI3K and MAPK pathways mediate the BDNF/TrkB-increased metastasis in neuroblastoma. *Tumor Biol.* 2016; 37:16227-16236
- Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72:609–642
- Huttner WB, Kosodo Y. Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr Op Cell Biol.* 2005; 17:648-657
- Illmensee K, Mintz B. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1976; 73(2): 549-553
- Im KS, Jang YG, Shin JI, et al. CD44⁺/CD24⁻ cancer stem cells are associated with higher grade of canine mammary carcinomas. *Vet Pathol.* 2015;52(6):1041-1044

Im KS, Kim NH, Lim HY, Kim HW, Shin JI, Sur JH. Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Vet Pathol.* 2014;51(3):549-559

Im KS, Kim IH, Kim NH, et al. Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. *Vet J.* 2013; 195:366-372

Im KS, Kim NH, Lim HY, et al. Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Vet Pathol.* 2014;51(3):549-559

Imbschweiler I, Seehusen F, Peck CT et al. Increased p75 neurotrophin receptor expression in the canine distemper virus model of multiple sclerosis identifies aldynoglia Schwann cells that emerge in response to axonal damage. *Glia.* 2012;60:358-371

Inca et HAS. GUIDE - AFFECTION LONGUE DURÉE Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique Cancer du sein. 2010

Inca. Oncogénétique en 2014, consultations, laboratoires et prise en charge. 2016 (en ligne)

Inca (a). Les cancers en France, édition 2016. 2017 (en ligne)

Inca (b). Dépistage des cancers du sein. S'informer et décider. 2017 (en ligne)

Inca (c). Femmes porteuses d'une mutation de BRCA1 ou BRCA2 /Détection précoce du cancer du sein et des annexes et stratégies de réduction du risque, Collection recommandations et référentiels. 2017 (en ligne)

Insua D, Corredoira A, Gonzalez-Martinez A et al. Expression of p75^{NTR}, a marker for basal forebrain cholinergic neurons, in young and aged dogs with or without cognitive dysfunction syndrome. *J Alzheimers Dis.* 2012;28,291-296

Ip NY, Ibáñez CF, Nye SH, et al. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89:3060–3064

Ito D, Endicott MM, Jubala CM, et al. A tumor-related lymphoid progenitor population supports hierarchical tumor organization in canine B-cell lymphoma. *J Vet Intern Med.* 2011; 25:890-896

Ito D, Frantz AM, Modiano JF. Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014; 159(3-4):192-201

Iyengar NM, Gucalp A, Dannenberg AJ. Obesity and cancer mechanisms: tumor microenvironment and inflammation. *J Clin Oncol.* 2016; 34(35):4270-4277

Jesinger RA. Breast anatomy for the interventionalist. *Tech Vasc Interventional Rad.* 2013; 17:3-9

Jeter CR, Liu B, Liu X, et al. NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene.* 2011; 30(36):3833-45

Jhaveri K, Modi S. Ganetespib: research and clinical development. *Oncotargets Ther.* 2015; 8:1849-58

Jin H, Pan Y, Zhao L, et al. P75 neurotrophin receptor suppresses the proliferation of human gastric cancer cells. *Neoplasia.* 2007; 9:471-478

Johnson D, Lanahan A, Buck CR, et al. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell.* 1986; 47:545–554

- Jones RJ, Barber JP, Vala MS et al. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood*. 1995; 85(10):2742–2746
- Jones KR, Reichardt LF. Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:8060–8064
- Jordan CT. Cancer stem cells: controversial or just misunderstood? *Cell Stem Cell*. 2009; 4(3): 203–205
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009; 119(6): 1420-1428
- Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature*. 1991; 350, 158–160
- Karamboulas C, Ailles L. Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1830(2):2481–2495
- Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC et al. Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J Vet Med*. 2001; 48:85-96
- Kegler K, Spitzbarth I, Imbschweiler I et al. Contribution of Schwann cells to remyelination in a naturally occurring canine model of CNS neuroinflammation. *Plos One*. 2015;10(7),e0133916
- Khwaja F, Djakiew D. Inhibition of cell-cycle effectors of proliferation in bladder tumor epithelial cells by the p75NTR tumor suppressor. *Mol Carcinog*. 2003; 36:153–160
- Khwaja F, Tabassum A, Allen J, et al. The p75(NTR) tumor suppressor induces cell cycle arrest facilitating caspase mediated apoptosis in prostate tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 341:1184-92
- Khotskaya YB, Holla VR, Farago AF et al. Targeting TRK family proteins in cancer. *Pharmacol Ther*. 2017; 173:58-66
- Khoury T, Ademuyiwa FO, Chandrasekhar R, et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 expression in breast cancer is associated with stage, triple negativity, and outcome to neoadjuvant chemotherapy. *Mod Pathol*. 2012; 25:388–397
- Kida K, Ishikawa T, Yamada A, et al. Effect of aldh1 on prognosis and chemoresistance by breast cancer subtype. *Breast Cancer Res Treat*. 2016; 156: 261–269
- Kim HJ, Kim MJ, Ahn SH, et al. Different prognostic significance of CD24 and CD44 expression in breast cancer according to hormone receptor status. *The Breast*. 2011; 20:78-85
- Kim J, Chu J, Shen X, et al. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell*. 2008; 132:1049–1061
- Kim MS, Lee WS, Jin W. TrkB promotes breast cancer metastasis via suppression Runx3 and Keap1 expression. *Mol Cells*. 2016;39(3),258-265
- Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S at al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*. 2009; 139:1315–1326

Kim NH, Lim HY, Im KS, Kim JH, Sur JH. Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. *J Comp Path.* 2013; 148:298-306

Kim SY, Rhee J, Song X, et al. Breast cancer stem cell-like cells are more sensitive to ionizing radiation than non-stem cells: role of ATM. *PLoS One.* 2012; 7:e50423

Klauder JV. Interrelations of human and veterinary medicine. Discussion of some aspects of comparative dermatology. *New Engl J Med.* 1958; 258(4):170-177

Kléber M, Sommer L. Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16:681–687

Kleinsmith LJ, Pierce GB. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* 1964; 24:1544–1551

Kliemann M, Rattenholl A, Golbik R, et al. The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. *FEBS Lett.* 2004 ; 566:207–212

Klingbeil P, Natrajan R, Everitt G, et al. CD44 is overexpressed in basal-like breast cancers but is not a driver of 11p13 amplification. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;120:95-109

Klingemann H. Immunotherapy for dogs: running behind humans. *Front Immunol.* 2018; 9:133

Klopfleisch R, Gruber AD. Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. *Vet Pathol.* 2009; 46:416-422

Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell.* 2008; 132:583–597

Kol A, Arzi B, Athanasiou K, et al. Companion animals: translational scientist's new best friends. *Sci Transl Med.* 2015; 7(308): 308ps21

Kopan R, Ilagan MXG. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 2009; 137:216–233

Kornegay JN, Spurney CF, Nghiem PP, et al. Pharmacologic management of Duchenne muscular dystrophy: target identification and preclinical trials. *ILAR J.* 2014; 55(1):119-149

Kowianski P, Lietzau G, Czuba E, et al. BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signalling and synaptic plasticity. *Cell Mol Neurobiol.* 2018; 38:579-593

Kranenburg HJC, Hazewinkel HAW, Meij BP. Naturally occurring spinal hyperostosis in dogs as a model for human spinal disorders. *ILAR J.* 2014; 55(1):150-163

Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell.* 2014; 275-291

Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol.* 2004; 35:255-262

Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, et al. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:4906-4913

- Kristiansen VM, Peña L, Díez Córdova L, et al. Effect of ovariectomy at the time of tumor removal in dogs with mammary carcinomas: a randomized controlled trial. *J Vet Intern Med.* 2016; 30(1):230-241
- Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature.* 2006; 442(7104):818–822
- Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, et al. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell.* 2007; 129:999-1010
- Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, et al. Risks of breast, ovarian and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *JAMA.* 2017; 317(23):2402-16
- Kuroda T, Tada M, Kubota H, et al. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(6):2475–85
- Kurozumi S, Yamaguchi Y, Kurosumi M, et al. Recent trends in microRNA research into breast cancer with particular focus on the associations between microRNAs and intrinsic subtypes. *J Human Genet.* 2017; 62:15-24
- Kwon MJ, Han J, Seo JH, et al. CD24 overexpression is associated with poor prognosis in luminal A and triple-negative breast cancer. *Plos One.* 2015;10(10):e0139112
- Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E et al. TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene.* 2009; 28:1960-1970
- Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, et al. Radiation induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells.* 2012; 30:833–44
- Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, et al. Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment. *Breast Cancer Res.* 2010; 12: R13
- Lagadic M, Cohn-Bendit F. Les tumeurs mammaires dans l'espèce canine. *Prat Med Chir Anim Cie.* 1995; 30(4), 437-451
- Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development.* 2004; 131(5):965–973
- Lai PC, Chiu TH, Huang YT. Overexpression of BDNF and TrkB in human bladder cancer specimens. *Oncol Rep.* 2010; 24:1265-1270
- Lairmore MD, Khanna C. Naturally occurring diseases in animals: contributions to translational medicine. *ILAR J.* 2014; 55(1)
- Lakhani SR, O'Hare MJ. The mammary myoepithelial cell – Cinderella or ugly sister? *Breast Cancer Res.* 2001; 3(1):1-4
- Lakhani SN, van de Vijver MJ, Jacquemier J, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol.* 2002; 20(9):2310-2318

- Lana SE, Rutteman GR, Withrow SJ. Tumours of the mammary gland. In: Withrow SJ, Vail DM (eds) *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4th edn. 2007. Saunders, St Louis, p 619–636
- Landman Y, Ilouze M, Wein S, et al. Rapid response to Larotrectinib (LOXO-101) in an adult chemotherapy-naïve patients with advanced triple-negative secretory breast cancer expressing ETV6-NTRK3 fusion. *Clin Breast Can*. 2017
- Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited – the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer*. 2011; 128(11):2527-2535
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994; 367(6464):645–648
- Lascelles BDX, Knazovicky D, Case B et al. A canine-specific anti-nerve growth factor antibody alleviates pain and improves mobility and function in dogs with degenerative joint disease-associated pain. *BMC Vet Res*. 2015;11,101
- Lavalle GE, Bertagnolli AC, Tavares WLF, et al. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet Pathol*. 2009; 46:1275-1280
- Lavalle GE, de Campos CB, Bertagnolli AC, et al. Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. *In Vivo*. 2012; 26:375-380
- Lawn S, Krishna N, Pisklakova A, et al. Neurotrophin signalling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells. *J Biol Chem*. 2015; 290(6):3814-24
- Leblanc AK, Mazcko CN, Khanna C. Defining the value of a comparative approach to cancer drug development. *Clin Cancer Res*. 2015; 22(9):2133-2138
- Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature*. 2005; 437(7056):275-280
- Lee JS, Kim WG. Cutaneous metastases of breast cancer during adjuvant chemotherapy correlates with increasing CD44⁺/CD24⁻ and ALDH-1 expression: a case report and literature review. *Stem Cells Invest*. 2018; 5-7
- Lee R, Kermani P, Teng KK, et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 2001; 294:1945–1948
- Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, et al. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene*. 2011; 31:1354–65
- Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010; 141:1117–1134
- Lempp C, Spitzbarth I, Puff C et al. New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. *Viruses*. 2014;6,2571-2601
- Lequarré AS, Andersson L, André C, et al. LUPA : a European initiative taking advantage of the canine genome architecture for unravelling complex disorders in both human and dogs. *Vet J*. 2011; 189(2):155-9

- LeRoy BE, Northrup N. Prostate cancer in dogs: comparative and clinical aspects. *Vet J.* 2009; 180:149-162
- Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol.* 2003; 69:341–374
- Leung EL, Fiscus RR, Tung JW, et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One.* 2010; 5(11), e14062
- Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 1987; 237:1154-1162
- Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool.* 1951; 116(2): 321-61
- Lewis CE, Leek R, Harris A, et al. Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. *J leuk biol.* 1995; 57:747-751
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007; 67(3):1030–1037
- Li M, Belmonte JCI. Deconstructing the pluripotency gene regulatory network. *Nat Cell Biol.* 2018; 20:382-392
- Liang S, Furuhashi M, Nakane R, et al. Isolation and characterization of human breast cancer cells with SOX2 promoter activity. *Biochem Biophys Res Comm.* 2013; 437:205-211
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature.* 2005; 438(8):803-819
- Linn SC, Van't Veer LJ. Clinical relevance of the triple-negative breast cancer concept: genetic basis and clinical utility of the concept. *Eur J Cancer.* 2009; 45 Suppl 1: 11-26
- Liu H, Patel MR, Prescher JA, et al. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107(42):18115–18120
- Liu TJ, Sun BC, Zhao XL, et al. CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in a triple-negative breast cancer. *Oncogene.* 2013; 32:544-553
- Liu D, Xiong H, Ellis AE, et al. Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. *Cancer Res.* 2014; 74(18):5045-56
- Lobo NA, Shimono Y, Qian D, et al. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23:675–699
- London CA, Bear MD, McCleese J, et al. Phase I evaluation of STA-1474, a prodrug of the novel HSP90 inhibitor ganetespib, in dogs with spontaneous cancer. *PLoS One* 2011 ; 6 : e27018.
- London CA, Hannah AL, Zadovoskaya R et al. Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clin Can Res.* 2003;8,2755-2768

