VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2011 - Thèse n°

ETUDE PRELIMINAIRE SUR L'EXPRESSION DES CYTOKERATINES, DE L'E-CADHERINE ET DE LA VIMENTINE AU SEIN DES CARCINOMES EPIDERMOÏDES DIGITES EN ESPECE CANINE

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 21 décembre 2011
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Brisebard Elise
Née le 15 janvier 1985
à Belfort (90)

VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2011 - Thèse n°

ETUDE PRELIMINAIRE SUR L'EXPRESSION DES CYTOKERATINES, DE L'E-CADHERINE ET DE LA VIMENTINE AU SEIN DES CARCINOMES EPIDERMOÏDES DIGITES EN ESPECE CANINE

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 21 décembre 2011
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Brisebard Elise
Née le 15 janvier 1985
à Belfort (90)

ENSEIGNANTS CAMPUS VETERINAIRE DE VETAGRO SUP

NOM	Prénom	Grade	Unité Pédagogique
ALOGNINOUWA	Théodore	Professeur 1ere cl	Pathologie du bétail
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences hors cl	Gestion des élevages
ARCANGIOLI	Marie-Anne	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
ARTOIS	Marc	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
BECKER	Claire	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
BELLI	Patrick	Maître de conférences associé	Pathologie morphologique et clinique
BELLUCO	Sara	Maître de conférences cl normale	Pathologie morphologique et clinique
BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences cl normale	Equine
BENOIT	Etienne	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
BERNY	Philippe	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
BOULOCHER	Caroline	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
BOURDOISEAU	Gilles	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
BRUYERE	Pierre	Maître de conférences Contractuel	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
BUFF	Samuel	Maître de conférences cl normale	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
BURONFOSSE	Thierry	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
CACHON	Thibaut	Maître de conférences Contractuel	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
CADORE	Jean-Luc	Professeur 1ere cl	Pathologie médicale des animaux de compagnie
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
CAROZZO	Claude	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
CHABANNE	Luc	Professeur 1ere cl	Pathologie médicale des animaux de compagnie
CHALVET-MONFRAY	Karine	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
COMMUN	Loic	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
DEMONT	Pierre	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
DESJARDINS PESSON	Isabelle	Maître de conférences Contractuel	Equine
DJELOUADJI	Zorée	Maître de conférences stagiaire	Santé Publique et Vétérinaire
ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie
FAU	Didier	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
FOURNEL	Corinne	Professeur 1ere cl	Pathologie morphologique et clinique
FRANCK	Michel	Professeur 1ere cl	Gestion des élevages
FRIKHA	Mohamed Rhida	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
GANGL	Monika	Maître de conférences Contractuel	Equine

NOM	Prénom	Grade	Unité Pédagogique
GARNIER	François	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
GENEVOIS	Jean-Pierre	Professeur cl ex	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur 2eme cl	Biologie Fonctionnelle
GONTHIER	Alain	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
GRAIN	Françoise	Professeur 2eme cl	Gestion des élevages
GRANCHER	Denis	Maître de conférences hors cl	Gestion des élevages
GREZEL	Delphine	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
GUERIN	Pierre	Professeur 2eme cl	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
GUERIN-FAUBLEE	Véronique	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
HUGONNARD	Marine	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie
JUNOT	Stéphane	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
KECK	Gérard	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
KODJO	Angeli	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
LACHERETZ	Antoine	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
LAMBERT	Véronique	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
LE-GRAND	Dominique	Maître de conférences hors cl	Pathologie du bétail
LEBLOND	Agnes	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences cl normale	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
LEPAGE	Olivier	Professeur 1ere cl	Equine
LOUZIER	Vanessa	Maître de conférences cl normale	Biologie Fonctionnelle
MARCHAL	Thierry	Maître de conférences hors cl	Pathologie morphologique et clinique
MIALET	Sylvie	Inspecteur de la santé publique vétérinaire (ISPV) faisant fonction de MC	Santé Publique et Vétérinaire
MOUNIER	Luc	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
PEPIN	Michel	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
PIN	Didier	Maître de conférences cl normale	Pathologie morphologique et clinique
PONCE	Frédérique	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie
PORTIER	Karine	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
PROUILLAC	Caroline	Maître de conférences cl normale	Biologie fonctionnelle
REMY	Denise	Professeur 2eme cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
ROGER	Thierry	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
SABATIER	Philippe	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
SAWAYA	Serge	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
SERGENTET	Delphine	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
THIEBAULT	Jean-Jacques	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
VIGUIER	Eric	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothée	Maître de conférences Contractuel	Pathologie morphologique et clinique
ZENNER	Lionel	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire

REMERCIEMENTS

Aux membres de notre jury de thèse, pour l'honneur qu'ils nous ont fait.

A Madame le Professeur Jacqueline Trouillas,
Professeur à la faculté de Médecine de Lyon
Pour nous avoir fait l'immense honneur d'accepter de présider notre jury de thèse,
Avec toute ma gratitude,
Hommages respectueux.

A Madame Sara Belluco,
Maître de conférences à VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon
Qui m'a proposé ce travail et m'a guidé et accompagné dans sa réalisation,
Profonde reconnaissance.

A Madame Frédérique Ponce
Maître de conférences à VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon
Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de participer à notre jury de thèse,
Remerciements respectueux

A Sabine Balleydier, Sylvie Rapiteau et Marie-Thérèse Teyssier,
Techniciennes du Laboratoire d'anatomie pathologique et d'histologie de VetAgro Sup
Pour m'avoir appris, guidée et aidée dans la réalisation des différentes lames,
Et tout particulièrement lors de l'étape 'délicate' des coupes,
Sincère gratitude

A tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont soutenue et aidée dans ce travail.

A toutes les personnes qui me sont chères…

Table des matières

INTRODUCTION 21

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 23

PARTIE 1 : L'épiderme 25

I. Structure de l'épiderme 27
II. Ultrastructure des keratinocytes 33
A. Les cytokératines du cytosquelette 33
B. Les moyens d'adhésion cellulaire 37
III. Régulation de l'épiderme 50
A. Régulation de la croissance 50
B. Régulation de la différenciation 52

PARTIE 2 : Le carcinome épidermoïde digité en espèce canine 53

I. Epidemiologie 54
A. Fréquence 54
B. Age 54
C. Sexe et stérilisation 55
D. Races et robes 55
II. Etiopathogénie 56
III. Etude clinique 57
A. Localisation 57
B. Signes cliniques 57
C. Evolution tumorale 57
IV. Etude cytologique et histologique 58
A. Etude cytologique 58
B. Etude histologique 62
1. Carcinome épidermoïde bien différencié (grade 1) 63
2. Carcinome épidermoïde modérément différencié (grade 2 et 3) 64
3. Carcinome épidermoïde peu différencié (grade 4) 65
4. Carcinome épidermoïde acantholytique 66
5. Carcinome épidermoïde verruqueux 67

6. Carcinome épidermoïde à cellules fusiformes 68
7. Les lésions histologiques osseuses associées 68
V. Diagnostic 69
VI. Pronostic 72
VII. Traitement 74

PARTIE 3 : La transition épithélio-mésenchymateuse 77

I. Les événements morphologiques et moléculaires de la TEM 80
A. Place des cadhérines dans la TEM 81
B. Place des caténines dans la TEM 84
C. Place des intégrines dans la TEM 85
II. Les facteurs de transcription centraux de la TEM 86
A. Snail et Slug 86
B. Twist 88
C. Zeb 1 et Zeb 2 (Zinc finger E-Box binding homeobox) 88
D. E12/E47 89
E. NFκB (Nuclear Factor-kappa B) 89
F. LEF-1/Tcf (Lymphoid enhancer factor/T cell factor) 89
III. Les voies d'induction de la TEM 90
A. TGFβ 91
B. Wnt 96
C. Les RTK 97
D. Les petites GTPases Rho 99
E. Les microARN 100
IV. La TEM dans les cancers 100

ETUDE EXPERIMENTALE 105

I. Matériels et méthodes 107
A. Matériel tumoral 107
B. Recueil des cas 107
C. Analyse épidémiologique 108
D. Analyse histologique 109
Méthode 109
Réalisation des colorations histologiques 109
Analyse histologique 110

E. Analyse immunohistochimique 110
Matériel 110
Méthode 111
Réalisation des marquages immunohistochimiques 111
F. Analyses statistiques 112
II. Résultats 113
A. Analyse épidémiologique 113
B. Analyse histologique 121
C. Analyse immunohistochimique 127
D. Analyses statistiques 137
III. Discussion 139
A. Analyse épidémiologique 139
B. Analyse histologique 141
C. Analyse immunohistochimique 142

CONCLUSION 147

ANNEXE 1 : Fiche de renseignements clinico-pathologiques. 150
ANNEXE 2 : Protocole de coloration à l'hémalun-éosine sur coupes tissulaires de prélèvements fixés au formol à 10% et inclus en paraffine 152
ANNEXE 3 : Protocole de réalisation des immunomarquages. 153
ANNEXE 4 : Tableau récapitulatif des données de l'étude. 155

Table des figures

Figure 1 : Anatomie de l'épiderme du chien (X 100) 27

Figure 2 : Les différentes couches épidermiques 28

Figure 3 : Représentation schématique de la couche cornée 31

Figure 4 : Description schématique de la structure secondaire des kératines et des hétérodimères..... 34

Figure 5 : Descriptions schématiques des différents alignements des hétérodimères au sein des tétramères 35

Figure 6 : Modifications de l'expression dess kératines au cours de la kératinisation 37

Figure 7 : Modèle moléculaire des desmosomes 38

Figure 8 : Structure de l'E-cadhérine 39

Figure 9 : Distribution des cadhérines, desmogléines et desmocollines en fonction de la kératinisation 42

Figure 10 : Représentation schématique des composants des jonctions adhérentes 43

Figure 11 : Structure des caténines 44

Figure 12 : Représentation schématique des composants des jonctions serrées 46

Figure 13 : Structure des claudines 47

Figure 14 : Structure des occludines 47

Figure 15 : Structures des protéines ZO 49

Figure 16: Carcinome épidermoïde du lit de l'ongle chez un chien 57

Figure 17 : Carcinomes épidermoïdes bien différenciés cutanés canins. 60

Figure 18 : Carcinomes épidermoïdes modérément différenciés..... 61

Figure 19 : Carcinome épidermoïde peu différencié cutané canin 62

Figure 20 : Carcinome épidermoïde bien différencié chez un chat 63

Figure 21 : Carcinome épidermoïde bien différencié avec invasion péri-nerveuse chez un chat 64

Figure 22 : Carcinome épidermoïde peu différencié chez un chat 65

Figure 23 : Carcinome épidermoïde acantholytique chez un chien 66

Figure 24 : Carcinome épidermoïde verruqueux chez un chien..... 67

Figure 25 : Carcinome épidermoïde à cellules en fuseau chez un chat 68

Figure 26 : Envahissement de l'os de la 3ème phalange par des cellules peu différenciées de carcinome épidermoïde unguéal chez un chien 69

Figure 27 : Envahissement de l'os de la 3ème phalange par des cellules bien différenciées de carcinome épidermoïde unguéal chez un chien 69

Figure 28 : Les trois types de TEM 79

Figure 29 : Les aspects cellulaires de la TEM 80

Figure 30 : Effet de l'expression de la N-cadhérine dans les cellules épithéliales 83

Figure 31 : Exemple d'un mécanisme de régulation mettant en jeu le facteur de transcription Snail..... 87

Figure 32 : Les voies d'induction de la TEM 90

Figure 33 : La voie des Smad 93

Figure 34 : Exemple de mécanisme non Smad dans la transduction du signal TGFβ 94

Figure 35 : Mécanisme de transduction du signal Wnt 97

Figure 36 : Mécanisme de transduction du signal issus des RTK et coopération avec les autres voies inductrices de TEM 98

Figure 37 : Contribution de la TEM dans les cancers 101

Figure 38 : Répartition selon l'âge 114

Figure 39 : Répartition selon le doigt 117

Figure 40 : Degré moyen de différenciation des tumeurs 123

Figure 41 : Aspect microscopique de carcinome épidermoïde bien différencié 124

Figure 42 : Aspect microscopique de carcinome épidermoïde modérément différencié 124