- London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL, et al. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:38566-3865
- Louderbough JMV, Schroeder JA. Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Mol Cancer Res.* 2011;9(12):1573-1586
- Lu X, Mazur SJ, Lin T, et al. The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Oncogene.* 2014; 33:2655-64
- Luberg K, Wong J, Weickert CS, et al. Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J Neurochem.* 2010; 113:952-964
- Ma J, Jiang Y, Jiang Y, et al. Expression of nerve growth factor and tyrosine kinase receptor A and correlation with perineural invasion in pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23:1852-1859
- Madrazo J, Garcia-Fernandez A, Garcia-Iglesias MJ, Duran AJ, Espinosa J, Pérez-Martinez C. The role of CD44 adhesion factor in canine mammary carcinomas. *Vet J.* 2009; 180:371-376
- Magalhaes GM, Silveira ACT, Munari DP, Alessi AC. Behavior of CD44 receptors in mammary tumors of dogs. *Open J Vet Med.* 2012;2:48-51
- Magalhaes GM, Terra EM, de Oliveira Vasconcelos R, et al. Immunodetection of cells with a CD44⁺/CD24⁻ phenotype in canine mammary neoplasms. *BMC Vet Res.* 2013;9:205
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, et al. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science.* 1990; 247:1446-1451
- Mak IWY, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res.* 2014; 6(2):114-118
- Mansar-Benhamza L, Watrelot D, Sarsat JC, et al. Les tumeurs mammaires chez la chienne : étude histologique. *Sciences & Technologie.* 2008 ; 27 :57-66
- Marcato P, Dean CA, Pan D, et al. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells.* 2011; 29:32-45
- Martin-Zanca D, Mitra G, Long LK, et al. Molecular characterization of the human trk oncogene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51(2):983-92
- Matos AJF, Baptista CS, Gärtner MF, Rutteman GR. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours : The need for standardized procedures. *Vet J.* 2012;193:24-31
- Matsui WH. Cancer stem cell signaling pathways. *Medicine.* 2016; 95:S8-S19
- Matsumoto T, Numakawa T, Adachi N, et al. Brain-derived neurotrophic factor enhances depolarization-evoked glutamate release in cultured cortical neurons. *J Neurochem.* 2001; 79: 522-530

- McCulloch EA, Till JE. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res.* 1960; 13:115-25
- McDonald NQ, Hendrickson WA. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell.* 1993; 73:421-24
- McDonald NQ, Chao MV. Structural determinants of neurotrophin action. *J Biol Chem.* 1995; 270:19669-72
- McGregor LM, Baylin SB, Griffin CA, et al. Molecular cloning of the cDNA for human TrkC (NTRK3), chromosomal assignment, and evidence for a splice variant. *Genomics.* 1994; 22:267-72
- McGregor LM, McCune BK, Graff JR, et al. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:4540-5
- McNeill CJ, Overley B, Shofer FS, et al. Characterization of the biological behaviour of appendicular osteosarcoma in Rottweilers and a comparison with other breeds: a review of 258 dogs. *Vet Comp Oncol.* 2007; 5(2):90-98
- Meldolesi J. Neurotrophin Trk receptors: new targets for cancer therapy. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2017;
- Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, et al. Cancer incidence in pet dogs: findings of the animal tumor registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med.* 2008; 22:976-984
- Mi S, Lee X, Shao Z, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci.* 2004; 7:221-228
- Michishita M, Akiyoshi R, Suemizu H, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in cancer stem cells from canine mammary carcinoma cell lines. *Vet J.* 2012; 193:508-513
- Michishita M, Akiyoshi R, Yoshimura H et al. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. *Res Vet Sci.* 2011;91: 254-260
- Middlemas DS, Kihl BK, Zhou J, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and chemoprotection of human neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 1999; 274:16451-16460
- Minn I, Wang H, Mease RC, et al. A red-shifted fluorescent substrate for aldehyde dehydrogenase. *Nat Comm.* 2014; 5:3662
- Mintz B, Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1975; 72(9):3585-89
- Misdorp W, Alse RW, Hellmen E, Lipscomb TP. *Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat.* 2nd series, Vol 7. Washington DC, USA: Armed forces institute of pathology and the American registry of pathology and the world health organization collaborating center for worldwide reference on comparative oncology; 1999.
- Misdorp W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten DJ, editor. *Tumors in domestic animals.* 4th ed. Ames, USA: Iowa State Press ; 2002. pp. 575-606. 3

- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003; 113:631–642
- Miyoshi Y, Shien T, Ogiya, A, et al. Differences in expression of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 among estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor type 2-negative breast cancer cases with early, late, and no recurrence. *Breast Cancer Res*. 2016; 18:73
- Moe L. Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl*. 2001; 57:439-43
- Monneur A, Gonçalves A, Bertucci F. Expression de PD-L1 et inhibiteurs de la voie PD-1/PD-L1 dans le cancer du sein. *Bull Cancer*. 2018 ;
- Morris JS, Dobson JM, Bostock DE. Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *Vet Rec*. 1993; 133(22):539-42
- Moulton JE, Rosenblatt LS, Goldman M. Mammary tumors in a colony of beagle dogs. *Vet Pathol*. 1986; 23:741-749
- Mousseau M, Garnier C. Cancer du sein : épidémiologie, bilan d'extension, modalités thérapeutiques. *Médecine nucléaire*, 2002 – Elsevier Masson
- Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, et al. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*. 2001; 276:12660–12666
- Musulino A, Bella MA, Bortesi B, et al. BRCA mutations, molecular markers, and clinical variables in early-onset breast cancer: a population-based study. *The Breast*. 2007; 16:280-292
- Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakos E, et al. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44⁺/CD24^{low} and CD44⁺/CD24⁺ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Hum Pathol*. 2008; 39:1096-1102
- Nadal R, Ortega FG, Salido M, et al. CD133 expression in circulating tumor cells from breast cancer patients: potential role in resistance to chemotherapy. *Int J Cancer*. 2013; 133:2398-2407
- Naesse EP, Schreurs O, Messelt E et al. Distribution of nerve growth factor, pro-nerve growth factor, and their receptors in human salivary glands. *Eur J Oral Sci*. 2013;121:13-20
- Nakagawara A, Liu XG, Ikegaki N, et al. Cloning and chromosomal localization of the human TrkB tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics*. 1995; 25:538-46
- Nakagawara A, Brodeur GM. Role of neurotrophins and their receptors in human neuroblastomas: a primary culture study. *Eur J Cancer Oxf Engl*. 1997; 33:2050– 2053.
- Nakamura K, Martin KC, Jackson JK, et al. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 2006; 66:4249–4255
- Nalbandian A, Djakiew D. The p75(NTR) metastasis suppressor inhibits urokinase plasminogen activator, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in PC-3 prostate cancer cells. *Clin Exp Metastasis*. 2006; 23:107-16

Neumüller RA, Knoblich JA. Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev.* 2009; 23:2675-2699

Neve RM, Chin K, Fridlyand J, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 2006 ; 10(6) :515-527

Nguyen F, Peña L, Ibsch C et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. *Breast Cancer Res Treat.* 2018; 167(3):635-648

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:5367-74

Nielsen L, Andreasen SN, Andersen SD, et al. Malignant histiocytosis and other causes of death in Bernese mountain dogs in Denmark. *Vet Rec.* 2010; 166:199-202.

Nieto MA, Cano A. The epithelial-mesenchymal transition under control: Global programs to regulate epithelial plasticity. *Sem Can Biol.* 2012; 22:361-368

Nieto A, Pérez-Alenza MD, Del Castillo N, et al. BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *J Comp Path.* 2003; 128(4):260-8

Novero A, Ravella PM, Chen Y, et al. Ibrutinib for B-cell malignancies. *Exp Hematol Oncol.* 2014; 3:4

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976; 194(4260):23–28

Nykjaer A, Lee R, Teng KK, et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature.* 2004; 427: 843–848

Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM. p75^{NTR} - live or let die. *Curr Opin Neurobiol.* 2005; 15:49–57

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007; 445:106–110

O'Brien CA, Kreso A, Jamieson CHM et al. Cancer stem cells and self-renewal. *Clin Can Res.* 2010; 16(12):3113-20

O'Connor TP, Crystal RG. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nat Rev Genet.* 2006; 7:261-276

Odegaard E, Staff AC, Abeler VM, et al. The activated nerve growth factor receptor p-TrkA is selectively expressed in advanced-stage ovarian carcinoma. *Hum Pathol.* 2007; 38:140-6

Okamura K, Harada T, Wang S, et al. Expression of TrkB and BDNF is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth.* 2012; 78:100–106

O'Neill DG, Church DB, McGreevy PD, et al. Longevity and mortality of owned dogs in England. *Vet J.* 2013; 198:638-643

O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *The Review on antimicrobial resistance.* 2016

- Orian-Rousseau V, Sleeman J. CD44 is a multidomain signaling platform that integrates extracellular matrix cues with growth factor and cytokine signals. In : Simpson M, Heldin P, *Advances in Cancer Research Volume 123 : Hyaluronan Signaling and Turnover*, Academic Press; 2014:231-254
- Osto M, Lutz TA. Translational value of animal models of obesity – focus on dogs and cats. *Eur J Pharmacol.* 2015; 759:240-252
- Otoni CC, Rahal SC, Vulcano LC, et al. Survey radiography and computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors. *Acta Vet Scand.* 2010; 52:20
- Owen LN, World Health Organization. Veterinary Public Health Unit & WHO Collaborating Center for Comparative Oncology. TNM Classification of Tumours in Domestic Animals. 1980.
- Owens TW, Naylor MJ. Breast cancer stem cells. *Front Physiol.* 2013; 4:225
- Paltian V, Alldinger S, Baumgärtner W, Wohlsein P. Expression of CD44 in canine mammary tumors. *J Comp Path.* 2009;141,237-247
- Pang LY, Cervantes-Arias A, Else RW, et al. Canine mammary cancer stem cells are radio- and chemo-resistant and exhibit an epithelial-mesenchymal transition phenotype. *Cancers.* 2011; 3:1744-62
- Pang R, Law WL, Chu AC, et al. A subpopulation of CD26⁺ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell.* 2010; 6(6):603–615
- Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Can.* 2004; 4:448-56
- Paoloni MC, Khanna C. Comparative oncology today. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2007; 37(6):1023-v
- Paoloni MC, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer.* 2014; 8(2):147-56
- Papaetis GS, Syrigos KN. Sunitinib. A multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in the era of molecular cancer therapies. *Biodrugs.* 2009; 23(6):377-389
- Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(3):876-87
- Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell.* 2011; 8(5):486–498
- Patani N, Jiang WG, Mokbel K. Brain-derived neurotrophic factor expression predicts adverse pathological and clinical outcomes in human breast cancer. *Cancer Cell International.* 2011; 11:23
- Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* 2001 ; 11 :272–280
- Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2⁺ and ABCG2⁻ cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res.* 2005; 65:6207–6219
- Patsikas MN, Dessiris A. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part I: The 1st, 2nd, 4th and 5th mammary glands. *Anat Histo Embryol.* 1996; 25:131–138

- Patsikas MN, Dessiris A. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study, part II: the 3rd mammary gland. *Anat Histo Embryol.* 1996; 25:139–143
- Patsikas MN, Karayannopoulou M, Kaldrymidoy E, et al. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat Histol Embryol.* 2006; 35:228-234
- Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells—what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov.* 2014; 13(7):497–512
- Patterson EE. Canine epilepsy: an underutilized model. *ILAR J.* 2014; 55(1):182-186
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 2007; 7:415–428
- Peña L, De Andrés PJ, Clemente M, et al. Prognostic value of histological grading in non-inflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol.* 2013; 50:94-105
- Pereira CT, Rahal SC, de Carvalho Balieiro JC, et al. Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? *Anat Histol Embryol.* 2003; 32, 282-290
- Pereira CT, Luis Navarro Marques F, Williams J, et al. ^{99m}Tc-labeled dextran for mammary lymphoscintigraphy in dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 2008; 49(5):487-491
- Pérez-Alenza MD, Rutteman GR, Peña L, et al. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J Vet Intern Med.* 1998; 12:132-139
- Pérez-Alenza MD, Peña L, Del Castillo N, et al. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract.* 2000; 41:287-291
- Pérez-Alenza MD, Tabanera E, Peña L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *JAVMA.* 2001; 219(8):1110-1114
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406:747-752
- Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, et al. Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem.* 1997; 272:3599–3605
- Phillips T, McBride W, Pajonk F. The response of CD24^(-low)/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98:1777–85
- Pierotti MA, Greco A. Oncogenic rearrangements of the NTRK1/NGF receptor. *Cancer Lett.* 2006; 232: 90-8
- Pincelli C. p75 Neurotrophin receptor in the skin: beyond its neurotrophic function. *Frontiers in Medicine.* 2017; 4:22
- Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2007; 17(1):45–51
- Polyak K, Hu M. Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2005; 10(3):231-247

- Pinello KC, Santos M, Leite-Martins L, et al. Immunocytochemical study of canine lymphomas and its correlation with exposure to tobacco smoke. *Vet World*. 2017; 10(11):1307-1313
- Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell stem cell*. 2015; 16(3):225-238
- Polk A, Svane IM, Andersson M. Checkpoint inhibitors in breast cancer – current status. *Cancer Treat Rev*. 2018; 63:122-134
- Ponce F, Marchal T, Magnol JP, et al. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol*. 2010; 47(3):414-433
- Popnikolov NK, Cavone SM, Schultz PM et al. Diagnostic utility of p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) as a marker of breast myoepithelial cells. *Mod Pathol*. 2005; 18:1535-1541
- Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the Crypt. *Development*. 1990; 110:1001-1020
- Poujol L, Faucher M, Laborde M, et al. A propos d'un cas de carcinose cutanée chez une chienne. *Revue Med Vet*. 2005; 156(3):130-132
- Powell JC, Twomey C, Jain R, et al. Association between Presenilin-1 and TRAF6 modulates regulated intramembrane proteolysis of the p75^{NTR} neurotrophin receptor. *J Neurochem*. 2009; 108:216–230
- Pretzer SD. Canine embryonic and fetal development: a review. *Theriogenology*. 2008; 70:300-303
- Queiroga FL, Raposo T, Carvalho MI, et al. Canine mammary tumors as a model to study human breast cancer: most recent findings. *In vivo*. 2011; 25:455-466
- Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Nat Can Inst*. 2014; 106(5)
- Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, et al. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature*. 1987; 325:593–597
- Raica M, Jung I, Cimpean AM, et al. From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: are we ready for the change? *Rom J Morphol Embryol*. 2009; 50(1): 5-13
- Ranieri G, Passantino L, Patruno R et al. The dog mast cell tumour as a model to study the relationship between angiogenesis, mast cell density and tumour malignancy. *Oncol Rep*. 2003; 10(5):1189-93
- Ranieri G, Gadaleta CD, Patruno R, et al. A model of study for human cancer: spontaneous occurring tumors in dogs. Biological features and translation for new anticancer therapies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013; 88:187-197
- Raposo TP, Arias-Pulido H, Chaher N, et al. Comparative aspects of canine and human inflammatory breast cancer. *Sem Oncol*. 2017; 44(4):288-300
- Rasotto R, Berlato D, Goldschmidt MH, et al. Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: an observational cohort study of 229 cases. *Vet Pathol*. 2017; 1-8

- Regulski M, Regulska K, Prukala W, et al. COX-2 inhibitors: a novel strategy in the management of breast cancer. *Drug Disc Tod.* 2016; 21(4):598-615
- Rehm S, Stanislaus DJ, Williams AM. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Res.* 2007; 80:233-245
- Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signaling pathways. *Phil Trans R Soc B.* 2006; 361:1545-1564
- Reis-Filho JS, Steele D, Di Palma S et al. Distribution and significance of nerve growth factor receptor (NGFR/p75^{NTR}) in normal, benign and malignant breast tissue. *Mod Pathol.* 2006; 19:307-319
- Renné C, Minner S, Kuppers R, et al. Autocrine NGFbeta/TRKA signalling is an important survival factor for Hodgkin lymphoma derived cell lines. *Leuk Res.* 2008; 32:163-7
- Ressel L, Puleio R, Ruggero Loria G, et al. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Res Vet Sci.* 2013; 94:299-305
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001; 414:105–11
- Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol.* 1996; 175:1–13
- Riccardo F, Aurisicchio L, Impellizeri JA, et al. The importance of comparative oncology in translational medicine. *Cancer Immunol Immunother.* 2015; 64(2):137-48
- Rico MJ, Perroud HA, Herrera C et al. Putative biomarkers of response to treatment in breast cancer patients: a pilot assay. *Cancer Invest.* 2017;35(6):377-385
- Rivera P, Melin M, Biagi T, et al. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res.* 2009; 69(22):8770-74
- Rodríguez-Tébar A, Dechant G, Barde YA. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron.* 1990; 4:487–492
- Rodríguez-Tébar A, Dechant G, Götz R, et al. Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* 1992; 11: 917–922
- Roesler R, de Farias CB, Abujamra AL, et al. BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011; 11:1473–1475
- Rolfo C, Ruez L. New targets bring hope in squamous cell lung cancer: neurotrophic tyrosine kinase gene fusions. *Lab Invest.* 2017; 97:1268-1270
- Roode SC, Rotroff D, Avery AC, et al. Genome-wide assessment of recurrent genomic imbalances in canine leukemia identifies evolutionarily conserved regions for subtype differentiation. *Chromosome Res.* 2015; 23:681-708
- Rosenthal A, Goeddel DV, Nguyen T, et al. Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron.* 1990; 4:767–773

- Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol.* 2002; 67:203–233
- Roux PP, Bhakar AL, Kennedy TE, et al. The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinasedependent pathway. *J Biol Chem.* 2001; 276: 23097–23104
- Russo J, Russo IH. Development of the human breast. *Maturitas.* 2004; 49:2-15
- Russo M, Misale S, Wei G, et al. Acquired resistance to the TRK inhibitor entrectinib in colorectal cancer. *Cancer Disc.* 2016; 6:36-44
- Rutteman GR, Withrow SJ, MacEwen EG. Tumors of the mammary gland, 2001, p.455-477. In: Withrow S.J. & MacEwen E.G. (Eds), *Small Animal Clinical Oncology*. 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Rybicka A, Eyileten C, Taciak B et al. Tumour-associated macrophages influence canine mammary cancer stem-like cells enhancing their pro-angiogenic properties. *J Physiol Pharmacol.* 2016;67(4),491-500
- Rybicka A, Mucha J, Majchrzak K et al. Analysis of microRNA expression in canine mammary cancer stem-like cells indicates epigenetic regulation of transforming growth factor-beta signaling. *J Physiol Pharmacol.* 2015;66(1),29-37
- Rybicka AM, Tierny D. Le chien de compagnie, chaînon manquant dans le développement de médicaments contre le cancer pour l'homme. *Innov Ther Oncol.* 2017; 3(5-6):257-262
- Rycaj K, Tang DG. Cancer stem cells and radioresistance. *Int J Radiat Biol.* 2014;90(8):615-621
- Rydén M, Ibañez CF. Binding of neurotrophin-3 to p75LNGFR, TrkA, and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by trkC. *J Biol Chem.* 1996; 271: 5623-27
- Sahora A, Khanna C. A survey of evidence in the Journal of Veterinary Internal Medicine Oncology manuscripts from 1999 to 2007. *J Vet Intern Med.* 2010; 24:51-56
- Saito-Diaz K, Chen TW, Wang X, et al. The way Wnt works: components and mechanism. *Growth Factors Chur Switz.* 2013; 31:1–31
- Sakamoto Y, Kitajima Y, Edakuni G et al. Combined evaluation of NGF and p75NGFR expression is a biomarker for predicting prognosis in human invasive ductal breast carcinoma. *Oncol Reports.* 2001; 8:973-980
- Samanta D, Semenza GL. In vitro assays of breast cancer stem cells. In *Hypoxia: Methods and protocols, Methods in Molecular Biology*, vol 1742, ed.L.Eric Huang, 2018
- Sanchez-Cespedes R, Millan Y, Guil-Luna S, et al. Myoepithelial cell layer integrity in canine mammary carcinoma. *J Comp Path.* 2011;145:25-30
- Sanchez-Cespedes R, Millan Y, Guil-Luna S, et al. Myoepithelial cells in canine mammary tumors. *Vet J.* 2016;207,45-52
- Santos M, Marcos R, Faustino AMR. Histological study of canine mammary gland during the oestrous cycle. *Reprod Dom Anim.* 2010; e146-e154

- Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*. 2013; 12:15–30
- Sassi F, Banzzi C, Castellani G, et al. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Vet Res*. 2010; 6-5
- Saunders LZ. Virchow's contributions to veterinary medicine: celebrated then forgotten now. *Vet Pathol*. 2000; 37:199-207
- Sayag D, Fournel-Fleury C, Ponce F. Prognostic significance of morphotypes in canine lymphomas: a systematic review of literature. *Vet Comp Oncol*. 2018;16:12-19
- Schafer KA, Kelly G, Schrader R, et al. A canine model of familial mammary gland neoplasia. *Vet Pathol*. 1998; 35:168-177
- Scheel C, Eaton EN, Li SH, et al. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell*. 2011; 145(6): 926–940
- Schepers GE, Teasdale RD, Koopman P et al. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell*. 2002; 3:167–170
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000; 103: 211–225
- Schneider R, Dorn CR, Taylor DON. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst*. 1969; 43:1249-1261
- Schneider R. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer*. 1970; 26:419-426
- Schwabe C. Veterinary medicine and human health. 3rd Ed. Baltimore : Williams & Wilkins 1984
- Sclabas GM, Fujioka S, Schmidt C, et al. Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2005 ; 11 :440–449
- Segal RA, Bhattacharyya A, Rua LA, et al. Differential utilization of Trk autophosphorylation sites. *J Biol Chem*. 1996; 271, 20175–20181
- Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, et al. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J*. 1996; 314(3):951–960
- Semenza GL. The hypoxic tumor microenvironment: a driving force for breast cancer progression. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1863(3):382–391
- Seo AN, Lee HJ, Kim EJ, et al. Expression of breast cancer stem cell markers as predictors of prognosis and response to trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *Br J Cancer*. 2016; 114:1109-1116
- Shaw FL, Harrison H, Spence K et al. A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2012; 17(2):111–117
- Shipitsin M, Polyak K. The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 2008; 88:459–463
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68:7-30

- Simeon C. Tumeurs mammaires : Facteurs pronostiques et prise en charge raisonnée. *L'Essentiel*. 2014 ; 319 :18-20
- Simeon C, Pepin-Richard C, Fine M. Traitement multimodal d'un carcinome mammaire inflammatoire: chirurgie, chimiothérapie et AINS COX-2 sélectif. *Prat Med Chir An Comp*. 2013; 48:79-86
- Siminovitch L, McCulloch A, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol*. 1963;327-336
- Simon D, Schoenrock D, Baumgärtner W, et al. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *J Vet Intern Med*. 2006; 20:1184-1190
- Smit MA, Geiger TR, Song JY, et al. A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis. *Mol Cell Biol*. 2009; 29:3722–3737
- Smith K, Dalton S. Myc transcription factors: key regulators behind establishment and maintenance of pluripotency. *Regen Med*. 2010; 5:947–959
- Smith SC, Oxford G, Wu Z, et al. The metastasis-associated gene CD24 is regulated by Ras GTPase and is a mediator of cell proliferation and survival in human cancer. *Cancer Res*. 2006; 66(4):1917-22
- Søland TM, Brusevold IJ, Koppang HS, et al. Nerve growth factor receptor (p75 NTR) and pattern of invasion predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2008; 53:62–72
- Sonnenschein EG, Glickman LT, Goldschmidt MH, et al. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Am J Epidemiol*. 1991; 133(7):694-703
- Sorenmo KU. Canine mammary gland tumors. *Vet Clin Small Anim*. 2003; 33:573-596
- Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, et al. Canine mammary gland tumours ; a histological continuum from benign to malignant ; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol*. 2009; 7(3):162-172
- Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, et al. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol*. 2011; 48(1):85-97
- Sorenmo KU, Worley DR, Goldschmidt MH. Tumors of the mammary gland. In : Saunders DV, ed. *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology* 5th Ed. St-Louis,MO : Saunders; 2013:538-556
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(19):10869-74
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 ;100(14) :8418-23
- Spitzbarth I, Lempp C, Kegler K et al. Immunohistochemical and transcriptome analyses indicate complex breakdown of axonal transport mechanisms in canine distemper leukoencephalitis. *Brain and behavior*. 2016; 6(7):e00472
- Squazzo SL, O'Geen H, Komashko VM, et al. Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner. *Genome Res*. 2006; 16:890–900

Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, et al. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLCgamma1 to mediate NGF responses. *Neuron*. 1994; 12: 691–705