Figure 43 : Aspect microscopique de carcinome épidermoïde peu différencié 124

Figure 44 : Aspect microscopique d'un embole de carcinome épidermoïde digité 126

Figure 45 : Aspect microscopique d'un embole de carcinome épidermoïde digité suite à l'immunomarquage des cytokératines. 126

Figure 46 : Aspect microscopique d'un embole de carcinome épidermoïde digité suite à l'immunomarquage de l'E-cadhérine. 126

Figure 47 : Aspect microscopique d'un embole de carcinome épidermoïde digité suite à l'immunomarquage de la vimentine. 126

Figure 48 : Aspect de l'immunoréactivité de l'épiderme suite à l'immunomarquage des cytokératines. 127

Figure 49 : Aspect '+++' pris par les carcinomes épidermoïdes digités canins suite à l'immunomarquage des cytokératines. 130

Figure 50 : Aspect '++' pris par les carcinomes épidermoïdes digités canins suite à l'immunomarquage des cytokératines. 130

Figure 51 : Aspect '+' pris par les carcinomes épidermoïdes digités canins suite à l'immunomarquage des cytokératines. 130

Figure 52 : Aspect de l'immunoréactivité de l'épiderme suite à l'immunomarquage de l'E-cadhérine. . 131

Figure 53 : Immunoréactivité la plus intense prise par les carcinomes épidermoïdes digités canins suite à l'immunomarquage de l'E-cadhérine. 133

Figure 54 : Exemple de faible immunoréactivité présentée par les carcinomes épidermoïdes digités canins suite à l'immunomarquage de l'E-cadhérine. 133

Figure 55 : Marquage cytoplasmique anormal pris par certaines cellules de carcinomes épidermoïdes digités canins suite à l'immunomarquage de l'E-cadhérine. 133

Figure 56 : Aspect de l'immunoréactivité de l'épiderme suite à l'immunomarquage de la vimentine 134

Figure 56 : Aspect microscopique le plus fréquent pris par les carcinomes épidermoïdes digités suite à l'immunomarquage de la vimentine. 136

Figure 57 : Aspect microscopique observé dans les zones peu différenciées ou dans les zones les plus infiltrantes des carcinomes épidermoïdes digités suite à l'immunomarquage de la vimentine. 136

Figure 58 : Représentation du degré de différenciation des tumeurs en fonction du devenir (moyenne et écart-type) 137

Figure 59 : Représentation du devenir des animaux en fonction du degré de différenciation. 138

Table des tableaux

Tableau 1 : Epaisseur de l'épiderme en micromètres, chez le chien 26

Tableau 2 : Interaction des plakophilines..... 41

Tableau 3 : Prédispositions raciales..... 55

Tableau 4 : Grading de Broders 72

Tableau 5 : Classification TNM des tumeurs digitées canines selon l'OMS 73

Tableau 6 : Répartition selon le sexe..... 113

Tableau 7 : Répartition selon la race 115

Tableau 8 : Répartition selon la localisation tumorale..... 117

Tableau 9 : Durée avant nouvelle atteinte 119

Tableau 10 : Durée avant récidive..... 119

Tableau 11 : Durée de survie..... 120

Tableau 12 : Expression des cytokératines en fonction du devenir des animaux..... 129

Tableau 13 : Expression de l'E-cadhérine en fonction du devenir 132

Tableau 14 : Expression de la vimentine en fonction du devenir des animaux 135

Liste des abréviations

% : pourcentage

AND: acide désoxyribonucléique

ARNm: acide ribonucléique messager

bHLH: protéine en hélice-boucle-hélice basique

CMH: complexe d'immunohistocompatibilité

Dab: *adaptator protein disabled*

EGF: *Epithelial growth factor*

EGF-R: *Epithelial growth factor Receptor*

FGF: *fibroblast growth factor*

GSK: *glycogen-synthase-kinase*

GTPase: guanoside-triphophastase

HDAC: déacéthylase des histones

HMG: *Hyper Motile Group*

IGF: *Insuline-like growth factor*

IGF-R: *Insuline-like growth factor Receptor*

IKK: *IκB kinase*

ILK: *Integrin linked kinase*

JAM: molécules d'adhésions jonctionnelles

kDa: kilo-Dalton

KGF: *Keratinocyte growth factor*

LEF-1*: Lymphoid enhancer factor*

NFκB: *Nuclear factor kappa B*

OMS: Organisation mondiale de la santé

PDGF: *paleted derivated growth factor*

PIP2: Phosphatidyl-inositol biphosphate

PIP3: Phosphatidyl-inositol triphosphate

ROCK: *Rho-associated kinase*

RTK: Récepteur à activité tyrosine-kinase

SIP: *Smad interacting protein*

Tcf: *T cell factor*

TEM: Transition épithélio-mésenchymateuse

TGF*: Transforming growth factor*

TIMP: *Tissular inhibitor of metaloprotease*

UV: ultra-violet

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

Zeb: *Zing finger E-box binding homeobox*

ZO: *Zonula occludens*

INTRODUCTION

Chez l'homme environ 90% des décès lors de cancer sont liés au développement de métastases, l'invasion locale et la formation de métastases étant les étapes de la cancérogenèse les plus importantes cliniquement. Par ailleurs 90% des cancers humains sont d'origine épithéliale. Or les molécules de chimiothérapie traditionnelles sont peu efficaces contre les carcinomes et ne permettent pas le contrôle de leurs métastases. C'est pourquoi l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'évolution de ces tumeurs tient une place importante dans la recherche actuelle.

Dans le cadre du développement embryonnaire, des cellules épithéliales sont mobilisées afin d'aller coloniser de nouveaux territoires. Ceci est permis par la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui est un processus cellulaire par lequel des modifications du phénotype ont lieu, rendant les cellules épithéliales motiles, capables d'invasion. La parallèle avec la progression tumorale étant évidente la recherche en oncologie s'est alors orientée vers la TEM. Depuis une vingtaine d'années de nombreuses études ont été effectuées dans ce sens et les preuves de l'implication de la TEM dans la cancérogenèse se sont accumulées. En outre les nouvelles connaissances ainsi apportées ont permis le développement de nouvelles molécules de chimiothérapie, dites de 'chimiothérapie ciblée'.

Bien que très étudiée chez l'homme la TEM a peu fait l'objet de recherche chez les carnivores domestiques.

Les tumeurs cutanées sont les tumeurs les plus couramment rencontrées chez les carnivores domestiques, parmi celles-ci le carcinome épidermoïde est la tumeur cutanée d'origine épithéliale la plus fréquente. Les carcinomes épidermoïdes sont des tumeurs qui se caractérisent par une très forte agressivité locale mais dont la formation de métastase est rare. Chez le chien les carcinomes épidermoïdes digités et tout particulièrement le carcinome épidermoïde unguéal, également dénommé carcinome épidermoïde du lit de l'ongle, sont des entités particulières dans le fait qu'elles sont plus fréquemment à l'origine de métastases que les carcinomes épidermoïdes

cutanés localisés à d'autres zones corporelles. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier l'éventuelle implication de la TEM dans les tumeurs de nos carnivores domestiques en travaillant sur les carcinomes épidermoïdes unguéaux en espèce canine.

Le carcinome épidermoïde unguéal est une tumeur prenant naissance dans l'épiderme du lit de l'ongle. Pour pouvoir utiliser cette dénomination de façon justifiée il convient de s'assurer au préalable, par un examen histologique, que le tissu tumoral dérive bien du lit de l'ongle. Il n'est pas toujours possible de mettre en évidence cette connexion en fonction des coupes réalisées, c'est pourquoi, par souci d'exactitude, nous utiliserons dorénavant uniquement le terme de carcinome épidermoïde digité, au sens large.

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus par lequel des cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques et acquièrent celles de cellules mésenchymateuses. Cela se caractérise au niveau moléculaire par la perte de protéines épithéliales et le gain de protéines spécifiques des cellules mésenchymateuses. Ainsi la survenue de la TEM dans des processus cellulaires peut être étudiée *in situ* par l'évaluation de l'expression de marqueurs immunohistochimiques spécifiques de cellules épithéliales ou de cellules mésenchymateuses. C'est ce que nous avons cherché à faire ici.

Nous avons cherché, en étudiant l'expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux au sein de tumeurs provenant de carcinomes épidermoïdes digités canins, à mettre en évidence la survenue éventuelle de la TEM dans la progression tumorale de ces tumeurs. Avant de présenter cette étude, ce travail se compose d'une partie bibliographique permettant de rappeler les connaissances nécessaires à la bonne compréhension de notre étude. Ainsi dans un premier temps nous aborderons la structure de l'épiderme, détaillant l'aspect histologique de celui-ci et ses constituants principaux. Dans un deuxième temps nous étudierons les carcinomes épidermoïdes digités et pour finir nous ferons le point sur les connaissances actuelles à propos de la TEM.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1 :

L’EPIDERME

INTRODUCTION

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau. Il repose sur le derme dont il est séparé par une membrane basale. C'est une structure fine et avasculaire ; le derme joue donc un rôle de tissu de soutien pour l'épiderme, lui servant d'assise à la fois souple et robuste tout en lui assurant un support métabolique grâce à son important réseau vasculaire. [1,2,3,4,5]

L'épiderme est de faible épaisseur. Chez le chien il mesure 0,1 à 0,5 mm dans les zones avec poils mais il est plus épais au niveau des jonctions cutanéo-muqueuses et des zones glabres, où cependant la peau dans son ensemble est plus fine. Il peut atteindre jusqu'à 1,5 mm d'épaisseur au niveau des coussinets et de la truffe, où la couche cornée est particulièrement épaisse. (**Tableau1**) [3,4,6,7]

Tableau 1 : Epaisseur de l'épiderme en micromètres, chez le chien
[D'après *Lloyd, 82*]

	Dos	Abdomen antérieur	Abdomen postérieur	Creux inguinal
Couche cornée	14.4 +/ - 1.7	12.6 +/- 2.0	14.6 +/- 3.1	12.0 +/- 3.5
Couche vivantes de l'épiderme	9.6 +/ - 2.8	11.7 +/- 2.2	10.9 +/- 3.9	8.4 +/- 1.5

L'épiderme est un épithélium malpighien pluristratifié kératinisé à renouvellement continu. Les cellules qui le constituent sont produites à sa base et elles migrent au fur à mesure vers la surface, tout en se différenciant. L'évolution morphologique des cellules de l'épiderme est principalement marquée par l'accumulation de kératine dans leur cytoplasme, c'est pourquoi les cellules de l'épiderme sont dénommées kératinocytes. Cette accumulation est tellement importante qu'au niveau de la couche cornée les cellules sont mortes et ne sont plus qu'un amas de kératine et de débris cellulaires. [1,2,3,4,5]

Les kératinocytes sont les cellules caractéristiques de l'épiderme mais ce ne sont pas les seules cellules qu'il renferme. En effet l'épiderme est constitué de 85% de kératinocytes, de 5 % de mélanocytes, de 3 à 8 % de cellules de Langerhans et de 2% de cellules de Merkel. [1,2,4,6]

Le renouvellement de l'épiderme est continu, cependant son épaisseur est constante. Ceci est dû à un équilibre entre les divisions cellulaires au niveau de la couche basale et la desquamation. En moyenne, chez le chien, la kératinisation prend 21 à 24 jours mais dans les zones où l'abrasion est plus importante cette durée est diminuée. [2,3,8]

I. STRUCTURE DE L'EPIDERME

Même si la différenciation des kératinocytes est un processus continu il est possible de distinguer à l'examen histologique 5 couches qui diffèrent par leur aspect morphologique : (**Figures 1 et 2**)

- la couche basale (*stratum germinativum* = *stratum basale*) la plus interne
- la couche épineuse (*stratum spinosum*)
- la couche granuleuse (*stratum granulosum*)
- la couche claire (*stratum lucidum*)
- et la couche cornée (*stratum corneum*) la plus externe.