Sternlicht MD, Kedeshian P, Shao ZM et al. The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clin Cancer Res*. 1997; 3:1949-1958

Stingl J, Eirew P, Ricketson I, et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*. 2006; 439:993-997

Stoica G, Lungu G, Martini-Stoicas H, et al. Identification of cancer stem cells in dog glioblastoma. *Vet Pathol*. 2009; 46:391-406

Stoilov P, Castren E, Stamm S. Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 290:1054–1065

Stovring M, Moe L, Glattre E. A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *APMIS*. 1997; 105(8):590-6

Stratmann N, Failing K, Richter A, et al. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Vet Surg*. 2008; 37:82-86

Straw RC. Treatment of mammary gland tumors and perianal neoplasia. The North American Veterinary Conference – 2005 Proceedings. 671-675

Streiter S, Fisch B, Sabbah B et al. The importance of neuronal growth factors in the ovary. *Mol Human Reprod*. 2016; 22(1):3-17

Sundberg JP, Schofield PN. One medicine, one pathology, and the one health concept. *J Am Vet Med Assoc*. 2009; 234(12)

Suter U, Heymach JV, Shooter EM. Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. *EMBO J*. 1991; 10:2395–2400

Tabassum A, Khwaja F, Djakiew D. The p75(NTR) tumor suppressor induces caspase-mediated apoptosis in bladder tumor cells. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2003; 105:47–52

Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, et al. TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell*. 2004; 6:347–360

Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, et al. Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma. *Future Oncol Lond Engl*. 2005; 1:689–698

Tajbakhsh A, Mokhtari-Zaer A, Rezaee M et al. Therapeutic potentials of BDNF/TrkB in breast cancer; current status and perspectives. *J Cell Biochem*. 2017; 9999:1-14

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126:663-676

Takebe N, Miele L, Harris PJ, et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015; 12(8):445–464

Takashima-Uebelhoer BB, Barber LG, Zagarins SE, et al. Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human non-hodgkin's lymphoma. *Environ Res.* 2012; 112:171-176

Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 2010; 70(14):5649-5669

Taylor GN, Shabestari L, Williams J, et al. Mammary neoplasia in a closed beagle colony. *Cancer Res.* 1976; 36:2740-43

Thamm DH, Grunerud KK, Rose BJ, et al. DNA repair deficiency as a susceptibility marker for spontaneous lymphoma in golden retriever dogs: a case-control study. *PlosOne.* 2013; 8(7):e69192

Thiagajaran PS, Hitomi M, Hale JS, et al. Development of a fluorescent reporter system to delineate cancer stem cells in triple-negative breast cancer. *Stem Cells.* 2015; 33(7):2114-2125

Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On Trk—The TrkB Signal Transduction Pathway Is an Increasingly Important Target in Cancer Biology. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:5962–5967

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7:131-142

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282:1145–1147

Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961; 12:213-222

Tomellini E, Touil Y, Lagadec C et al. Nerve growth factor and proNGF simultaneously promote symmetric self-renewal, quiescence, and epithelial to mesenchymal transition to enlarge the breast cancer stem cell compartment. *Stem Cells.* 2015;33(2):342-53.

Tomita H, Tanaka K, Tanaka T, et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget.* 2016; 7(10):11018-32

Tomita H, Kaori T, Kenji H, et al. The Role of Aldehyde Dehydrogenase 1A1 in Stem Cells and Cancer Stem Cells. *Cancer Cell Microenviron.* 2015; 2: e1064.

Tonomura N, Elvers I, Thomas R, et al. Genome-wide association study identifies shared risk loci common to two malignancies in golden retrievers. *PloS Genet.* 2015; 11(2): e1004922

Tran CM, Moore AS, Frimberger AE. Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. *Vet Comp Oncol.* 2014

Tremere LA, Pinaud R, Grosche J et al. Antibody for human p75 LNTR identifies cholinergic basal forebrain of non-primate species. *Neuroreport.* 2000; 11(10):2177-2183

Trumpp A, Essers M, Wilson A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:201–209

Truzzi F, Marconi A, Lotti R, et al. Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol.* 2008; 128:2031–2040

Tsai YF, Tseng LM, Hsu CY et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-TrkB signaling modulates cancer-endothelial cells interaction and affects the outcomes of triple negative breast cancer. *PLoS ONE*. 2017;12(6):e0178173

Tsang JYS, Wong KHY, Lai MWH, et al. Nerve growth factor receptor (NGFR): a potential marker for specific molecular subtypes of breast cancer. *J Clin Pathol*. 2013;66:291-296

Tumbar T, Guasch G, Greco V, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science*. 2004; 13:303(5656):359-363

Tume L, Paco K, Ubidia-Incio R, et al. CD133 in breast cancer cells and in breast cancer stem cells as another target for immunotherapy. *Gac Mex Oncol*. 2016 ; 15(1) :22-30

Turpin A, Mailliez A, Vennin P, et al. Bilan d'extension des cancers du sein : résultats et conséquences cliniques. *Gyn Obst Fert*. 2014

Tutt A, Yarnold J. Radiobiology of breast cancer. *Clin Oncol*. 2006; 18:166–78

Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, et al. An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J*. 1995; 14:2795–2805

Van Garderen E, de Wit M, Voorhout WF, et al. Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. *Am J Pathol*. 1997; 150(3):1037-1047

Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002; 415(6871):530-6

Vanhecke E, Adriaenssens E, Verbeke S et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. *Clin Can Res*. 2011; 17:1741-1752

Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7:659-672

Vega JA, Garcia-Suarez O, Germana A. Vertebrate thymus and the neurotrophin system. *Int Rev Cyt*. 2004; 237:155-204

Vega S, Morales AV, Ocaña OH, et al. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev*. 2004; 18:1131-1143

Verbeke S, Meignan S, Lagadec C et al. Overexpression of p75^{NTR} increases survival of breast cancer cells through p21^{waf1}. *Cell Signalling*. 2010; 22:1864-1873

Verbeke S, Tomellini E, Dhamani F, et al. Extracellular cleavage of the p75 neurotrophin receptor is implicated in its pro-survival effect in breast cancer cells. *FEBS Lett*. 2013; 587(16):2591-6

Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, et al. Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron*. 2009; 62:72–83

Visvader JE. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev*. 2009; 23:2563-77

- Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(10):755–768
- Vlashi E, Kim K, Lagadec C, et al. In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 101:350–9
- Vogel CL, Cableigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002; 20(3):719-726
- Vonderheide RH, Domchek SM, Clark AS. Immunotherapy for breast cancer: what are we missing? *Clin Can Res*. 2017; 23(11):2640-6
- Voz ML, Van de Ven WJM, Kas K. First insights into the molecular basis of pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Adv Dent Res*. 2000; 14(1):81-83
- Walshe JM, Swain SM. Clinical aspects of inflammatory breast cancer. *Breast disease*. 2005; 22:35-44
- Wang YJ, Herlyn M. The emerging roles of Oct4 in tumor initiating cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015; 309: C709-18
- Washbrook E. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Women's health Med*. 2006; 3(1):8-14
- Watson FL, Porcionatto MA, Bhattacharyya A, et al. TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J Neurobiol*. 1999; 39:323–336
- Wayne RK, Ostrander EA. Origin, genetic diversity, and genome structure of the domestic dog. *BioEssays*. 1999; 21:247-257
- Webster JD, Dennis MM, Dervisis N, et al. Recommended guidelines for the conduct and evaluation of prognostic studies in veterinary oncology. *Vet Pathol*. 2011;48(1),7-18
- Weiss L. Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s. *Can Met Rev*. 2000; 19, 3-4, I-XI, 193-383
- Wells S, Bennett A, Walsh P, et al. Clinical usefulness of intradermal fluorescein and patent blue violet dyes for sentinel lymph node identification in dogs. *Vet Comp Oncol*. 2006; 4(2):114-122
- Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007; 448:318–324
- Wiesmann C, Ultsch MH, Bass SH, et al. Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature*. 1999; 401:184-8
- Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, et al. Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Vet J*. 2008; 175:69-75
- Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology 5th Ed. St-Louis, MO : Saunders; 2013
- Wolchok JD, Yuan J, Houghton AN, et al. Safety and immunogenicity of tyrosinase DNA vaccines in patients with melanoma. *Mol Ther*. 2007; 15:2044-50
- Woodward W, Chen M, Behbod F, et al. On mammary stem cells. *J Cell Sci*. 2005; 118:3585-94

- Woodward W, Chen M, Behbod F, et al. WNT/beta catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:618–23
- Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, et al. Brca1 breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res*. 2008; 10: R10.
- Wu C, Alman BA. Side population cells in human cancers. *Cancer Lett*. 2008; 268:1–9
- Wu J, Yamauchi T, Belmonte JCI. An overview of mammalian pluripotency. *Development*. 2016; 143:1644-48
- Xiong J, Zhou L, Lim Y, et al. Mature BDNF promotes the growth of glioma cells in vitro. *Oncol Rep*. 2013; 30:2719–2724
- Xu R, Duan SR, Zhao JW et al. Changes in expression of BDNF and its receptors TrkB and p75^{NTR} in the hippocampus of a dog model of chronic alcoholism and abstinence. *Braz J Med Biol Res*. 2015; 48(8),703-710
- Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2006; 354:270-82
- Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*. 2010; 465:704-712
- Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Prolif*. 2008; 41 Suppl 1:51-6
- Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007; 1:39–49
- Yan H, Chao MV. Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J Biol Chem*. 1991; 266:12099–12104
- Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise review: emerging role of CD44 in cancer stem cells: a promising biomarker and therapeutic target. *Stem Cells Transl Med*. 2015; 4:1033-1043
- Yancey MF, Merritt DA, Lesman SP, et al. Pharmacokinetic properties of toceranib phosphate (Palladia™, SU11654), a novel tyrosine kinase inhibitor, in laboratory dogs and dogs with mast cell tumors. *J Vet Pharmacol Therap*. 2010;33,162-171
- Yancey MF, Merritt DA, White JA, et al. Distribution, metabolism, and excretion of toceranib phosphate (Palladia™, SU11654), a novel tyrosine kinase inhibitor, in dogs. *J Vet Pharmacol Therap*. 2010;33,154-161
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004; 117:927–939
- Yano H, Chao MV. Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharm Acta Helv*. 2000; 74:253–260
- Ye F, Zhong X, Qiu Y, et al. CD49f can act as a biomarker for local or distant recurrence in breast cancer. *J Breast Can*. 2017; 20(2):142-149

- Ye X, Tam WL, Shibue T, et al. Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature*. 2015; 525(7568):256-260
- Yin B, Ma ZY, Zhou ZW et al. The TrkB⁺ cancer stem cells contribute to post-chemotherapy recurrence of triple negative breast cancers in an orthotopic mouse model. *Oncogene*. 2015; 34:761-770
- Yu F, Yao H, Zhu P, et al. Let-7 regulates self-renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*. 2007; 131(6):1109–1123
- Yu Y, Zhang S, Wang X, et al. Overexpression of TrkB promotes the progression of colon cancer. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2010; 118:188–195
- Yuanlong H, Haifeng J, Xiayin Z, et al. The inhibitory effect of p75 neurotrophin receptor on growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2008
- Zhang J, Wang LS, Ye SL, Luo P, Wang BL. Blockage of tropomyosin receptor kinase a (TrkA) enhances chemo-sensitivity in breast cancer cells and inhibits metastasis in vivo. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(1):634-641
- Zhang Y, Li W, Laurent T, et al. Small molecules, big roles – the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming. *J Cell Sci*. 2012; 125:5609-5620
- Zheng Q, Banaszak L, Fracci S, et al. Leptin receptor maintains cancer stem-like properties in triple negative breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2013; 20(6):797-808
- Zhong Y, Lin Y, Shen S, et al. Expression of ALDH1 in breast invasive ductal carcinoma: An independent predictor of early tumor relapse. *Cancer Cell Int*. 2013; 13:60
- Zhou L, Jiang Y, Yan T, et al. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: A meta-analysis of published literatures. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 122:795–801
- Zhou B, Jin Y, Zhang D, et al. 5-Fluorouracil may enrich cancer stem cells in canine mammary tumor cells in vitro. *Oncol Letters*. 2018; 15:7987-92
- Zhu Z, Kleeff J, Kaye H, et al. Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog*. 2002; 35:138–147