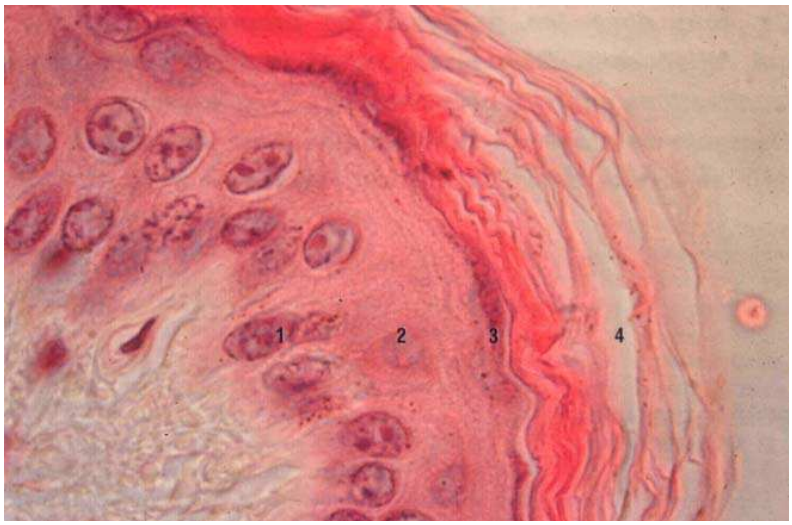
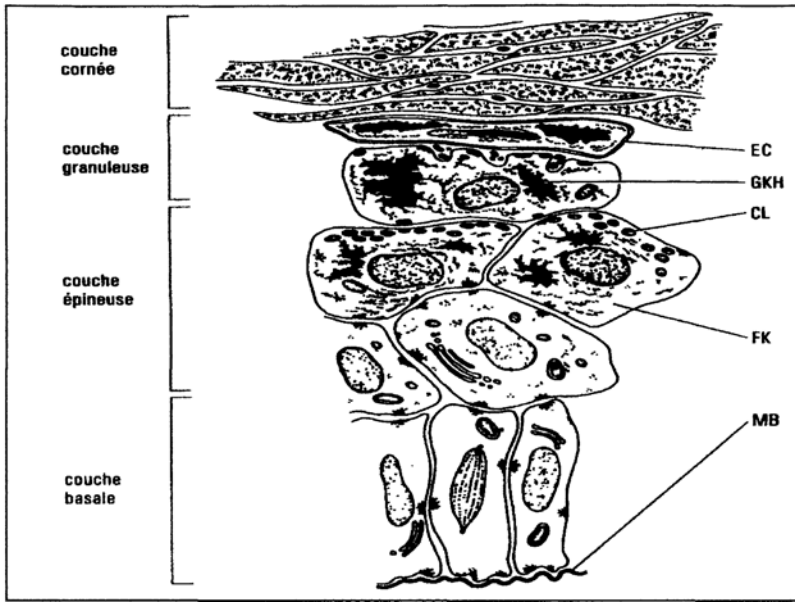


Figure 1 : Anatomie de l'épiderme du chien (X 100).
[D'après Mialot, 93]

1 : Couche basale
2 : Couche épineuse
3 : Couche granuleuse
4 : Couche cornée

Figure 2 : Les différentes couches épidermiques
[D'après *Olivry, 93*]

EC : enveloppe cornée
GKH : granule de kératohyaline
CL : corps lamellaires
FK : filaments de kératine
MB : membrane basale



A. La couche basale

C'est la couche la plus profonde de l'épiderme. Elle repose directement sur le derme dont elle est séparée par une membrane basale. [1,2,5] C'est une couche unistratifiée de cellules cubiques à faiblement cylindriques dont le noyau est grand et ovale avec des nucléoles proéminents et peu d'hétérochromatine. [1,2,4,5,6,9]

La couche basale est la couche germinative de l'épiderme. Les cellules qui la constituent ont donc une activité mitotique qui assure la production constante de nouveaux kératinocytes. Mais le renouvellement cellulaire est faible et lent. Chez le chien on estime que seulement 1,5% en moyenne des kératinocytes de la couche basale subissent une réplication de l'ADN à un moment donné. [8] Le taux de mitose varie en fonction des endroits car il est corrélé au taux de desquamation des cellules à la surface de l'épiderme. Les mitoses sont donc plus nombreuses là où la peau subit le plus de contraintes et connaît l'abrasion la plus importante. [1,2]

Ainsi la plupart des cellules de la couche basale ont une activité mitotique. La couche basale se compose en fait de 3,5% de cellules souches qui peuvent se diviser indéfiniment. Ce sont des cellules de petite taille à base lisse. Ces cellules donnent naissance à des cellules amplificatrices transitoires qui ont une activité mitotique plus intense mais limitée dans le temps. Ces cellules amplificatrices représentent 90% des cellules de la couche basale. Après avoir subi plusieurs divisions cellulaires les cellules amplificatrices finissent par entrer en différenciation et elles connaissent alors la kératinisation. [1,2,5,10]

Certains kératinocytes basaux se divisent peu mais ont une grande face basale très irrégulière et possèdent de nombreux filaments de kératine et de nombreuses structures d'ancrage à la membrane basale. Sur les autres faces ces kératinocytes émettent de fins prolongements cytoplasmiques qui s'entrecroisent avec ceux émis par les cellules adjacentes. De nombreux desmosomes sont présents au niveau de ces prolongements, ce qui confère aux kératinocytes leur forte adhésion cellulaire. **[1,2,4,5,6,9]** Les 6,5% de cellules restantes correspondent à ces kératinocytes spécialisés dans l'adhésion cellulaire ainsi qu'aux mélanocytes et aux cellules de Merkel qui sont tous deux présents au sein de cette couche. **[1,2,5,10]**

B. La couche épineuse

La couche épineuse a une épaisseur variable en fonction des régions du corps. Elle se compose d'une à deux assises cellulaires dans les zones pileuses et de plus de 20 au niveau de la truffe, des coussinets et des jonctions cutanéo-muqueuses. En moyenne la couche épineuse mesure 10µm d'épaisseur. **[3,6]**

Les kératinocytes connaissent une augmentation de taille au cours de leur progression au sein de la couche épineuse. Ce sont des cellules polyédriques de relativement grande taille. Ces kératinocytes reçoivent le nom d'acanthocytes. A l'examen histologique ils présentent de nombreuses 'épines' cytoplasmiques qui leur donnent un aspect hérissé ce qui fut à l'origine du nom donné à cette couche. Ces ponts épineux entre les cellules correspondent aux desmosomes reliant les cellules entre-elles. **[1,2,6]**

Le nucléole est bien visible et le cytoplasme est basophile, ce qui témoigne d'une intense synthèse protéique. En effet les kératinocytes de la couche épineuse produisent des cytokératines qui s'accumulent dans les cellules et ainsi plus un kératinocyte est proche de la surface de la couche, c'est-à-dire plus un kératinocyte est avancé dans sa différenciation, et plus les kératines sont en quantité importante. La kératine s'organise en faisceaux concentriques autour du noyau et s'associe aux desmosomes. **[1,2,5]**

De rares mitoses sont encore possibles au niveau de cette couche. **[2]**

C. La couche granuleuse

Chez le chien la couche granuleuse est discontinue et quand elle est présente elle se compose d'une seule assise cellulaire sauf au niveau des replis externes des follicules pileux où on en dénombre 2 à 4. En revanche, au niveau des coussinets la couche granuleuse est extrêmement développée, se composant d'une quinzaine d'assises cellulaires. [3]

Les kératinocytes de la couche granuleuse sont des cellules polygonales aplaties. Leur noyau est hyperbasophile, rétracté, voir pycnotique. [1,2,5] Cette couche se caractérise par la présence dans le cytoplasme des kératinocytes de granules de kératohyaline qui sont des amas denses, irréguliers. Il en existe deux sortes : les granules F et les granules L plus petites. [1,2,4,8,10] En plus de ces granulations de petits corps lamellaires ovoïdes, plus petits que les mitochondries, appelés corps d'Odland ou encore kératinosomes, sont observables dans les kératinocytes de la couche granuleuse. Leur taille augmente avec la différenciation, passant de 100 à 500 nm de diamètre. [4,5] Parallèlement ils se déplacent dans le cytoplasme jusqu'à se retrouver en position sous-membranaire. [4] Ces corps d'Odland contiennent de nombreuses molécules qui serviront à la synthèse de l'enveloppe cornée [2,6] ; ils sont importants et représentent 25% du volume cellulaire des kératinocytes du haut de la couche granuleuse. [2]

Au sein de cette couche les cellules adhèrent entre elles par de nombreuses jonctions serrées formant une barrière intégrale. [2]

D. La couche claire

Chez les carnivores une couche claire peut être présente entre la couche granuleuse et la couche cornée. Cette couche n'est présente que dans certaines zones de l'épiderme comme au niveau des coussinets et de manière plus exceptionnelle au niveau de la truffe. C'est une couche fine et compacte constituée de plusieurs assises de kératinocytes morts, homogènes, anucléés, hyalinisés, denses et très serrés. Ces cellules contiennent des gouttelettes rétractiles de lipoprotéines ainsi qu'une substance semi-fluide : l'éléidine, qui est une molécule proche de la kératine. C'est cette molécule, de part ses caractéristiques tinctoriales, qui est à l'origine de l'aspect clair des kératinocytes de cette couche. [3,4,5,6,11]

E. La couche cornée

La couche cornée est la couche de l'épiderme qui contient le plus d'assises cellulaires. Chez le chien son épaisseur moyenne est de 13,3 µm. Sachant qu'une assise cellulaire de la couche cornée mesure 0,3 µm en espèce canine, la couche cornée se compose donc en moyenne de 47,5 assises cellulaires. Au niveau des coussinets ces nombres sont encore plus élevés. [3,4,7]

La transition entre la couche granuleuse et la couche cornée est marquée par un processus de mort cellulaire programmée. Il y a rupture des membranes lysosomiales ce qui aboutit à la destruction des organelles et de la quasi-totalité des macromolécules des kératinocytes. Ainsi la couche cornée est constituée de cellules mortes emplies de kératine mature associée au contenu des granules de kératohyaline, l'ensemble étant recouvert de lipides imperméables libérés par les corps d'Odland. (**Figure 3**) [2,5]

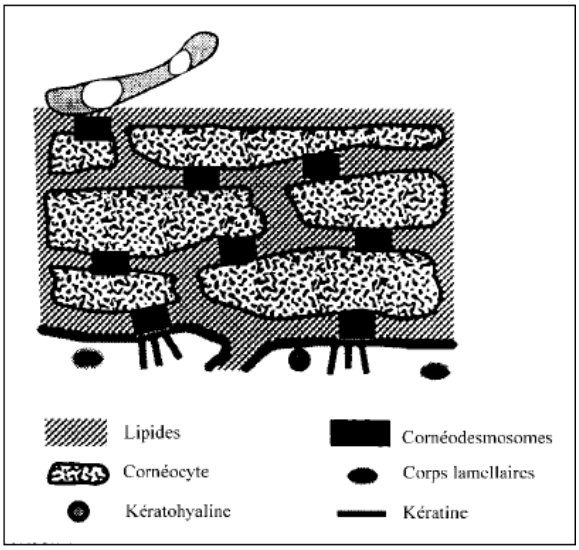


Figure 3 : Représentation schématique de la couche cornée [D'après Suter, 97]

Les cellules les plus profondes conservent leurs jonctions desmosomales et la kératine a encore un aspect organisé. Cependant ces caractéristiques disparaissent par la suite et les kératinocytes qui ont ainsi évolué sont alors appelés des cornéocytes. Ce sont des cellules polygonales, déshydratées, larges et très minces, qui sont constituées principalement de macrofilaments de kératine agglomérés. Elles sont disposées les unes sur les autres et elles adhèrent fortement les unes aux autres grâce à des desmosomes spécifiques, appelés cornéodesmosomes, et à des lipides intercellulaires. (**Figure 3**) [2]

Les lipides constituant le film lipidique de surface de l'épiderme sont issus des corps d'Odland. En effet au niveau de la transition entre la couche granuleuse et la couche cornée les corps

d'Odland s'agrègent et fusionnent avec la membrane plasmique, ils excrètent alors leur contenu lipidique dans l'espace extracellulaire ce qui forme la pro-barrière cutanée. [2,10] Les corps d'Odland libèrent également des enzymes qui vont permettre le remodelage des lipides de la pro-barrière, les rendant encore plus hydrophobes. Suite à ces modifications la barrière cutanée devient alors réellement effective. [2,10] D'autres molécules sont excrétées par les corps d'Odland, ce sont principalement des enzymes hydrolytiques qui entrent en jeu dans le processus de desquamation telles que la phosphatase acide, des carboxydases et des cathepsines. [2]

F. La membrane basale

Les membranes basales sont des matrices extracellulaires particulières qui font l'interface entre un tissu de soutien, le derme dans le cas présent, et un épithélium, l'épiderme. Elles jouent un rôle de barrière mais également de régulation du développement et de la différenciation des épithéliums car elles contrôlent l'apport en métabolites et en facteurs de croissance. [2,12]

Les membranes basales sont constituées d'une lame basale d'origine épithéliale reposant sur une lame réticulée d'origine conjonctive, c'est-à-dire d'origine dermique dans le cas de la jonction dermo-épidermique. La structure de la membrane basale n'est pas visible au moyen d'un microscope optique mais elle est bien discernable au microscope électronique. [1,2] On constate alors que la lame basale se compose de deux feuillets d'aspect différent. Le feuillet le plus externe, dénommé *Lamina lucida*, est clair et mesure 10 à 50 nm d'épaisseur. Il repose sur un feuillet plus sombre car plus dense, d'aspect fibreux et granuleux, mesurant 80 nm d'épaisseur en moyenne: la *Lamina densa*. [1]

Comme dit précédemment la membrane basale fait l'interface entre l'épiderme et le derme. Les cellules de la couche basale de l'épiderme reposent directement à la surface de la *Lamina lucida* et elles sont fortement ancrées dans la membrane basale au moyen de protéines d'ancrage qui traversent la *Lamina lucida* pour aller se fixer aux constituants de la *Lamina densa*. [1,2]

La lame réticulée, également dénommée *Pars fibroréticularis* ou *Lamina reticularis*, est moins bien définie. Elle est plus épaisse que les feuillets de la lame basale et elle fusionne avec le tissu conjonctif sous-jacent. Elle contient des fibrilles qui relient la *Lamina densa* aux fibres de collagène et d'élastine du derme. [1,2]

La *Lamina densa* joue donc un rôle central puisque c'est le seul élément de la membrane basale qui soit à la fois relié à l'épiderme et au derme. [1,2]

G. Les autres cellules de l'épiderme

Comme dit précédemment l'épiderme ne se compose pas uniquement de kératinocytes mais on y trouve aussi des mélanocytes, des cellules de Langerhans et des cellules de Merkel. Ces cellules ne sont pas mises en cause dans le développement des carcinomes épidermoïdes et dans le processus de la TEM, ainsi elles ne seront pas détaillées ici.

H. Les annexes épidermiques

Lors de la formation de l'épiderme celui-ci s'invagine localement dans le derme pour donner naissance aux annexes épidermiques : les follicules pileux, les glandes sébacées et les glandes sudoripares. Ces structures ne sont pas concernées par les carcinomes épidermoïdes c'est pourquoi elles ne seront pas détaillées ici.

II. ULTRASTRUCTURE DES KERATINOCYTES

Il s'agit ici d'étudier de plus près la structure moléculaire des kératinocytes. Nous ne détaillerons par toute leur ultrastructure pour concentrer notre étude sur les principales molécules impliquées dans le processus de la TEM. Notons que beaucoup de structures et mécanismes décrits ont été étudiés chez la souris ou chez l'homme et que nous ne disposons que de peu d'informations en espèce canine.

A. Les cytokératines du cytosquelette

Le cytosquelette des kératinocytes se compose de divers types de fibres dont les plus abondantes sont les filaments intermédiaires de kératine. En effet les cytokératines représentent environ 30%

des protéines totales des kératinocytes basaux et 85 % des protéines cytoplasmiques des cornéocytes. [10,13] Elles permettent le maintien de l'intégrité structurale des cellules, la résistance aux stress mécaniques et à la pression hydrostatique. En plus de leur rôle mécanique les kératines interviennent dans les signaux cellulaires, la compartimentalisation, la différenciation et la prolifération cellulaires. Elles influencent la réponse aux signaux intrinsèques et extrinsèques comme les signaux pro-apoptotiques et elles jouent également un rôle dans la régulation de la synthèse protéique et la croissance cellulaire, comme lors des phénomènes de cicatrisation. [13]

Structure et polymérisation

Il existe de nombreuses kératines qui diffèrent les unes des autres par leur séquence d'acides aminés. Plus de 30 kératines ont été décrites dans l'épiderme. On les classe en deux groupes : les kératines de type I qui sont acides et relativement plus petites que les kératines basiques de type II. [2,13]

Les kératines sont des protéines très stables et résistantes, riches en cystéines et en ponts disulfures. Toutes les kératines se composent d'une extrémité N-terminale, d'une portion centrale en hélice α et d'une extrémité C-terminale (**Figure 4**). Les deux régions terminales sont des portions globulaires composées de sous-domaines distincts (2 pour les kératines de type I et 3 pour le type II) qui font le lien avec certaines structures d'adhésion, dont les desmosomes et les jonctions adhérentes (voir plus loin). La partie centrale des kératines est constituée de 38 à 45% d'hélice α qui se subdivise en quatre sections distinctes composées de séquences d'heptapeptides répétées nécessaires à l'organisation en hélice. [13]

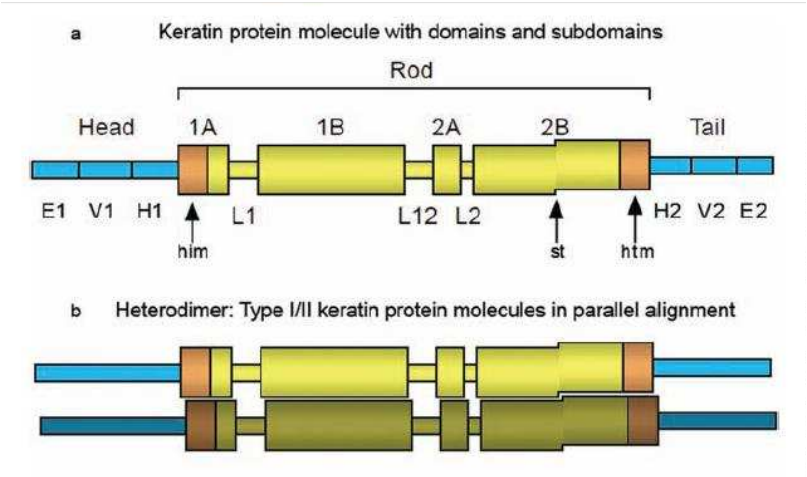


Figure 4 : Description schématique de la structure secondaire des kératines (a) et des hétérodimères (b). [D'après Bragulla, 09]

Les kératines forment des protofilaments de kératine qui sont des hétérodimères constituées par l'association d'une kératine acide avec une kératine basique (**Figure 4**). Cette association se fait de manière parallèle et ne concerne que les portions en hélice α. Deux hétérodimères s'assemblent de façon antiparallèle en tétramère de 2 nm de diamètre (**Figure 5**) puis ceux-ci s'assemblent en octomère formant des protofibrilles de kératine mesurant 4,5 nm de diamètre. Pour finir quatre protofibrilles s'associent pour former un filament de kératine de 20 nm de diamètre. Les filaments ainsi constitués peuvent s'associer latéralement et longitudinalement au sein du cytosquelette de la cellule et s'agglomérer en paquets de tonofilaments, formant un motif central cubique avec les lipides membranaires agissant comme charpente. Cet ensemble composite remplit quasiment totalement les cornéocytes. **[2,10,13]**

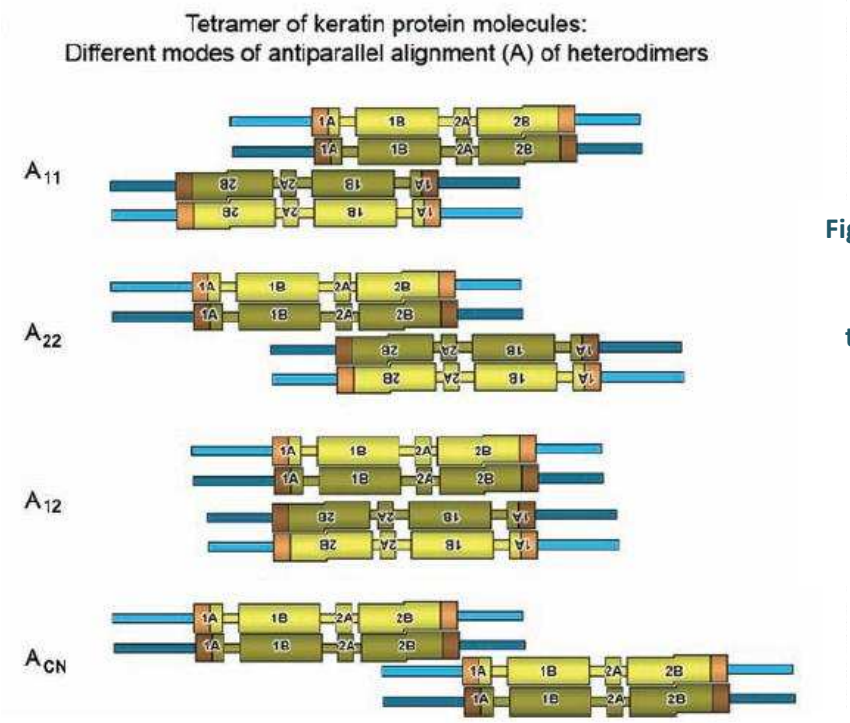


Figure 5 : Descriptions schématiques des différents alignements des hétérodimères au sein des tétramères [D'après Bragulla, 09]

Expression différentielle des kératines

Les kératines sont synthétisées différentiellement suivant les étapes de la kératinisation et la localisation. (**Figure 6**)

Les cellules souches présentes dans la couche basale expriment les kératines K5/K14 et également les kératines K15, K18 et K19 qui peuvent se substituer à la kératine K14.

L’expression de ces kératines est corrélée à l’activité mitotique et au degré de pluripotence des cellules basales des épithéliums stratifiés. La kératine K15 est régulée positivement en l’absence de kératine K14. Son expression va de paire avec l’apparition de cellules souches plus matures, qui se divisent moins. D’ailleurs la kératine K15 est plus abondante dans les régions du corps où l’épiderme connaît un renouvellement peu intense, et elle est peu représentée dans l’épiderme des coussinets. La kératine K19 est très spécifique des cellules souches, le nombre de cellules qui l’expriment diminue avec le vieillissement des individus. **[9,13]**

Les cellules amplificatrices transitoires expriment toujours les kératines K5/K14 mais on y trouve également les kératines K6/K16. La kératine K16 est un marqueur des kératinocytes capables de proliférer, de migrer et de produire la matrice extracellulaire. **[9,13]**

Dans les cellules qui se différencient les kératines K1/K10 remplacent les kératines K5/K14 et K6/K16. La kératine K1 est la première à être synthétisée, s’associant aux filaments de kératines K5/K14 et les remplaçant petit à petit. Les kératines K1/K10 sont spécifiques des kératinocytes qui n’ont plus d’activité mitotique, d’ailleurs elles préviennent la survenue de nouvelles divisions cellulaires. A partir de la troisième assise cellulaire de la couche épineuse, les kératinocytes synthétisent en plus les kératines K2 et K9, dont l’expression est induite lors de contraintes ; c’est pourquoi elles sont particulièrement abondantes au niveau des coussinets. **[9,13]**

Les kératines K25, K26, K38, K77 et K79 sont d’autres kératines secondaires qui ont été isolées dans les cellules suprabasales de l’épiderme. Au sein des coussinets les kératines K6/K16 se substituent aux kératines K1/K10. Les kératines K2 et K9 sont aussi deux kératines très représentées dans cette localisation. La kératine K71 est une kératine secondaire qui peut également être isolée dans l’épiderme des coussinets. Au sein de l’épiderme du lit de l’ongle on trouve principalement les kératines K6/K16, K7 et K31. **[13]**

Lors du développement embryonnaire les kératines K8/K18 et K19 sont exprimées dans l’épiderme simple de l’ectoderme et du périderme. Lorsque le périderme se stratifie les kératines K5/K14, K15 et K19 sont synthétisées dans la couche basale, alors que la couche superficielle exprime préférentiellement les kératines K6/K16 puis les kératines K1/K10. **[13]**