Annexes

Numéro	Age (années)	Race	Stérilisé ou non E = Entier ; S = Stérilisé ; NA = Non applicable	Vivant ou Décédé V = Vivant ; D = Décédé ; NA = Non applicable	Censuré 0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable	Survie (jours)	Récidive locale 0 = Non 1= Oui
1	12	Fox Terrier	E	D	0	217	0
2	15.36	Yorkshire	E	V	1	730	0
3	13.12	Yorkshire	E	V	1	730	0
4	10.80	Tervueren	E	D	0	187	1
5	6.12	Yorkshire	S	D	1	437	0
6	11.33	Teckel	E	D	0	249	0
7	12.41	Bichon	E	V	1	730	0
8	7.73	Beauceron	E	D	0	493	1
9	11.32	Jack Russell	S	D	0	12	0
10	8.84	Fox Terrier	E	V	1	730	0
11	9.92	Bichon	E	D	0	534	0
12	9.55	Husky	S	V	1	730	0
13	11.68	Teckel	E	D	0	108	1
14	11.47	Schnauzer	E	V	1	730	0
15	9.76	Caniche	S	D	1	425	0
16	8.21	Bulldog	E	V	1	730	1
17	12.10	Epagneul breton	E	D	0	95	0
18	10.41	Yorkshire	E	D	1	217	0
19	9.04	Labrador	E	D	1	137	0
20	7.03	Bouledogue anglais	E	V	1	730	0
21	9.78	Leonberg	S	D	1	517	1
22	11.69	Croisé	E	V	1	730	0
23	7	Croisé	E	V	1	367	0
24	3.34	Bichon	E	V	1	730	0
25	9.37	Boxer	E	V	1	730	0
26	11.74	Amstaff	NA	NA	NA	NA	NA
27	11.57	Croisé	S	V	1	730	0
28	10.09	Bichon	E	V	1	730	0
29	11.64	Yorkshire	E	D	1	164	0
30	7.29	Braque allemand	E	V	1	730	0
31	9.37	Setter anglais	E	V	1	730	0
32	6.84	Cocker	E	V	1	730	0
33	8.22	Yorkshire	E	D	1	390	0
34	9	Croisé	NA	D	0	77	0
35	8.03	Bouledogue français	E	V	1	130	0
36	7.73	Labrador	E	D	1	525	0
37	13	Samoyede	E	D	1	249	0
38	11	Griffon	NA	NA	NA	NA	NA
39	10.97	Bichon	E	V	1	730	1
40	9.63	Beagle	E	V	1	730	0
41	10.78	Shih Tzu	E	V	1	730	0
42	10	Shih Tzu	S	V	1	730	0
43	12	Shih Tzu	NA	D	1	408	0
44	NA	Beauceron	E	D	0	50	0
45	11.5	Caniche	E	V	1	730	0
46	9	Bouledogue français	S	V	1	395	0
47	11.94	Shih Tzu	E	D	0	113	1
48	9	Epagneul breton	E	D	1	230	0
49	11	Boxer	NA	NA	NA	NA	NA
50	9.09	Yorkshire	E	V	1	730	0
51	11.6	Bouvier bernois	S	D	0	268	0
52	9.51	Epagneul breton	E	V	1	730	0
53	9.18	Yorkshire	NA	V	1	730	0
54	9.81	Boxer	E	D	1	172	1
55	10.2	Labrador	S	NA	NA	NA	NA
56	10	Draathaar	NA	D	0	51	0

Numéro	Age (années)	Race	Stérilisé ou non	Vivant ou Décédé	Censuré	Survie (jours)	Récidive locale
			E = Entier ; S = Stérilisé ; NA = Non applicable	V = Vivant ; D = Décédé ; NA = Non applicable	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable		0 = Non 1= Oui
57	12	Coton de Tuléar	NA	D	0	13	0
58	9.73	Berger allemand	E	V	1	730	0
59	4.62	Croisé	S	V	1	730	0
60	13.23	Croisé	E	D	0	124	0
61	7	Berger allemand	S	NA	NA	NA	NA
62	9.59	Croisé	E	V	1	730	0
63	9.16	Epagneul breton	E	V	1	730	0
64	9.09	Alaskan Malamute	E	D	0	608	1
65	10	Shih Tzu	E	NA	NA	NA	NA
66	10.87	Epagneul breton	S	NA	NA	NA	NA
67	12.22	Affenpinscher	E	D	1	339	0
68	9.02	Beagle	E	D	0	138	1
69	13	Epagneul breton	S	NA	NA	NA	NA
70	10.41	Cocker	E	V	1	730	1
71	15.45	Yorkshire	S	D	0	23	0
72	9.28	Yorkshire	E	NA	NA	NA	NA
73	11.98	West Highland White Terrier	E	D	0	313	0
74	7	Cavalier King Charles	E	V	1	390	0
75	15.25	Yorkshire	S	D	1	356	0
76	7.36	Irish Wolfhound	S	D	0	214	0
77	8.33	Malinois	E	V	1	399	0
78	9.39	Croisé	E	V	1	370	1
79	9.18	Braque allemand	E	V	1	265	0
80	7.84	Jack Russel	E	V	1	30	0
81	11.26	West Highland White Terrier	E	NA	NA	NA	NA
82	9.27	Boxer	E	V	1	482	1
83	10.88	Bouledogue français	S	V	1	371	0
84	NA	Epagneul breton	E	NA	NA	NA	NA
85	10.2	Malinois	E	D	0	232	0
86	8.44	Cocker	E	V	1	478	0
87	12.19	Labrador	S	D	0	153	0
88	13.10	West Highland White Terrier	S	V	1	730	0
89	9.78	Boxer	E	D	0	1	0
90	12.08	Shih Tzu	S	D	0	103	0
91	10.78	Yorkshire	E	NA	NA	NA	NA
92	NA	Labrador	E	V	1	365	0
93	10.73	Shetland	E	D	1	611	0
94	8.18	Lhassa Apso	E	V	1	180	0
95	9.13	Yorkshire	E	V	1	640	0
96	10.29	Jack Russel	E	V	1	638	0

Numéro	Métastase(s) à distance 0 = Non 1 = Oui	Survie sans progression (jours)	Type de chirurgie 1 = Nodulesctomie ; 2 = Mammectomie régionale ; 3 = Mastectomie unilatérale ; 4 = Mastectomie bilatérale	Traitement reçu 0 = Aucun traitement 1 = AINS 2 = AINS + chimiothérapie 3 = Viscum Album 4 = AIS	Sous-type tumoral
1	1	217	3	2	Solide
2	0	730	2	1	Solide et tubulaire
3	0	730	3	1	Adénosquameux et tubulaire
4	1	45	3	1	Solide et tubulaire
5	0	437	2	1	Tubulopapillaire
6	1	249	2	0	Adénosquameux et tubulaire
7	0	730	1	1	Comédocarcinome
8	0	473	1	1	Solide
9	1	12	2	1	Anaplasique
10	0	730	2	0	Adénosquameux et tubulaire
11	1	534	1	0	Cribriforme
12	0	730	3	0	Solide
13	1	42	4	2	Tubulaire
14	0	730	2	0	Comédocarcinome
15	0	425	4	0	Tubulotrabéculaire
16	0	117	1	0	Tubulopapillire
17	1	95	2	0	Tubulaire
18	0	217	2	1	Solide
19	0	137	3	0	Anaplasique
20	0	730	2	0	Adénosquameux
21	0	184	1	1	Tubulaire
22	0	730	1	1	Tubulopapillaire
23	0	365	2	0	Adénosquameux
24	0	730	2	0	Tubulaire
25	0	730	1	0	Solide
26	NA	NA	4	NA	Anaplasique
27	0	730	3	1	Tubulotrabéculaire complexe
28	0	730	2	0	Tubulotrabéculaire
29	0	164	3	0	Tubulaire
30	0	730	1	0	Tubulotrabéculaire complexe
31	0	730	1	0	Tubulopapillaire
32	0	730	1	0	Solide
33	0	390	3	0	Tubulaire
34	1	77	NA	0	Anaplasique
35	0	130	2	1	Anaplasique
36	0	525	3	0	Solide
37	0	249	3	0	Anaplasique
38	NA	NA	NA	NA	Anaplasique
39	0	344	3	0	Cribriforme
40	0	730	2	0	Tubulaire
41	0	730	3	1	Tubulopapillaire
42	0	730	2	0	Tubulaire complexe
43	1	408	NA	1	Adénosquameux
44	1	50	2	0	Anaplasique
45	0	730	3	0	Tubulotrabéculaire
46	0	395	3	2	Adénosquameux
47	1	107	3	0	Solide
48	0	230	1	0	Tubulopapillaire

Numéro	Métastase(s) à distance	Survie sans progression (jours)	Type de chirurgie	Traitement reçu	Sous-type tumoral
	0 = Non 1 = Oui		1 = Nodulesctomie ; 2 = Mammectomie régionale ; 3 = Mastectomie unilatérale ; 4 = Mastectomie bilatérale	0 = Aucun traitement 1 = AINS 2 = AINS + chimiothérapie 3 = Viscum Album 4 = AIS	
49	NA	NA	NA	NA	Tubulotrabéculaire complexe
50	0	730	4	2	Tubulaire complexe
51	1	268	2	0	Tubulotrabéculaire
52	0	730	1	1	Solide et tubulotrabéculaire
53	0	730	NA	2	Tubulotrabéculaire
54	1	45	2	2	Tubulopapillaire
55	NA	NA	2	NA	Anaplasique
56	1	51	NA	0	Solide et tubulotrabéculaire
57	1	13	NA	NA	Tubulaire complexe
58	0	730	NA	0	Tubulaire
59	0	730	2	0	Tubulaire complexe
60	1	124	3	0	Anaplasique
61	NA	NA	3	NA	Tubulopapillaire
62	0	730	3	0	Trabéculopapillaire
63	0	730	NA	0	Tubulaire simple
64	1	396	3	2	Tubulotrabéculaire
65	NA	NA	3	NA	Tubulaire complexe
66	NA	NA	3	0	Solide
67	0	339	3	0	Solide
68	1	60	1	2	Comédocarcinome
69	NA	NA	NA	NA	Adénosquameux
70	0	305	3	0	Solide
71	1	23	3	1	Anaplasique
72	NA	NA	3	NA	Tubulaire complexe
73	1	313	4	2	Solide et trabéculaire
74	0	390	NA	3	Cribriforme
75	0	356	1	2	Tubulaire complexe
76	1	214	2	1	Tubulaire simple
77	0	399	4	1	Tubulopapillaire complexe
78	0	276	2	0	Tubulaire complexe
79	0	265	2	0	Solide
80	0	30	1	0	Tubulaire complexe
81	NA	NA	1	NA	Tubulopapillaire complexe
82	0	308	3	0	Canalaire
83	0	371	2	0	Solide
84	NA	NA	2	NA	Anaplasique
85	1	232	3	4	Solide
86	0	478	2	0	Tubulaire complexe
87	1	153	3	1	Anaplasique
88	0	730	3	0	Tubulopapillaire
89	0	1	NA	2	Comédocarcinome
90	1	103	3	2	Anaplasique
91	NA	NA	3	0	Tubulaire
92	0	365	1	0	Canalaire
93	0	611	2	0	Tubulopapillaire
94	0	180	3	2	Tubulopapillaire
95	0	640	2	0	Tubulopapillaire complexe
96	0	638	2	0	Tubulaire complexe

Numéro	Type histologique	Grade tumoral	Présence d'emboses	Nœud lymphatique disponible	Infiltration du nœud lymphatique	Présence d'une composante luminale
	1 = Tubulaire simple 2 = Tubulaire complexe 3 = Solide 4 = Anaplasique	1 = Grade I 2 = Grade II 3 = Grade III 4 = CMI	0 = Non 1 = Oui	0 = Non 1 = Oui	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui
1	3	3	0	1	1	0
2	3	3	1	1	1	0
3	3	1	0	1	0	1
4	3	3	1	0	NA	1
5	1	1	0	1	0	1
6	3	3	1	1	1	1
7	3	3	0	1	0	1
8	3	3	1	1	0	1
9	4	4	1	1	1	0
10	3	1	0	1	0	1
11	3	3	1	0	NA	1
12	3	3	0	0	NA	1
13	1	3	1	1	1	1
14	3	3	0	0	NA	0
15	1	2	0	1	0	1
16	1	3	0	0	NA	1
17	1	3	0	0	NA	1
18	3	3	1	1	1	1
19	4	3	1	0	NA	1
20	3	3	0	0	NA	1
21	1	2	0	0	NA	1
22	1	1	0	0	NA	1
23	3	3	0	1	0	1
24	1	1	0	1	0	1
25	3	3	1	0	NA	1
26	4	4	1	1	1	0
27	2	1	0	1	0	1
28	1	2	0	1	0	1
29	1	3	1	0	NA	0
30	2	2	0	0	NA	1
31	1	2	0	0	NA	1
32	3	3	0	0	NA	1
33	1	1	0	0	NA	1
34	4	4	1	1	1	0
35	4	3	0	1	1	1
36	3	2	0	1	0	1
37	4	3	0	0	NA	1
38	4	4	1	0	NA	1
39	3	2	0	0	NA	1
40	1	2	0	1	0	1
41	1	1	0	1	0	1
42	2	1	0	1	0	1
43	3	2	0	0	NA	1
44	4	4	1	1	1	0
45	1	1	0	1	0	1
46	3	2	0	1	0	0
47	3	3	1	0	NA	0
48	1	2	0	0	NA	1
49	2	3	1	1	1	1
50	2	1	0	0	NA	1
51	1	3	0	0	NA	0
52	3	2	0	0	NA	1
53	1	1	0	1	0	1