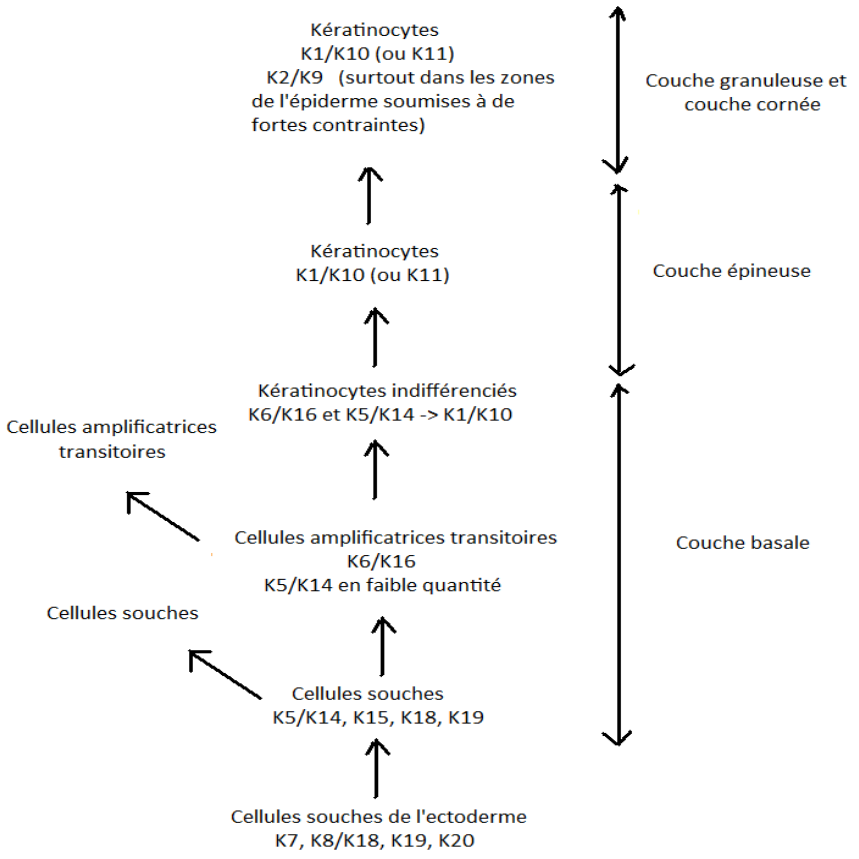


Figure 6 : Modifications de l'expression des kératines au cours de la kératinisation

B. Les moyens d'adhésion cellulaire

La cohésion mécanique intercellulaire de l'épiderme est assurée par des structures d'adhésion sur lesquelles s'ancrent les filaments du cytosquelette. L'adhésion des kératinocytes se fait par l'intermédiaire de cinq types majeurs de structures adhésives et communicatives : les jonctions communicatives, les hémidesmosomes, les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées. [2,6,9] Seules ces trois dernières seront décrites ici du fait de leurs importantes implications dans la TEM.

1. Les desmosomes

Les desmosomes sont les principales structures d'adhésion des kératinocytes. [12] Ils sont présents au sein de toutes les couches de l'épiderme, cependant ils sont peu nombreux au sein de la couche basale et leur nombre augmente avec le degré de différenciation des kératinocytes. [2,12]

Les desmosomes se composent d'une part de récepteurs transmembranaires et d'une plaque de protéines sous-membranaire d'autre part (**figure 7**). **[2,12]**

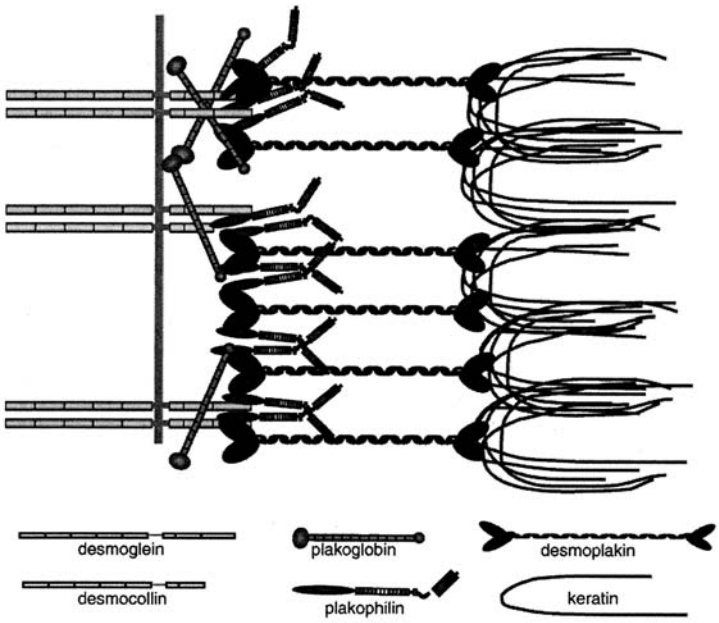


Figure 7 : Modèle moléculaire des desmosomes [D'après Hatzfeld, 07]

Les protéines transmembranaires

Les cadhérines

Les cadhérines sont une famille de protéines d'adhésion calcium-dépendante. L'E-cadhérine et la P-cadhérine sont spécifiques des kératinocytes, on les retrouve à la fois au sein des desmosomes et des jonctions adhérentes. **[2,14]**

Les cadhérines sont des protéines transmembranaires. Elles sont constituées de sept domaines (**figure 8**) dont cinq sont extracellulaires, un est transmembranaire et un est cytosolique. Les différentes cadhérines varient les unes des autres principalement par leur domaine cytoplasmique mais, dans l'ensemble, ce sont des molécules fortement conservées au sein des différentes espèces. **[2,12,15]**

Les cinq domaines extracellulaires, parfois dénommés simplement sous le terme de cadhérines extracellulaires, sont des séquences répétées d'acides aminés qui forment des liaisons homophiliques calcium-dépendantes par des séquences tripeptidiques HAV (histidine-alanine-

valine), mais également RAL (arginine-alanine-leucine) et FAT (phénylalanine-alanine-thréonine). [2,12,15]

Le domaine intracellulaire se compose de deux régions bien définies : le domaine juxtamembranaire, qui est le site de liaison pour la caténine p120, et la région C-terminale , qui est quant à elle le site de liaison de la β-caténine (voir plus loin) (**figure 8**). [15]

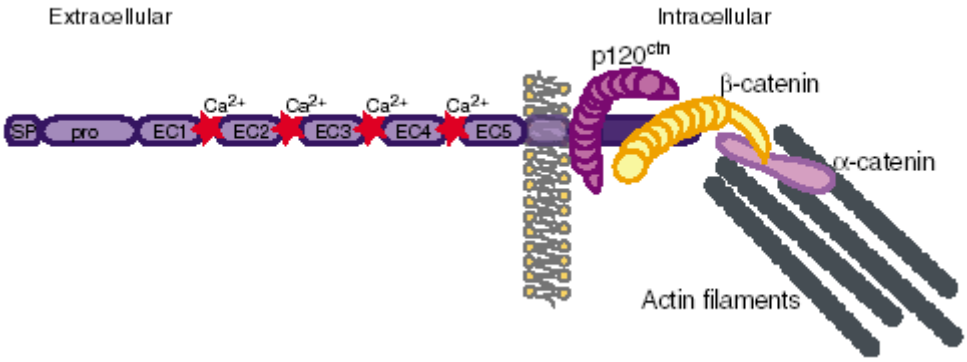


Figure 8 : Structure de l'E-cadhérine
[D'après Wheelock, 07]

Les desmogléines et desmocollines

Avec les cadhérines ce sont les principaux constituants des desmosomes. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires ; plusieurs isoformes étant décrites pour chacune de ces protéines. Tout comme les cadhérines, les desmogléines et les desmocollines forment des liaisons homophiliques calcium-dépendantes avec les protéines des desmosomes des cellules adjacentes. Ces liaisons se forment au niveau des séquences YAT (tyrosine-alanine-thréonine) que contiennent ces deux types de molécules. [2]

D'autres protéines transmembranaires moins importantes peuvent entrer dans la constitution des desmosomes. Toutes ces protéines s'associent par leur portion intracellulaire aux protéines de la plaque desmosomale. [2]

La plaque desmosomale

La plaque desmosomale est constituée de nombreuses protéines dont font partie les desmoplakines I et II, la plakoglobine, également appelée γ-caténine, la plakophiline,

l'envoplakine et la périplakine. Les desmoplakines sont les protéines les plus abondantes au sein de la plaque desmosomale. [2,6,12]

La desmoplakine I

La desmoplakine I peut se lier directement par son extrémité C-terminale à une portion de l'extrémité N-terminale des kératines de type II, en particulier les kératines K1, K2, K5, K6. La région des kératines de type II à laquelle se lie la desmoplakine I est fortement conservée entre les espèces. [2]

Les plakophilines

La plakophiline 1 existe sous deux isoformes ; une courte : la plakophiline 1a, et une longue : la plakophiline 1b. La plakophiline 1b se trouve uniquement en position intranucléaire alors que la plakophiline 1a, bien qu'ayant une localisation intranucléaire prépondérante, se retrouve également en position cytosolique, et c'est alors qu'elle joue un rôle dans le recrutement et la stabilisation des protéines desmosomales à la membrane plasmique. L'expression de la plakophiline 1 est corrélée au nombre et à la taille des desmosomes. Lors d'un manque en plakophiline1 les kératinocytes présentent une migration plus rapide au sein des couches de l'épiderme, cette différence n'est due qu'à la déstabilisation de la structure des desmosomes et ne fait intervenir aucune autre régulation. [12,16]

La plakophiline 1 est absente des kératinocytes de la couche basale. [12,16]

La plakophiline 2 existe également sous deux isoformes, a et b. On sait qu'elle a aussi une localisation intranucléaire mais cette protéine est encore mal connue et elle semble jouer un rôle moins important que la plakophiline 1. On pense qu'elle permettrait le transport de la desmoplakine jusqu'aux desmosomes, ce n'est donc pas un constituant à proprement parler des desmosomes mais elle en permet la formation. Par ailleurs, la plakophiline 2 pourrait se lier à la plus large sous-unité de la polymérase III (**Tableau 2**) et on pense qu'elle jouerait un rôle régulateur limitant la synthèse protéique et la croissance cellulaire. [12,16]

La plakophiline 3 est encore moins bien connue. Il semblerait qu'elle soit présente dans toutes les couches de l'épiderme de façon uniforme. Elle aurait la même fonction que la plakophiline 2 mais elle pourrait se lier à davantage de molécules (**Tableau 2**). **[16]**

Tableau 2 : Interaction des plakophilines
[D'après Hatzfeld, 07]

	Binding proteins	Function
Plakophilin 1	Desmoglein 1	Desmosomal transmembrane protein
	Desmocollin 1	Desmosomal transmembrane protein
	Desmoplakin	Desmosomal plaque protein
	Keratin	Cytoskeleton, mechanical stability
	Actin	
	Tubulin	
Plakophilin 2	Desmoglein 1 and 2	Desmosomal transmembrane protein
	Desmocollin 1a, 2a	Desmosomal transmembrane protein
	Desmoplakin	Desmosomal plaque protein
	Plakoglobin	Desmosomal plaque protein
	Keratin	Cytoskeleton, mechanical stability
	β-Catenin	Adherens junction protein, Wnt-armadillo-signaling pathway
	RNA-pol III subunit	Transcription of tRNA, 5 S rRNA, 7SL RNA, 7SK and U6, H1 and MRP RNAs
	Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1)	regulation of target proteins through generation of 14-3-3-binding sites
Plakophilin 3	Desmoglein 1, 2, 3	Desmosomal transmembrane proteins
	Desmocollin 1a, 2a, 3a, 3b	Desmosomal transmembrane proteins
	Desmoplakin	Desmosomal plaque protein
	Plakoglobin	Desmosomal plaque protein
	Keratin	Cytoskeleton, mechanical stability
	Dynamin 1-like	
	PABPC1	RNA metabolism
	G3BP	RNA metabolism
	FXR1	RNA metabolism

La plakoglobine

La plakoglobine est une protéine qui se lie aux cadhérines, à la desmoplakine et aux kératines, ainsi qu'à la desmogléine 1 et à la desmocolline 1. La plakoglobine, tout comme la plakophiline 1, est indispensable à la formation des desmosomes. L'absence d'une de ces molécules déstabilise la structure et rend les desmosomes inefficaces. **[12,16]**

Modifications des desmosomes avec la différenciation

Il n'y a pas que le nombre de desmosomes qui varie avec la différenciation des kératinocytes, leur composition moléculaire varie également. Cette distribution des protéines constitutives des desmosomes est détaillée dans la **figure 9**.

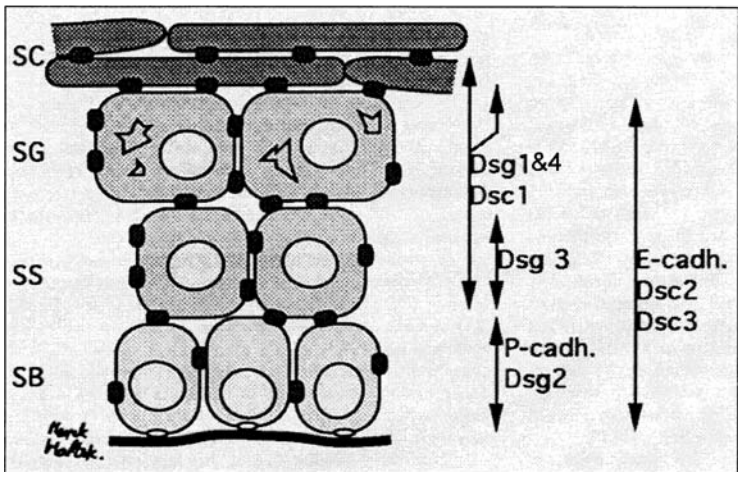


Figure 9 : Distribution des cadhérines, desmogléines et desmocollines en fonction de la kératinisation [D'après Sandjeu, 09]

A la jonction entre la couche granuleuse et la couche cornée une nouvelle protéine est synthétisée et incorporée aux desmosomes : la cornéodesmosine. C'est une glycoprotéine riche en glycine et en sérine. Une fois synthétisée elle est stockée dans les corps d'Odland, ainsi elle est excrétée dans le milieu extracellulaire lors de la formation de l'enveloppe cornée et elle s'associe alors aux desmogléines et aux desmocollines au sein des desmosomes. Ceux-ci, ainsi modifiés, reçoivent alors le nom de cornéodesmosomes. On pense que cette protéine jouerait un rôle dans la protection des desmosomes car les cornéodesmosomes résistent à la mort programmée des kératinocytes. En effet les cornéodesmosomes persistent et restent efficaces jusqu'à la desquamation des cornéocytes, et c'est le clivage de la cornéodesmosine par des enzymes épidermiques qui est à l'origine de la séparation des cornéocytes et qui rend ainsi possible la desquamation. **[2,10,12,14]**

Les desmosomes des kératinocytes présentent un renouvellement moléculaire très rapide et quasi-constant ce qui n'empêche pas les desmosomes d'être des structures extrêmement stables, qui permettent une adhésion forte entre les cellules.

2. Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont des structures d'adhésion cellulaire qui gardent les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes séparées d'environ 20 nm sur une zone circulaire de 0,2 à 0,5 µm de diamètre. Avec les jonctions serrées elles ont longtemps été considérées de faible intérêt en ce qui concerne l'épiderme, du fait de l'abondance de desmosomes qui sont à l'origine d'une forte stabilité mécanique cellulaire, et du rôle de barrière joué par la couche cornée ; mais depuis ces structures ont montré leur importance dans la physiologie de la peau. [17]

Comme les desmosomes les jonctions adhérentes sont composées de E et P-cadhérines, la P-cadhérine n'étant présente qu'au sein de la couche basale. Les cadhérines se lient aux caténines qui font ainsi le lien avec le cytosquelette. Contrairement aux desmosomes les jonctions adhérentes se connectent aux filaments d'actine des kératinocytes et non pas aux kératines. [2,17]

De manière plus précise, les jonctions adhérentes se consistuent de deux unités d'adhésion distinctes : le complexe nectine-afadine et le complexe cadhérine-caténine (**figure 10**). Les nectines et les cadhérines sont deux familles de molécules ayant des expressions cellulaires spécifiques, dont dépendent la force et la spécificité d'adhésion de la jonction. [17] Au vue des connaissances actuelles le complexe nectine-afadine n'est pas mis en jeu dans la TEM, c'est pourquoi nous ne nous y intéresserons pas dans cette étude.

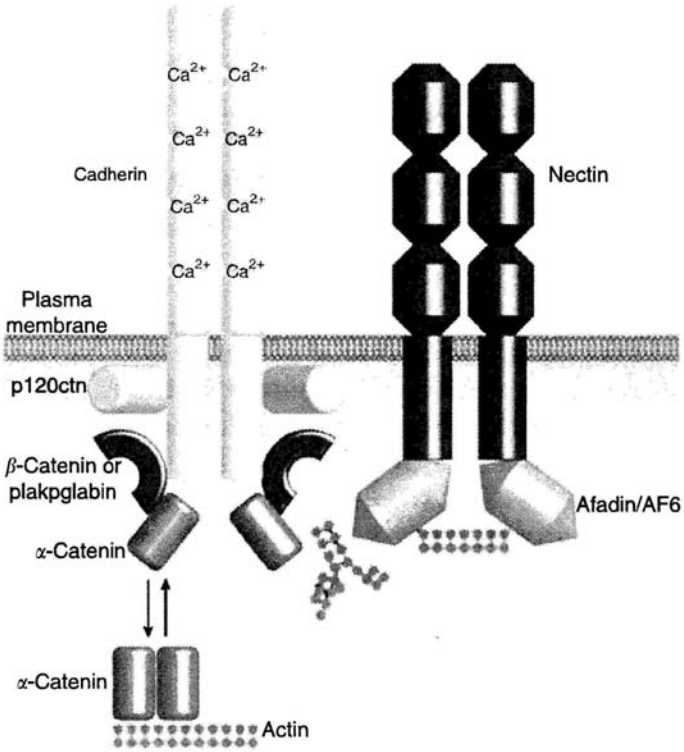


Figure 10 : Représentation schématique des composants des jonctions adhérentes [D'après Niessen, 07]

Le complexe cadhérine-caténine

Les cadhérines des jonctions adhérentes se connectent au cytosquelette via les caténines. Les caténines β et p120 se lient directement aux cadhérines alors que l'α-caténine se lie à la β-caténine et à de nombreuses protéines, mais pas aux cadhérines (**figure 10**).

L'α-caténine : Le rôle joué par l'α-caténine au sein des jonctions adhérentes n'a pas encore été prouvé *in vivo* mais on pense qu'elle stabilise la β-caténine et qu'elle pourrait renforcer sa liaison à l'actine. Par ailleurs, l'α-caténine intervient dans la régulation de la polymérisation des filaments d'actine à partir des jonctions adhérentes, bien que le mécanisme exact soit encore méconnu. **[15,17]**

La β-caténine : C'est la caténine la plus abondante au sein des jonctions adhérentes. Elle se fixe au niveau du domaine C-terminal des cadhérines, grâce à ses 13 séquences répétées d'Armadillo, qui sont des séquences particulières de 42 acides aminés formant une triple hélice α. La β-caténine joue un rôle central au sein des jonctions adhérentes, étant responsable de la majorité de la liaison des cadhérines à l'actine. Par ailleurs, la β-caténine sert de récepteur à des protéines signal telles que l'epithelial growth factor (EGF) ou des tyrosine-phosphatases. **[15,17]**

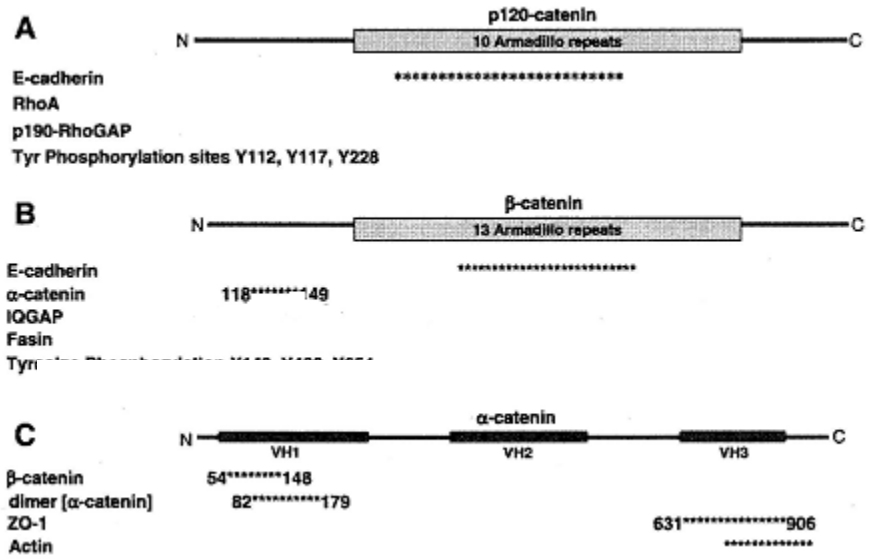


Figure 11 : Structure des caténines
[D'après Hartsock, 08]

La caténine p120 : Elle appartient à la famille des petites GTPases rho. On en dénombre quatre isoformes. Tout comme la β-caténine elle possède des séquences répétées d'Armadillo (**figure 11**), les gènes des séquences répétées d'Armadillo étant, en effet, des gènes fonctionnellement redondants. Contrairement à la β-caténine elle se fixe au niveau d'une séquence octapeptidique (YDEEGGGE) très conservée du domaine juxtamembranaire des cadhérines. Elle a pour effet de stabiliser les cadhérines au sein de la membrane plasmique lors de la mise en place des contacts cellulaires, empêchant l'internalisation et la dégradation des cadhérines. **[15,17]**

La γ-caténine : Il s'agit en fait de la plakoglobine qui, comme dit précédemment, est un constituant principal des desmosomes ; cependant la γ-caténine, comme de nombreuses autres molécules constitutives des desmosomes et des jonctions serrées, peut être incorporée aux jonctions adhérentes. Dans ce cas la caténine γ se substitue alors à la β-caténine. **[17]**

La coopération entre les différents éléments des jonctions adhérentes.

Si les nectines et les cadhérines ne se lient pas directement à l'actine du cytosquelette ce n'est pas uniquement en raison de leur structure, mais c'est également du fait de la dynamique de ces protéines. En effet les dynamiques de l'actine et des cadhérines au niveau des jonctions adhérentes sont tellement différentes que, même si ces molécules étaient capables de mettre en place des interactions les unes avec les autres, celles-ci seraient instables. D'où la nécessité d'avoir d'autres protéines pour faire le lien. **[17]**

Les études réalisées *in vitro* mettent en évidence la possibilité d'interaction entre l'afadine-6 et les caténines α et p120, mais ceci n'a pas été confirmé *in vivo*. Cependant ces deux complexes sont nécessaires à la formation des jonctions adhérentes. En effet, des études ont montré que l'adhésion cellulaire due aux cadhérines est dépendante des nectines. Ainsi celles-ci serviraient de charpente aux autres constituants des jonctions adhérentes. **[17]**

Les cadhérines comme les nectines peuvent contrôler l'activité des GTPases rho à l'origine de la dynamique de l'actine, et inversement l'activité de ces GTPases affecte les cadhérines et par conséquent la stabilité des jonctions adhérentes. Par ailleurs, de nombreuses protéines régulatrices ainsi que des protéines se liant à l'actine peuvent affecter les jonctions adhérentes. **[17]**

3. Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont des zones d'adhésion cellulaire qui oblitèrent quasiment totalement l'espace intercellulaire. Elles sont semi-perméables, laissant passer des molécules en fonction de leur taille et leur charge. La sélectivité de ces jonctions est liée à ses constituants (**figure 12**), suivant leur richesse en certains acides aminés. Les jonctions serrées jouent un rôle important dans la fonction de barrière de l'épiderme. **[9,17]**

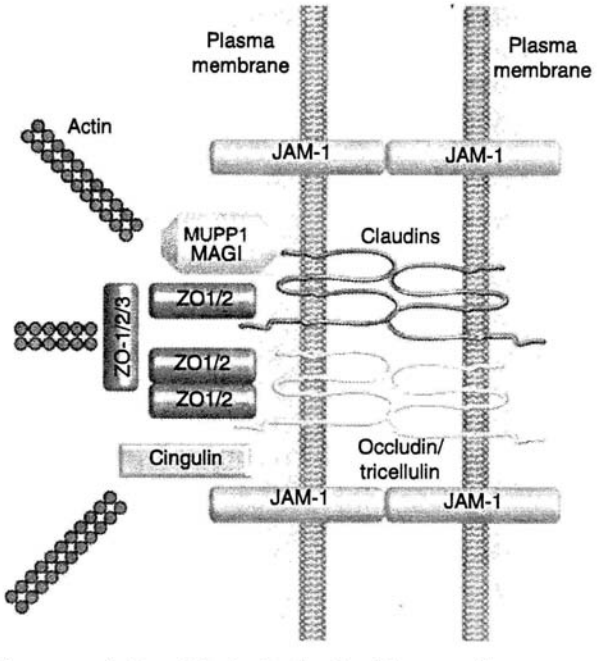


Figure 12 : Représentation schématique des composants des jonctions serrées [D'après Niessen, 07]

Les claudines

On en dénombre à l'heure actuelle plus de 24 ; ce sont des protéines à quatre boucles transmembranaires et deux boucles extracellulaires (**figures 12 et 13**). Leur extrémité C-terminale se finit par une séquence YV (tyrosine-valine) qui permet la liaison aux portions PDZ des protéines ZO (voir plus loin) des jonctions serrées. Certaines d'entres elles sont spécifiques d'organe ou de tissu.