Numéro	Type histologique	Grade tumoral	Présence d'embolies	Nœud lymphatique disponible	Infiltration du nœud lymphatique	Présence d'une composante luminale
	1 = Tubulaire simple 2 = Tubulaire complexe 3 = Solide 4 = Anaplasique	1 = Grade I 2 = Grade II 3 = Grade III 4 = CMI	0 = Non 1 = Oui	0 = Non 1 = Oui	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui
54	1	1	0	1	0	1
55	4	4	1	0	NA	0
56	3	3	1	0	NA	1
57	2	3	1	1	1	0
58	1	2	0	0	NA	1
59	2	1	0	1	0	1
60	4	4	1	0	NA	0
61	1	1	0	1	0	1
62	1	2	0	0	NA	1
63	1	1	0	0	NA	1
64	1	3	0	0	NA	1
65	2	1	0	0	NA	1
66	3	3	0	1	0	0
67	3	2	0	0	NA	0
68	3	4	1	1	1	0
69	3	4	1	0	NA	1
70	3	3	1	0	NA	1
71	4	4	1	1	1	0
72	2	1	0	1	0	1
73	3	3	1	1	1	1
74	3	2	0	1	0	1
75	2	1	0	0	NA	1
76	1	2	0	1	0	1
77	2	1	0	1	0	1
78	2	1	0	1	0	1
79	3	1	0	0	NA	1
80	2	1	0	0	NA	1
81	2	1	0	0	NA	1
82	1	1	0	1	0	1
83	3	3	0	0	NA	0
84	4	4	1	1	1	1
85	3	3	0	1	0	0
86	2	1	0	0	NA	1
87	4	3	0	0	NA	1
88	1	1	0	0	NA	1
89	3	4	1	0	NA	0
90	4	4	1	0	NA	1
91	1	3	0	1	1	1
92	1	1	0	0	NA	1
93	1	2	0	1	0	1
94	1	2	0	1	0	1
95	2	1	0	1	0	1
96	2	1	0	1	0	1

Numéro	Présence d'une composante myoépithéliale	Présence d'une composante diffuse	Expression de CD44*/CD24	Proportion de cellules marquées CD44*/CD24	Expression luminale de CD44*/CD24	Expression myoépithéliale de CD44*/CD24
	0 = Non 1 = Oui	0 = Non 1 = Oui	0 = Non 1 = Oui	Score [0;30]	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable
1	0	1	0	0	NA	NA
2	0	1	1	11	NA	NA
3	0	0	1	17	1	NA
4	0	1	0	0	0	NA
5	0	1	0	0	0	NA
6	0	1	0	0	0	NA
7	0	1	0	0	0	NA
8	0	1	1	9	1	NA
9	0	1	0	0	NA	NA
10	0	0	1	24	1	NA
11	0	1	0	0	0	NA
12	1	1	1	8	1	0
13	0	1	1	27	1	NA
14	0	1	0	0	NA	NA
15	0	1	1	28	1	NA
16	1	0	0	0	0	0
17	1	1	1	15	1	0
18	0	1	0	0	0	NA
19	1	1	1	1	1	0
20	1	1	1	7	1	1
21	0	1	0	0	0	NA
22	0	0	1	8	1	NA
23	1	1	1	19	1	1
24	0	0	1	30	1	NA
25	0	1	0	0	0	NA
26	0	1	1	19	NA	NA
27	1	1	1	16	1	1
28	1	1	0	0	0	0
29	0	1	1	2	NA	NA
30	1	1	1	30	1	1
31	1	0	0	0	0	0
32	0	1	0	0	0	NA
33	1	0	1	14	1	0
34	0	1	1	30	NA	NA
35	0	1	1	22	1	NA
36	0	1	0	0	0	NA
37	0	1	1	14	1	NA
38	0	1	1	4	1	NA
39	1	0	1	27	1	0
40	1	0	1	4	1	0
41	1	1	1	5	1	0
42	1	1	1	30	1	0
43	1	1	1	6	1	1
44	0	1	0	0	NA	NA
45	0	1	0	0	0	NA
46	1	1	1	4	NA	0
47	0	1	1	24	NA	NA
48	0	0	1	23	1	NA
49	1	1	1	12	0	0
50	0	0	1	24	1	NA
51	0	1	0	0	NA	NA
52	1	1	1	12	1	0
53	0	0	1	28	1	NA
54	0	1	0	0	0	NA
55	1	1	1	29	NA	0

Numéro	Présence d'une composante myoépithéliale	Présence d'une composante diffuse	Expression de CD44 ⁺ /CD24 ⁻	Proportion de cellules marquées CD44 ⁺ /CD24 ⁻	Expression luminale de CD44 ⁺ /CD24 ⁻	Expression myoépithéliale de CD44 ⁺ /CD24 ⁻
	0 = Non 1 = Oui	0 = Non 1 = Oui	0 = Non 1 = Oui	Score [0;30]	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable
56	0	1	0	0	0	NA
57	1	1	0	0	NA	0
58	0	1	0	0	0	NA
59	1	1	1	6	1	0
60	0	1	1	30	NA	NA
61	0	0	1	26	1	NA
62	0	0	1	12	1	NA
63	0	0	0	0	0	NA
64	0	1	0	0	0	NA
65	1	0	1	27	1	0
66	1	1	0	0	NA	0
67	0	1	0	0	NA	NA
68	0	1	0	0	NA	NA
69	0	1	0	0	0	NA
70	0	1	1	16	1	NA
71	0	1	0	0	NA	NA
72	1	1	1	28	1	1
73	0	1	1	5	1	NA
74	1	1	1	6	0	0
75	0	1	1	26	1	NA
76	0	0	1	27	1	NA
77	1	0	1	30	1	1
78	1	0	1	20	1	1
79	1	1	1	4	1	0
80	1	0	1	29	1	1
81	1	0	1	27	1	0
82	0	0	1	25	1	NA
83	1	1	1	3	NA	0
84	0	1	1	11	1	NA
85	0	1	0	0	NA	NA
86	1	0	1	30	1	1
87	0	1	1	21	0	NA
88	0	0	1	26	1	NA
89	0	1	0	0	NA	NA
90	0	1	0	0	0	NA
91	0	1	1	26	1	NA
92	0	0	1	25	1	NA
93	1	1	1	4	0	0
94	1	0	1	30	1	1
95	1	0	1	28	1	0
96	1	0	1	16	0	1

Numéro	Expression diffuse de CD44 ⁺ /CD24 ⁻	Expression de CD44 ⁺ /CD24 ⁺	Proportion de cellules marquées par CD44 ⁺ /CD24 ⁺	Expression de CD44 ⁺ /CD24 ⁺	Proportion de cellules marquées par CD44 ⁺ /CD24 ⁺
	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui	Score [0;30]	0 = Non 1 = Oui	Score [0;30]
1	0	0	0	1	6
2	1	1	1	1	6
3	NA	0	0	0	0
4	0	0	0	1	6
5	0	1	6	1	7
6	0	0	0	1	30
7	0	0	0	1	5
8	1	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	NA	1	6	0	0
11	0	0	0	1	24
12	1	1	2	0	0
13	1	0	0	0	0
14	0	0	0	1	1
15	1	0	0	0	0
16	NA	1	2	1	7
17	0	1	16	1	1
18	0	1	2	1	30
19	0	0	0	1	24
20	1	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0
22	NA	1	7	1	14
23	1	1	23	0	0
24	NA	0	0	0	0
25	0	1	6	1	6
26	1	1	14	1	1
27	1	1	4	1	24
28	0	0	0	0	0
29	1	0	0	1	20
30	1	0	0	0	0
31	NA	0	0	0	0
32	0	0	0	1	12
33	NA	0	0	0	0
34	1	1	9	0	0
35	1	1	18	0	0
36	0	0	0	0	0
37	1	1	20	1	4
38	0	1	26	1	9
39	NA	1	7	0	0
40	NA	0	0	0	0
41	1	1	20	1	9
42	1	0	0	0	0
43	1	1	10	1	1
44	0	0	0	1	8
45	0	0	0	0	0
46	1	0	0	0	0
47	1	0	0	0	0
48	NA	1	13	1	5
49	1	1	3	1	7
50	NA	1	3	1	3
51	0	0	0	0	0
52	1	1	2	0	0
53	NA	1	3	0	0
54	0	1	3	1	6

Numéro	Expression diffuse de CD44 ⁺ /CD24 ⁻	Expression de CD44 ⁺ /CD24 ⁺	Proportion de cellules marquées par CD44 ⁺ /CD24 ⁺	Expression de CD44 /CD24 ⁺	Proportion de cellules marquées par CD44 /CD24 ⁺
	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui	Score [0;30]	0 = Non 1 = Oui	Score [0;30]
55	1	1	9	0	0
56	0	1	4	1	30
57	0	1	30	1	2
58	0	0	0	0	0
59	0	1	2	1	18
60	1	1	2	1	2
61	NA	0	0	0	0
62	NA	1	18	0	0
63	NA	0	0	0	0
64	0	1	29	1	2
65	NA	1	8	1	2
66	0	0	0	0	0
67	0	0	0	0	0
68	0	1	4	1	6
69	0	1	23	1	11
70	1	0	0	0	0
71	0	0	0	0	0
72	1	0	0	0	0
73	0	0	0	0	0
74	1	0	0	1	1
75	1	0	0	0	0
76	NA	0	0	0	0
77	NA	0	0	0	0
78	NA	0	0	0	0
79	0	0	0	1	3
80	NA	0	0	0	0
81	NA	0	0	0	0
82	NA	0	0	0	0
83	1	0	0	0	0
84	0	0	0	0	0
85	0	0	0	0	0
86	NA	0	0	0	0
87	1	1	15	0	0
88	NA	0	0	0	0
89	0	1	28	1	9
90	0	1	14	1	17
91	1	0	0	0	0
92	NA	0	0	0	0
93	1	0	0	0	0
94	NA	0	0	0	0
95	NA	0	0	0	0
96	NA	1	11	0	0

Numéro	Expression luminale de CD44/CD24 ⁺	Expression myoépithéliale de CD44/CD24 ⁺	Expression diffuse de CD44/CD24 ⁺	Expression de CD44/CD24 ⁺	Proportion de cellules marquées par CD44/CD24 ⁺	Expression de CD44
	0 = Non ; 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui	Score [0;30]	0 = Non 1 = Oui
1	NA	NA	0	1	24	0
2	NA	NA	1	1	20	1
3	0	NA	NA	1	20	1
4	1	NA	0	1	24	1
5	1	NA	0	1	20	1
6	1	NA	0	0	0	0
7	1	NA	0	1	30	0
8	0	NA	1	1	26	1
9	NA	NA	0	1	30	0
10	0	NA	NA	0	0	1
11	0	NA	0	1	6	0
12	0	0	1	1	27	1
13	0	NA	1	1	8	1
14	NA	NA	0	1	30	0
15	0	NA	1	1	14	1
16	1	0	NA	1	29	1
17	0	0	1	0	0	1
18	1	NA	0	0	0	1
19	1	0	0	1	24	1
20	0	0	1	1	30	1
21	0	NA	0	1	30	0
22	1	NA	NA	1	13	1
23	0	0	1	1	4	1
24	0	NA	NA	0	0	1
25	1	NA	0	1	30	0
26	NA	NA	1	0	0	1
27	1	0	1	0	0	1
28	0	0	0	1	30	0
29	NA	NA	1	1	12	1
30	0	0	1	1	10	1
31	0	0	NA	1	30	0
32	1	NA	0	1	30	0
33	0	0	NA	1	28	1
34	NA	NA	1	0	0	1
35	0	NA	1	0	0	1
36	0	NA	0	1	30	0
37	1	NA	1	0	0	1
38	1	NA	1	0	0	1
39	0	0	NA	0	0	1
40	0	0	NA	1	30	1
41	1	0	1	1	11	1
42	0	0	1	1	3	1
43	1	0	1	1	17	1
44	NA	NA	0	1	26	0
45	0	NA	0	1	30	0
46	NA	0	1	1	30	1
47	NA	NA	1	1	20	1
48	1	NA	NA	0	0	1
49	1	0	1	1	17	1
50	1	NA	NA	0	0	1
51	NA	NA	0	1	30	0
52	0	0	1	1	28	1
53	0	NA	NA	1	2	1
54	1	NA	0	1	30	1
55	NA	0	1	0	0	1