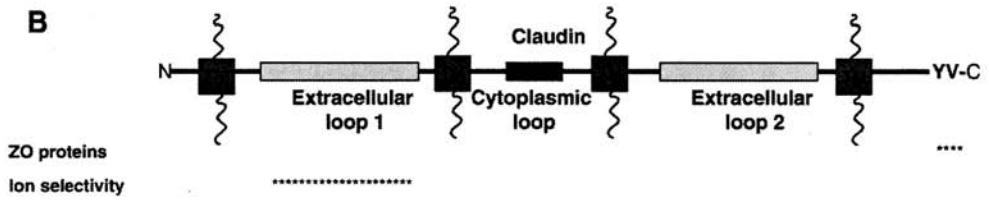


Figure 13 : Structure des claudines
[D'après Hartsock, 08]

Elles sont secrétées par les fibroblastes et sont ensuite intégrées à la membrane plasmique des kératinocytes. Elles forment alors des liaisons homophiliques calcium-dépendantes, induisant ainsi la formation des jonctions serrées. Leur fixation est à l'origine du recrutement des autres constituants des jonctions serrées dont les occludines. **[15,17]**

Les occludines

Les occludines sont des protéines ne possédant pas d'homologie de séquences avec les claudines, cependant ce sont aussi des protéines à quatre boucles transmembranaires et deux boucles extracellulaires (**figure 12 et 14**). Il en existe deux isoformes dues à un épissage alternatif des ARNm, mais ces deux isoformes ont la même distribution et *a priori* la même fonction. **[15]**

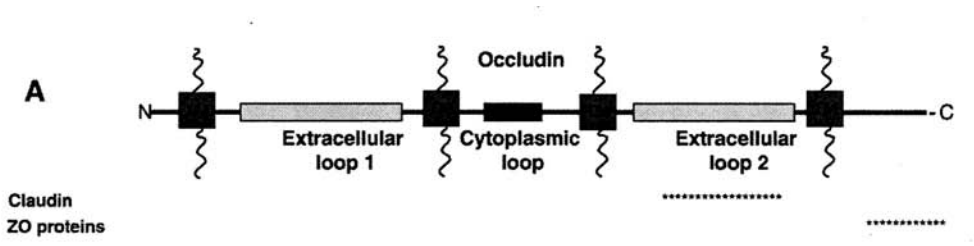


Figure 14 : Structure des occludines
[D'après Hartsock, 08]

Le rôle des occludines au sein des jonctions serrées est encore mal connu. Elles ne semblent pas être nécessaires à la structure puisque leur absence ne modifie pas la fonction de barrière et d'adhésion des jonctions serrées, mais on pense qu'elles interviendraient dans la communication de l'apoptose de cellules à cellules. **[17]**

Les molécules d'adhésions jonctionnelles (JAM) IgG-like

Il existe plusieurs de ces molécules. Elles sont capables de former des liaisons homo et hétérophiliques. Comme les claudines elles sont synthétisées par les fibroblastes et sont intégrées à la membrane plasmique des kératinocytes mais, contrairement aux claudines, elles ne permettent pas à elles-seules la formation des jonctions serrées. D'ailleurs ces molécules sont également présentes dans des cellules qui ne possèdent pas de telles structures d'adhésion. **[17]**

Les protéines ZO (*zonula occludens*)

Les claudines, les occludines et les JAM ne se lient pas les unes aux autres, d'autres molécules sont donc nécessaires pour faire le lien.

Les protéines ZO sont les principales protéines de charpente des jonctions serrées. Elles interagissent directement avec l'occludine et les claudines grâce à leurs domaines PDZ (**figure 15**), et les protéines ZO-1 et ZO-3 se lient également aux filaments d'actine par leur région riche en proline de leur extrémité C-terminale. La protéine ZO-1 peut également se lier aux JAM et aux autres protéines ZO, elle a donc un rôle central dans la structure des jonctions serrées. La ZO-2 ne se lie pas à l'actine mais elle fait le lien entre les protéines ZO-1, stabilisant ainsi la structure des jonctions serrées. Des études ont montré que la présence des ZO-2, tout comme celle des ZO-1, sont nécessaires à la formation des jonctions serrées. Il n'en est pas de même en ce qui concerne les ZO-3, mais ceci peut s'expliquer par le fait que les fonctions de la protéine ZO-3 sont redondantes avec celle de la ZO-1. **[15,19]**

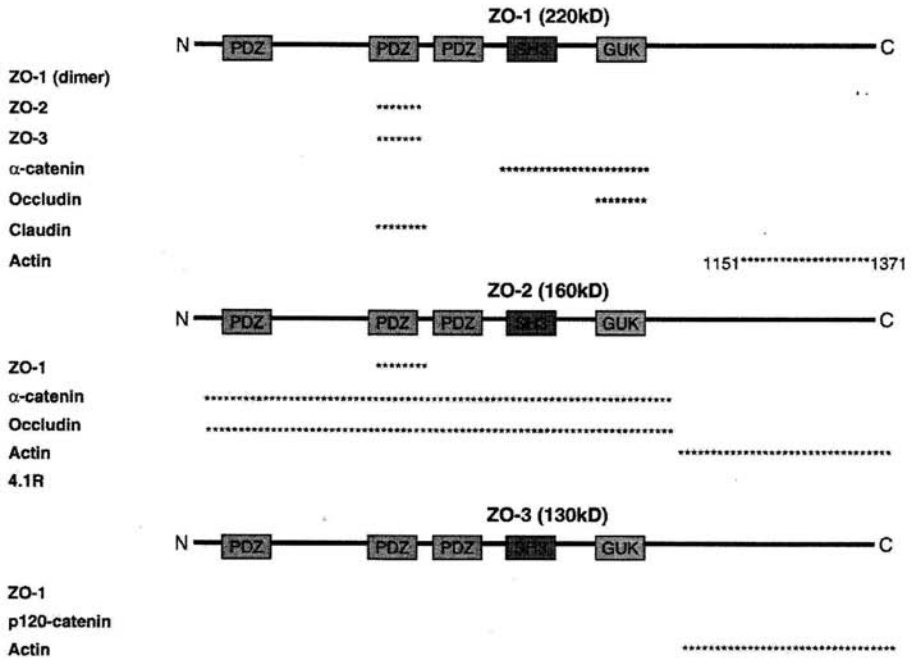


Figure 15 : Structures des protéines ZO
[D'après Hartsock, 08]

Régulation

La dynamique des jonctions serrées, c'est-à-dire son assemblage/désassemblage constant, est étroitement régulée. Il en est de même pour les systèmes de communication prenant naissance au sein des jonctions serrées. Cette régulation est complexe, elle va de la régulation transcriptionnelle à la régulation locale de la polymérisation de l'actine, du clivage de protéines, de la phosphorylation par des facteurs de croissance, de l'endocytose… **[19]**

La formation des jonctions serrées dépend des autres types de jonctions cellulaires. En effet la protéine ZO-1 est recrutée une fois que des contacts cellulaires ont été mis en place par les cadhérines et la déstabilisation des jonctions adhérentes entraîne à son tour une déstabilisation des jonctions serrées, mais pas l'inverse. Cependant il a été remarqué que la liaison possible de la ZO-1 à l'actine au niveau des jonctions adhérentes déstabilise ces dernières. Toutefois ceci ne semble pas être une règle absolue car il existe des types cellulaires qui ne mettent pas en place des jonctions adhérentes et qui pourtant possèdent des jonctions serrées. **[15,19]**

III. REGULATION DE L'EPIDERME

L'épiderme est un tissu qui connaît un renouvellement continu ; sa structure et sa fonction dépendent de plusieurs processus qui doivent être initiés pendant le développement embryonnaire et être continuellement régulés au cours de la vie de l'individu. Les données actuelles ne permettent pas de faire un schéma global et cohérent des mécanismes de régulation de l'épiderme car de très nombreux facteurs influencent la prolifération et la différenciation des kératinocytes. [18] Certains de ces mécanismes de régulation peuvent être incriminés lors de TEM, nous allons donc les présenter ici.

A. Régulation de la croissance

1. Les récepteurs du facteur de croissance épithélial (EGF-R) et ses ligands

Les récepteurs à l'EGF sont des glycoprotéines transmembranaires de 170 kDa organisées en homodimères, qui sont constituées d'un domaine extracellulaire glycosilé et d'un domaine intracellulaire à activité tyrosine-kinase. Ils sont présents de manière prépondérante au sein de la couche basale de l'épiderme. Ces récepteurs interviennent dans la régulation de la croissance de l'épiderme, en effet des expériences montrent que l'utilisation d'anticorps inhibiteurs des EGF-R bloque la prolifération cellulaire des kératinocytes de la couche basale. De même des études menées sur souris n'exprimant pas l'EGF-R montrent un épiderme fin, désorganisé, peu différencié, avec un taux de prolifération faible. [2]

Comme leur nom l'indique les EGF-R ont pour principal ligand l'EGF mais également le TGFα et l'amphiréguline. Ces facteurs de croissance sont synthétisés par les kératinocytes eux-mêmes et agissent alors de manière autocrine. L'EGF est une molécule dont la structure et la fonction sont très similaires dans les différentes espèces, ne variant que par leur poids moléculaire. Le TGFα et l'amphiréguline partagent de nombreuses homologies avec l'EGF et ont de nombreux effets similaires. [2]

Sous l'action de l'EGF les kératinocytes canins sont en perpétuelle croissance. Si l'EGF est présente en grande quantité cela induit une hyperplasie ainsi qu'une hypertrophie des kératinocytes. Cependant les études montrent qu'au-delà d'un certain seuil l'EGF réprime la

prolifération cellulaire et conduit à des différenciations aberrantes. En ce qui concerne le TGFα des études menées sur des souris montrent que lorsque le TGFα est surexprimé les souris présentent une hypertrophie de l'épiderme, mais aucune anomalie de l'épiderme n'est notée sur des souris dont l'expression du TGFα est bloquée, seul les follicules pileux sont modifiés. On pense que ce dernier résultat est lié à la redondance des ligands de l'EGF-R d'autant plus que trois types différents d'EGF-R sont exprimés par les kératinocytes. [2]

Le rôle des EGF-R est complexe, les différents ligands de ces récepteurs peuvent les activer de manière différentielle. Par ailleurs les EGF-R ne s'associent pas uniquement sous forme d'homodimères mais également en hétérodimères qui conduisent alors à l'activation de boucles de transduction complexes.