56	1	NA	1	0	0	1
Numéro	Expression luminale de CD44/CD24 ⁺	Expression myoépithéliale de CD44/CD24 ⁺	Expression diffuse de CD44/CD24 ⁺	Expression de CD44/CD24 ⁺	Proportion de cellules marquées par CD44/CD24 ⁺	Expression de CD44
	0 = Non ; 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui	Score [0;30]	0 = Non 1 = Oui
57	NA	0	1	1	5	1
58	0	NA	0	1	30	0
59	1	0	0	1	10	1
60	NA	NA	1	1	1	1
61	0	NA	NA	1	13	1
62	0	NA	NA	0	0	1
63	0	NA	NA	1	30	0
64	1	NA	1	0	0	1
65	0	1	NA	0	0	1
66	NA	0	0	1	30	0
67	NA	NA	0	1	30	0
68	NA	NA	1	1	25	1
69	1	NA	1	1	4	1
70	0	NA	1	1	27	1
71	NA	NA	0	1	30	0
72	0	0	1	1	10	1
73	0	NA	0	1	30	1
74	1	0	1	1	30	1
75	0	NA	NA	1	8	1
76	0	NA	NA	1	12	1
77	0	0	NA	1	2	1
78	0	0	NA	1	20	1
79	1	0	0	1	30	1
80	0	0	NA	1	11	1
81	0	0	NA	1	19	1
82	0	NA	NA	1	15	1
83	NA	0	1	1	30	1
84	0	NA	0	1	21	1
85	NA	NA	0	1	30	0
86	0	0	NA	0	0	1
87	0	NA	1	1	1	1
88	0	NA	NA	1	9	1
89	NA	NA	1	0	0	1
90	1	NA	1	1	9	1
91	0	NA	1	1	12	1
92	0	NA	NA	1	18	1
93	0	0	1	1	30	1
94	0	0	NA	0	0	1
95	0	0	NA	1	13	1
96	0	0	NA	1	15	1

Numéro	Score de marquage de CD44	Expression lumineuse de CD44	Expression myoépithéliale de CD44	Expression diffuse de CD44	Expression de CD24	Score de marquage de CD24	Expression lumineuse de CD24
	Score [0;90]	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	Score [0;90]	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable
1	0	NA	NA	0	1	6	NA
2	11	NA	NA	1	1	8	NA
3	34	1	NA	NA	0	0	0
4	2	1	NA	0	1	6	1
5	6	1	NA	0	1	24	1
6	0	0	NA	0	1	30	1
7	0	0	NA	0	1	7	1
8	15	1	NA	1	0	0	0
9	0	NA	NA	0	0	0	NA
10	51	1	NA	NA	1	6	1
11	0	0	NA	0	1	24	0
12	16	1	0	1	1	11	1
13	48	1	NA	1	0	0	0
14	0	NA	NA	0	1	6	NA
15	56	1	NA	1	0	0	0
16	2	1	0	NA	1	7	1
17	58	1	0	1	1	19	1
18	4	1	NA	0	1	60	1
19	2	1	0	0	1	53	1
20	7	1	1	1	0	0	0
21	0	0	NA	0	0	0	0
22	16	1	NA	NA	1	27	1
23	55	1	1	1	1	12	1
24	81	1	NA	NA	0	0	0
25	0	0	NA	0	1	14	1
26	58	NA	NA	1	1	14	NA
27	30	1	1	1	1	28	1
28	0	0	0	0	0	0	0
29	4	NA	NA	1	1	23	NA
30	48	1	1	1	0	0	0
31	0	0	0	NA	0	0	0
32	0	0	NA	0	1	24	1
33	25	1	0	NA	0	0	0
34	90	NA	NA	1	1	9	NA
35	63	1	NA	1	1	19	1
36	0	0	NA	0	1	2	1
37	53	1	NA	1	1	24	1
38	49	1	NA	1	1	30	1
39	54	1	0	NA	1	7	1
40	4	1	0	NA	0	0	0
41	30	1	0	1	1	22	1
42	54	1	0	1	0	0	0
43	21	1	1	1	1	18	1
44	0	NA	NA	0	1	8	NA
45	0	0	NA	0	0	0	0
46	4	NA	0	1	0	0	NA
47	50	NA	NA	1	0	0	NA
48	47	1	NA	NA	1	16	1
49	20	1	0	1	1	17	1
50	54	1	NA	NA	1	9	1
51	0	NA	NA	0	0	0	NA
52	17	1	0	1	1	2	1
53	73	1	NA	NA	1	3	1
54	5	1	NA	0	1	9	1

Numéro	Score de marquage de CD44	Expression luminale de CD44	Expression myoépithéliale de CD44	Expression diffuse de CD44	Expression de CD24	Score de marquage de CD24	Expression luminale de CD24
	Score [0;90]	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable	Score [0;90]	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable	0 = Non ; 1 = Oui ; NA = Non applicable
55	60	NA	0	1	1	9	NA
56	8	1	NA	1	1	90	1
57	72	NA	0	1	1	30	NA
58	0	0	NA	0	0	0	0
59	8	1	0	0	1	19	1
60	60	NA	NA	1	1	4	NA
61	52	1	NA	NA	0	0	0
62	63	1	NA	NA	1	30	1
63	0	0	NA	NA	0	0	0
64	61	1	NA	1	1	33	1
65	60	1	0	NA	1	8	1
66	0	NA	0	0	0	0	NA
67	0	NA	NA	0	0	0	NA
68	5	NA	NA	1	1	13	NA
69	43	1	NA	1	1	35	1
70	23	1	NA	1	0	0	0
71	0	NA	NA	0	0	0	NA
72	40	1	1	1	0	0	0
73	10	1	NA	0	0	0	0
74	9	0	0	1	1	3	1
75	47	1	NA	1	0	0	0
76	42	1	NA	NA	0	0	0
77	66	1	1	NA	0	0	0
78	26	1	1	NA	0	0	0
79	8	1	0	0	1	6	1
80	56	1	1	NA	0	0	0
81	57	1	0	NA	0	0	0
82	43	1	NA	NA	0	0	0
83	6	NA	0	1	0	0	NA
84	17	1	NA	0	0	0	0
85	0	NA	NA	0	0	0	NA
86	60	1	1	NA	0	0	0
87	73	0	NA	1	1	15	1
88	44	1	NA	NA	0	0	0
89	54	NA	NA	1	1	32	NA
90	23	1	NA	1	1	38	1
91	50	1	NA	1	0	0	0
92	37	1	NA	NA	0	0	0
93	4	0	0	1	0	0	0
94	54	1	1	NA	0	0	0
95	65	1	0	NA	0	0	0
96	40	1	1	NA	1	11	1

Numéro	Expression myoépithéliale de CD24	Expression diffuse de CD24	Expression de BDNF	Score de marquage de BDNF	Expression luminale de BDNF	Expression myoépithéliale de BDNF
	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui	Score [0 ;90]	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable
1	NA	1	1	36	NA	NA
2	NA	1	1	49	NA	NA
3	NA	NA	1	32	1	NA
4	NA	0	1	29	1	NA
5	NA	1	1	45	1	NA
6	NA	1	0	0	0	NA
7	NA	0	1	16	1	NA
8	NA	0	1	41	1	NA
9	NA	0	1	18	NA	NA
10	NA	NA	1	34	1	NA
11	NA	1	0	0	0	NA
12	0	0	1	8	1	0
13	NA	0	1	2	1	NA
14	NA	1	0	0	NA	NA
15	NA	0	1	13	1	NA
16	0	NA	1	28	1	1
17	0	1	0	0	0	0
18	0	1	1	29	1	NA
19	0	1	1	79	1	1
20	0	0	1	90	1	1
21	0	0	1	38	1	NA
22	NA	NA	1	57	1	NA
23	1	1	1	19	1	0
24	NA	NA	0	0	0	NA
25	NA	0	0	0	0	NA
26	NA	1	1	9	NA	NA
27	0	1	1	62	1	0
28	0	0	1	20	1	1
29	NA	1	1	23	NA	NA
30	0	0	1	8	0	1
31	0	NA	1	45	1	1
32	NA	0	1	35	1	NA
33	0	NA	1	17	1	0
34	NA	1	1	12	NA	NA
35	NA	1	1	26	1	NA
36	NA	0	1	42	1	NA
37	NA	1	1	10	1	NA
38	NA	1	1	23	1	NA
39	0	NA	1	25	1	0
40	NA	0	0	0	0	0
41	0	1	1	38	1	1
42	0	0	0	0	0	0
43	0	1	1	26	1	1
44	NA	1	1	54	NA	NA
45	NA	0	0	0	0	NA
46	0	0	1	81	NA	1
47	NA	0	1	15	NA	NA
48	NA	NA	1	31	1	NA
49	0	1	0	0	0	0
50	NA	NA	1	32	1	NA
51	NA	0	1	4	NA	NA
52	0	0	1	22	1	1
53	NA	NA	1	22	1	NA
54	NA	0	1	40	1	NA
55	0	1	1	6	NA	0

Numéro	Expression myoépithéliale de CD24	Expression diffuse de CD24	Expression de BDNF	Score de marquage de BDNF	Expression luminale de BDNF	Expression myoépithéliale de BDNF
	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui	Score [0 ;90]	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable
56	NA	1	1	27	1	NA
57	0	1	1	19	NA	0
58	NA	0	1	59	1	NA
59	0	0	1	9	1	0
60	NA	1	0	0	NA	NA
61	NA	NA	1	3	1	NA
62	NA	NA	1	55	1	NA
63	NA	NA	1	53	1	NA
64	NA	1	1	15	1	NA
65	1	NA	0	0	0	0
66	0	0	1	22	NA	1
67	NA	0	0	0	NA	NA
68	NA	1	1	14	NA	NA
69	NA	1	1	16	1	NA
70	NA	0	0	0	0	NA
71	NA	0	0	0	NA	NA
72	0	0	1	2	0	1
73	NA	0	1	54	1	NA
74	0	0	1	7	0	1
75	NA	0	1	14	1	NA
76	NA	NA	1	15	1	NA
77	0	NA	1	51	1	1
78	0	NA	1	6	1	1
79	0	0	1	34	1	1
80	0	NA	1	12	1	0
81	0	NA	1	7	1	0
82	NA	NA	1	49	1	NA
83	0	0	1	24	NA	1
84	NA	0	1	62	1	NA
85	NA	0	1	15	NA	NA
86	0	NA	0	0	0	0
87	NA	1	1	9	0	NA
88	NA	NA	0	0	0	NA
89	NA	1	1	34	NA	NA
90	NA	1	1	34	1	NA
91	NA	0	1	9	1	NA
92	NA	NA	1	54	1	NA
93	0	0	1	20	1	1
94	0	NA	1	17	1	1
95	0	NA	1	38	1	0
96	0	NA	1	13	1	0

Numéro	Expression diffuse de BDNF	Expression de proNGF	Score de marquage de proNGF	Expression luminale de proNGF	Expression myoépthéliale de proNGF	Expression diffuse de proNGF
	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui	Score [0 ;90]	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable
1	1	1	60	NA	NA	1
2	1	1	20	NA	NA	1
3	NA	1	31	1	NA	NA
4	1	1	31	1	NA	1
5	1	1	22	1	NA	1
6	0	0	0	0	NA	0
7	1	0	0	0	NA	0
8	1	1	6	0	NA	1
9	1	1	21	NA	NA	1
10	NA	1	16	1	NA	NA
11	0	1	24	0	NA	1
12	0	1	17	1	0	1
13	0	1	3	1	NA	0
14	0	1	27	NA	NA	1
15	1	1	26	1	NA	1
16	NA	1	29	1	0	NA
17	0	1	7	1	0	0
18	1	1	30	1	NA	1
19	1	1	24	1	1	0
20	1	1	18	1	1	1
21	1	1	3	1	NA	0
22	NA	1	19	1	NA	NA
23	0	1	7	1	0	0
24	NA	1	19	1	NA	NA
25	0	0	0	0	NA	0
26	1	0	0	NA	NA	0
27	1	1	32	1	0	1
28	1	0	0	0	0	0
29	1	1	23	NA	NA	1
30	0	1	30	0	0	1
31	NA	1	40	1	1	NA
32	1	1	16	1	NA	1
33	NA	1	11	1	0	NA
34	1	1	11	NA	NA	1
35	1	1	4	1	NA	1
36	1	1	56	1	NA	1
37	1	1	10	1	NA	1
38	1	1	33	1	NA	1
39	NA	1	12	1	0	NA
40	NA	0	0	0	0	NA
41	1	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0
43	1	1	4	1	0	0
44	1	0	0	NA	NA	0
45	0	0	0	0	NA	0
46	1	1	29	NA	0	1
47	1	0	0	NA	NA	0
48	NA	1	13	1	NA	NA
49	0	1	7	1	1	1
50	NA	1	15	1	NA	NA
51	1	1	10	NA	NA	1
52	1	1	6	1	0	0
53	NA	1	20	1	NA	NA
54	1	1	15	1	NA	1

Numéro	Expression diffuse de BDNF	Expression de proNGF	Score de marquage de proNGF	Expression luminale de proNGF	Expression myoépithéliale de proNGF	Expression diffuse de proNGF
	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui	Score [0 ;90]	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable
55	1	1	56	NA	0	1
56	1	1	30	1	NA	1
57	1	1	51	NA	0	1
58	1	1	14	1	NA	1
59	0	1	55	1	0	1
60	0	0	0	NA	NA	0
61	NA	1	6	1	NA	NA
62	NA	1	25	1	NA	NA
63	NA	1	9	1	NA	NA
64	0	0	0	0	NA	0
65	NA	1	12	1	0	NA
66	1	0	0	NA	0	0
67	0	0	0	NA	NA	0
68	1	0	0	NA	NA	0
69	1	0	0	0	NA	0
70	0	1	3	0	NA	1
71	0	1	6	NA	NA	1
72	1	0	0	0	0	0
73	1	1	39	1	NA	1
74	0	0	0	0	0	0
75	0	1	19	1	NA	0
76	NA	1	3	1	NA	NA
77	NA	1	18	1	0	NA
78	NA	1	20	1	0	NA
79	1	0	0	0	0	0
80	NA	1	8	1	0	NA
81	NA	1	9	1	0	NA
82	NA	1	13	1	NA	NA
83	1	0	0	NA	0	0
84	1	0	0	0	NA	0
85	1	1	17	NA	NA	1
86	NA	0	0	0	0	NA
87	1	1	11	1	NA	1
88	NA	0	0	0	NA	NA
89	1	1	29	NA	NA	1
90	1	1	11	1	NA	1
91	1	0	0	0	NA	0
92	NA	1	23	1	NA	NA
93	1	1	13	1	0	0
94	NA	1	24	1	0	NA
95	NA	1	28	1	0	NA
96	NA	1	49	1	0	NA

Numéro	Expression de TrkA	Score de marquage de TrkA	Expression lumineuse de TrkA	Expression myoépithéliale de TrkA	Expression diffuse de TrkA	Expression de TrkB
	0 = Non 1 = Oui	Score [0 ;90]	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui
1	1	90	NA	NA	1	0
2	1	33	NA	NA	1	1
3	1	21	1	NA	NA	1
4	1	45	1	NA	1	0
5	1	60	1	NA	1	1
6	1	60	1	NA	1	0
7	1	22	1	NA	1	1
8	1	43	1	NA	1	1
9	1	57	NA	NA	1	0
10	1	56	1	NA	NA	0
11	1	44	1	NA	1	0
12	1	66	1	1	1	0
13	1	48	0	NA	1	1
14	1	30	NA	NA	1	0
15	1	51	1	NA	1	1
16	1	60	1	1	NA	0
17	1	60	1	0	1	0
18	1	87	1	NA	1	1
19	1	27	1	1	1	1
20	1	33	1	1	1	0
21	1	63	1	NA	1	0
22	1	44	1	NA	NA	0
23	1	57	1	0	1	0
24	1	60	1	NA	NA	0
25	1	42	1	NA	1	1
26	1	60	NA	NA	1	0
27	1	54	1	0	1	1
28	1	57	1	1	1	1
29	1	63	NA	NA	1	0
30	1	60	1	1	1	1
31	1	63	1	0	NA	0
32	1	47	1	NA	1	1
33	1	57	1	0	NA	0
34	1	30	NA	NA	1	0
35	1	60	1	NA	1	0
36	1	42	1	NA	1	1
37	1	54	1	NA	1	0
38	1	33	1	NA	1	0
39	1	45	1	0	NA	1
40	0	0	0	0	NA	1
41	1	39	1	0	1	0
42	1	42	1	0	1	1
43	1	26	1	1	1	0
44	1	39	NA	NA	1	0
45	1	33	1	NA	1	1
46	1	39	NA	1	1	0
47	1	30	NA	NA	1	0
48	1	60	1	NA	NA	0
49	1	45	1	1	1	0
50	1	48	1	NA	NA	1
51	1	30	NA	NA	1	0
52	1	42	1	0	1	1
53	1	38	1	NA	NA	0
54	1	45	1	NA	1	1

Numéro	Expression de TrkA	Score de marquage de TrkA	Expression luminale de TrkA	Expression myoépithéliale de TrkA	Expression diffuse de TrkA	Expression de TrkB
	0 = Non 1 = Oui	Score [0 ;90]	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui
55	1	21	NA	0	1	0
56	1	51	1	NA	1	0
57	1	33	NA	0	1	0
58	1	42	1	NA	1	0
59	1	26	1	1	1	1
60	1	60	NA	NA	1	0
61	1	24	1	NA	NA	0
62	1	55	1	NA	NA	0
63	1	81	1	NA	NA	1
64	1	36	1	NA	1	0
65	1	51	1	0	NA	0
66	1	23	NA	0	1	1
67	1	30	NA	NA	1	0
68	1	30	NA	NA	1	0
69	1	31	1	NA	1	0
70	1	30	1	NA	1	1
71	1	15	NA	NA	1	0
72	1	30	1	1	1	1
73	1	90	1	NA	1	0
74	1	29	0	1	1	1
75	1	30	1	NA	1	1
76	1	30	1	NA	NA	0
77	1	39	1	1	NA	1
78	1	39	1	1	NA	1
79	1	39	1	1	1	1
80	1	30	1	0	NA	1
81	1	42	1	0	NA	1
82	1	39	1	NA	NA	0
83	1	13	NA	1	1	0
84	1	38	1	NA	1	0
85	1	57	NA	NA	1	0
86	1	57	1	1	NA	0
87	1	30	1	NA	1	1
88	0	0	0	NA	NA	0
89	1	48	NA	NA	1	0
90	1	27	1	NA	1	0
91	1	34	1	NA	1	0
92	1	54	1	NA	NA	0
93	1	69	1	0	1	0
94	1	81	1	0	NA	0
95	1	60	1	0	NA	0
96	1	30	1	1	NA	0

Numéro	Score de marquage de TrkB	Expression lumineale de TrkB	Expression myoépthéiale de TrkB	Expression diffuse de TrkB	Expression de p75 ^{NTR}	Score de marquage de p75 ^{NTR}
	Score [0 ;90]	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui	Score [0 ;90]
1	0	NA	NA	0	0	0
2	19	NA	NA	1	0	0
3	15	1	NA	NA	0	0
4	0	0	NA	0	0	0
5	12	1	NA	0	0	0
6	0	0	NA	0	0	0
7	49	1	NA	1	1	55
8	9	1	NA	1	1	8
9	0	NA	NA	0	0	0
10	0	0	NA	NA	0	0
11	0	0	NA	0	0	0
12	0	0	0	0	1	21
13	33	1	NA	1	0	0
14	0	NA	NA	0	1	18
15	11	1	NA	1	0	0
16	0	0	0	NA	1	42
17	0	0	0	0	1	3
18	4	1	NA	0	0	0
19	16	1	1	1	1	32
20	0	0	0	0	1	19
21	0	0	NA	0	0	0
22	0	0	NA	NA	0	0
23	0	0	0	0	1	23
24	0	0	NA	NA	0	0
25	3	1	NA	1	0	0
26	0	NA	NA	0	0	0
27	4	0	1	0	1	5
28	72	0	1	1	1	29
29	0	NA	NA	0	0	0
30	34	0	0	1	1	24
31	0	0	0	NA	1	49
32	32	1	NA	1	0	0
33	0	0	0	NA	1	5
34	0	NA	NA	0	0	0
35	0	0	NA	0	0	0
36	10	1	NA	1	0	0
37	0	0	NA	0	1	3
38	0	0	NA	0	0	0
39	10	0	1	NA	1	24
40	90	0	1	NA	1	42
41	0	0	0	0	1	12
42	4	1	0	1	1	3
43	0	0	0	0	1	27
44	0	NA	NA	0	0	0
45	63	1	NA	1	0	0
46	0	NA	0	0	1	14
47	0	NA	NA	0	0	0
48	0	0	NA	NA	1	30
49	0	0	0	0	1	27
50	6	1	NA	NA	1	5
51	0	NA	NA	0	0	0
52	3	1	1	0	1	29
53	0	0	NA	NA	0	0
54	7	0	NA	1	1	17

Numéro	Score de marquage de TrkB	Expression luminale de TrkB	Expression myoépithéliale de TrkB	Expression diffuse de TrkB	Expression de p75 ^{NTR}	Score de marquage de p75 ^{NTR}
	Score [0 ;90]	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui	Score [0 ;90]
55	0	NA	0	0	1	14
56	0	0	NA	0	0	0
57	0	NA	0	0	1	14
58	0	0	NA	0	0	0
59	6	0	0	1	1	13
60	0	NA	NA	0	0	0
61	0	0	NA	NA	0	0
62	0	0	NA	NA	0	0
63	2	1	NA	NA	0	0
64	0	0	NA	0	0	0
65	0	0	0	NA	1	31
66	9	NA	0	1	1	8
67	0	NA	NA	0	1	59
68	0	NA	NA	0	0	0
69	0	0	NA	0	0	0
70	4	0	NA	1	0	0
71	0	NA	NA	0	0	0
72	5	0	0	1	1	12
73	0	0	NA	0	0	0
74	30	0	0	1	1	30
75	4	1	NA	1	0	0
76	0	0	NA	NA	0	0
77	42	0	1	NA	0	0
78	13	1	1	NA	1	4
79	43	1	0	1	1	2
80	55	1	1	NA	1	17
81	10	1	1	NA	1	43
82	0	0	NA	NA	0	0
83	0	NA	0	0	1	36
84	0	0	NA	0	0	0
85	0	NA	NA	0	1	25
86	0	0	0	NA	1	3
87	19	0	NA	1	0	0
88	0	0	NA	NA	0	0
89	0	NA	NA	0	0	0
90	0	0	NA	0	0	0
91	0	0	NA	0	0	0
92	0	0	NA	NA	0	0
93	0	0	0	0	1	22
94	0	0	0	NA	1	25
95	0	0	0	NA	1	16
96	0	0	0	NA	0	0

Numéro	Expression luminale de p75 ^{NTR}	Expression myoépithéliale de p75 ^{NTR}	Expression diffuse de p75 ^{NTR}
	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable
1	NA	NA	0
2	NA	NA	0
3	0	NA	NA
4	0	NA	0
5	0	NA	0
6	0	NA	0
7	1	NA	1
8	1	NA	1
9	NA	NA	0
10	0	NA	NA
11	0	NA	0
12	0	1	1
13	0	NA	0
14	NA	NA	1
15	0	NA	0
16	0	1	NA
17	0	1	0
18	0	NA	0
19	1	1	1
20	0	1	0
21	0	NA	0
22	0	NA	NA
23	0	1	0
24	0	NA	NA
25	0	NA	0
26	NA	NA	0
27	0	1	0
28	0	1	1
29	NA	NA	0
30	0	1	1
31	1	1	NA
32	0	NA	0
33	0	1	NA
34	NA	NA	1
35	0	NA	0
36	0	NA	0
37	0	NA	1
38	0	NA	0
39	0	1	NA
40	0	1	NA
41	0	1	1
42	0	1	1
43	1	1	1
44	NA	NA	0
45	0	NA	0
46	NA	1	0
47	NA	NA	0
48	1	NA	NA
49	0	1	0
50	1	NA	NA
51	NA	NA	0
52	0	1	1
53	0	NA	NA
54	0	NA	1

Numéro	Expression luminale de p75 ^{NTR}	Expression myoépithéliale de p75 ^{NTR}	Expression diffuse de p75 ^{NTR}
	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable	0 = Non 1 = Oui NA = Non applicable
55	NA	1	0
56	0	NA	0
57	NA	1	0
58	0	NA	0
59	0	1	0
60	NA	NA	0
61	0	NA	NA
62	0	NA	NA
63	0	NA	NA
64	0	NA	0
65	1	1	NA
66	NA	1	0
67	NA	NA	1
68	NA	NA	0
69	0	NA	0
70	0	NA	0
71	NA	NA	0
72	0	1	0
73	0	NA	0
74	0	1	1
75	0	NA	0
76	0	NA	NA
77	0	0	NA
78	0	1	NA
79	0	1	0
80	0	1	NA
81	0	1	NA
82	0	NA	NA
83	NA	1	1
84	0	NA	0
85	NA	NA	1
86	0	1	NA
87	0	NA	0
88	0	NA	NA
89	NA	NA	0
90	0	NA	0
91	0	NA	0
92	0	NA	NA
93	1	1	1
94	0	1	NA
95	0	1	NA
96	0	0	NA