2. Les Insulin-like Growth Factor (IGF)

Il en existe deux : l'IGF-I et l'IGF-II. L'IGF-I est principalement produit par les fibroblastes dermiques sous l'action du PDGF. La fixation de l'IGF-I à son récepteur, présent dans la membrane des kératinocytes, induit la phosphorylation du domaine intracellulaire à activité tyrosine-kinase du récepteur, ce qui a pour conséquence de stimuler les mitoses par une voie qui met en jeu l'EGF-R ainsi que le TGFα et l'amphiréguline. [2]

3. Keratinocyte Growth Factor (KGF)

Le KGF fait également parti des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF). Tout comme l'IGF-I il est synthétisé par les fibroblastes dermiques mais son récepteur est exclusivement exprimé par les kératinocytes. Les études sur culture cellulaire montrent que le KGF augmente la prolifération cellulaire mais seulement si les cellules sont confluentes. Ceci aboutit à la formation de paquets de petites cellules serrées les unes aux autres dont la différenciation et la mort cellulaire programmée sont retardées. Ces résultats concordent avec les études *in vivo*, des études amplifiant l'action du KGF dans les kératinocytes de la couche basale montrent que cela induit la formation d'un épiderme fin mais hyperprolifique, constitué de nombreuses petites cellules très serrées les unes aux autres par rapport à un épiderme normal. [2,9]

Des études ont été faites avec des souris qui ne répondent pas au KGF, on observe alors une atrophie de l'épiderme par diminution de la prolifération et perturbation de l'équilibre entre cellules souches et cellules différenciées. Il a alors été supposé que le KGF jouerait un rôle dans la prévention d'une induction prématurée de la différenciation en plus de la régulation de la prolifération de l'épiderme à proprement parler. [2]

B. Régulation de la différenciation

La sortie du cycle cellulaire est liée à la densité cellulaire et à la confluence des cellules et elle semble être une étape nécessaire pour permettre la différenciation terminale des kératinocytes. La plupart des mécanismes promouvant la différenciation de l'épiderme se révèle être des inhibiteurs de la croissance. De nombreuses molécules ont un effet sur la régulation de la différenciation de l'épiderme. La vitamine D, le calcium et les rétinoïdes ont une place importante dans cette régulation. Le TGFβ est lui aussi un régulateur de la différenciation de l'épiderme, du fait de son implication dans les mécanismes à l'origine de la TEM nous allons le détailler.

Le Transforming Growth Factor β (TGFβ)

Le TGFβ est à l'origine d'une inhibition de la croissance des kératinocytes ce qui favorise leur entrée en différenciation.

C'est une protéine homodimérique de 25 kDa très conservée dans les différentes espèces. Il s'agit d'une famille de protéines comptant au moins 5 molécules qui sont secrétées sous forme latente par les kératinocytes des couches suprabasales et qui agissent de manière autocrine. Le TGFβ a un effet réversible sur la croissance qu'il inhibe en supprimant la synthèse d'ADN et empêchant ainsi les mitoses, cependant il ne stimule pas véritablement la différenciation. Paradoxalement *in vitro* de fortes concentrations de TGFβ induisent l'expression des kératines K6 et K16 qui, rappelons le, sont des kératines présentes uniquement dans des kératinocytes ayant une importante activité mitotique. [2,9]

PARTIE 2 :

LE CARCINOME EPIDERMOIDE DIGITE EN ESPECE CANINE

INTRODUCTION

Le carcinome épidermoïde est une tumeur maligne des tissus épithéliaux malpighiens qui peut donc concerner de nombreux tissus et localisations, dont la peau. Le carcinome épidermoïde cutané fait partie des tumeurs cutanées du chien les plus fréquentes : c'est la 2ème tumeur maligne cutanée la plus fréquente après le mastocytome. Les extrémités digitées sont une localisation assez courante du carcinome épidermoïde, pouvant prendre naissance au sein de la peau ou du lit de l'ongle. En localisation digitée, le carcinome épidermoïde possède des caractéristiques différentes des autres carcinomes épidermoïdes cutanés, que ce soit d'un point de vue épidémiologique ou de son comportement biologique. [19,20]

I. EPIDEMIOLOGIE

A. Fréquence

Les carcinomes épidermoïdes digités sont des tumeurs fréquentes du chien. [21,22] 81% des masses digitées en espèce canine sont néoplasiques et elles sont plus souvent malignes que bénignes. [23, 24] Le carcinome épidermoïde est la première tumeur digitée maligne du chien, suivi par le mélanome. [23,24,25,26] D'après *Goldschmidt et Shofer* 32% des carcinomes épidermoïdes cutanés sont des carcinomes épidermoïdes digités [27] et parmi ces derniers la plupart sont en fait des carcinomes unguéaux. [23]

B. Age

Le carcinome épidermoïde, toutes localisations confondues, peut se développer chez des individus jeunes mais l'incidence augmente avec l'âge. [28] Chez le chien l'incidence maximale des carcinomes épidermoïdes se situe entre 6 et 10 ans. [28] Si l'on considère uniquement les carcinomes épidermoïdes digités ils touchent majoritairement les animaux de 7 ans et plus, l'incidence maximale se situant vers 9 – 10 ans. [20,25,27,28,29]

C. Sexe et stérilisation

D'une manière générale le sexe et la stérilisation ne sont pas des facteurs prédisposant aux carcinomes épidermoïdes. Les carcinomes épidermoïdes digités ne dérogent pas à cette règle. [20,25,27]

D. Races et robes

Lors de carcinome épidermoïde cutané les animaux atteints sont principalement des chiens à robe claire, peu pigmentée. [19,30,31] Au contraire les carcinomes épidermoïdes sont essentiellement rencontrés sur des chiens de robe foncée. [20,24]

Les chiens de grandes races à robe foncée sont reconnus prédisposés au développement de carcinome épidermoïde digité [29], avec en moyenne 76,2% des chiens atteints appartenant à des grandes races et 71,4% des chiens ayant une robe à dominante foncée. [25]

De nombreuses races sont décrites dans la littérature comme étant prédisposées, elles sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Prédispositions raciales, [d'après Goldschmidt, 92]

Races à risque augmenté	
Schnauzer géant	+15,0
Setter Gordon	+13,3
Caniche	+5,9
Schnauzer moyen	+4,9
Scottish terrier	+3,7
Labrador retriever	+2,4
Rottweiler	+2,3
Daschshund	+2,2
Schnauzer nain	+1,7
Caniche nain	+1,5

Races à risque diminué	
Golden retriever	-0,4
Boxer	-0,3
Lhassa apso	-0,2
Collie	-0,2
Basset hound	-0,1
Beagle	-0,1
Shetland	-0,1

II. ETIOPATHOGENIE

Plusieurs causes à la formation des carcinomes épidermoïdes unguéaux sont envisagées. Les traumatismes, les infections ou inflammations chroniques, des composés chimiques cancérigènes, des substances caustiques ainsi que les rayonnements UV font partie de celles-ci. **[30]**

Les rayonnements solaires ont rapidement été suspectés lors de carcinome épidermoïde cutané chez le chien et le chat, en raison de la prédominance de cas rencontrés sur des animaux à robes claires, localisés préférentiellement au niveau de zones corporelles exposées au soleil. Les rayonnements solaires sont reconnus pour leurs effets mutagènes, les UVB agissant sur l'ADN en causant la formation de dimères au niveau de deux bases pyrimidiques adjacentes. Ces dimères vont alors gêner lors de la réplication et engendrer ainsi des mutations. Ainsi les lésions de kératose solaire sont considérées comme une forme pré-cancéreuse des carcinomes épidermoïdes. Dans le cas des carcinomes épidermoïdes digités cette étiologie est considérée comme peu importante du fait de la localisation particulière et de la prédisposition des chiens à robe foncée. **[28]**

Une inflammation ou une infection chroniques sont réputées pouvoir conduire au développement de carcinome épidermoïde digité, il en est de même pour toute blessure, brûlure ou encore lors de l'altération d'une griffe. **[22,30]** Cependant un seul cas est rapporté chez le chien dans la littérature. **[32]**

Chez l'homme l'implication de papillomavirus dans l'étiopathogénie des carcinomes épidermoïdes digités et péri-unguéaux est bien établie. D'après *Alam et al* la présence de papillomavirus est détectée dans plus de 90% des carcinomes épidermoïdes digités humains. **[23]** *Teifke et al* ont étudié la présence de papillomavirus dans les carcinomes épidermoïdes canins, or sur les 11 cas de carcinome épidermoïde digité aucun ne montre la présence de papillomavirus. **[31]**

III. ETUDE CLINIQUE

A. Localisation

Il est admis qu'aucun membre [29,25,35] et qu'aucun doigt n'est davantage prédisposé à développer un carcinome épidermoïde digité qu'un autre.

B. Signes cliniques

Le carcinome épidermoïde digité concerne le plus fréquemment un seul doigt mais des atteintes digitées multiples, simultanées ou consécutives sont possibles. [19, 20,24,29]

Figure 16: Carcinome épidermoïde du lit de l'ongle chez un chien [D'après Zaugg, 05]

Les lésions les plus précocement observées sont des anomalies de la griffe et une inflammation. [27,29] Ensuite on observe fréquemment une perte de la griffe et la formation d'une masse (figure 16). [27,28,29] Il s'agit généralement au moment du diagnostic d'une masse mesurant 0,3 à 3 cm de diamètre, douloureuse, pouvant même conduire à l'apparition d'une boiterie. [20,25,26,29,30,35,36] L'ulcération de la masse est une complication courante [22], présente dans 38,1%. [26]

C. Evolution tumorale

Atteinte multiple

Le carcinome épidermoïde digité peut présenter des lésions digitées multiples. Ces lésions peuvent apparaître simultanément ou alors successivement. Des atteintes multiples sont décrites dans moins de 6% des cas. [25,26,29,36] Il n'existe pas de données sur le délai d'apparition entre

les différentes atteintes ,mais d'après les rares cas décrits dans la littérature il semble que ce délai soit très variable, allant de l'ordre du mois à l'ordre de l'année. **[34,37]**

Extension locale

Lors de carcinome épidermoïde l'envahissement local est important **[30]** Il en est de même dans le cas particulier des carcinomes épidermoïdes digités. Une atteinte osseuse de la 3ème phalange par extension locale est très fréquente **[20,21,27,35]** et une lyse osseuse est visible radiographiquement au moment du diagnostic dans plus de 80% des cas. [23,25,26,29,36] L'envahissement peut même s'étendre aux gaines des tendons des muscles fléchisseurs et extenseurs des doigts ainsi qu'à la 2ème phalange. **[26,27,28]**

Extension régionale et générale

Le carcinome épidermoïde est reconnu comme étant une tumeur maligne mais dont les métastases sont rares et tardives. Lorsque des métastases sont présentes celles-ci concernent alors les nœuds lymphatiques drainant la région de l'atteinte tumorale, et encore plus rarement des métastases sont retrouvées dans les poumons. **[28,30]** Les carcinomes épidermoïdes digités diffèrent à ce sujet des autres carcinomes épidermoïdes, les métastases sont plus fréquentes et plus précoces. **[22,30,38,39]** Une extension métastatique aux nœuds lymphatiques est rapportée dans 10 à 29% des cas. **[20,21,25,36]** Ces métastases ne sont pas toujours détectées au moment du diagnostic de la tumeur mais elles sont généralement mises en évidence plus de 8 mois plus tard. **[20,40]**

IV. ETUDE CYTOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE

A. Etude cytologique

L'intérêt de la cytologie en cancérologie repose sur le fait que la morphologie des cellules varie en fonction de leur degré de différenciation, mais les tumeurs sont rarement constituées de

cellules présentant toute un même degré de différenciation. Ainsi la qualité et la représentativité de l'échantillon cellulaire prélevé sont très importantes. C'est pourquoi plusieurs prélèvements sont nécessaires. [41,42] Par ailleurs une réaction inflammatoire peut être associée au développement tumoral et les cellules inflammatoires alors présentes dans les prélèvements peuvent se révéler gênantes pour l'établissement d'un diagnostic cytologique. [41,42]

Lors de l'observation microscopique de prélèvements issus de carcinome épidermoïde trois populations cellulaires sont représentées. C'est principalement la part représentée par chacune de ces populations cellulaires qui permet de catégoriser le degré de différenciation du carcinome épidermoïde, mais des modifications de la morphologie de ces trois populations vont également de paire avec la différenciation du carcinome.

1. Carcinome épidermoïde bien différencié

La population cellulaire majoritaire est constituée par des cellules polygonales de grande taille (**figure 17**). Le cytoplasme est souvent plissé ce qui forme des angles à sa périphérie et donne à la cellule un aspect de flocon voire de cellule dendritique. [42] Le noyau a des contours irréguliers, il peut être pycnotique et rarement des cellules sont binucléées. Le rapport nucléoplasmique est faible. Des vacuoles translucides et fréquemment réfringentes sont visibles dans le cytoplasme, il arrive que ces vacuoles masquent partiellement le noyau. Des globes cornés bien kératinisés sont observables. [42]

La deuxième population cellulaire représente environ 30% des cellules nucléées observées. Ce sont des cellules rondes ou ovales, plus petites que les cellules décrites auparavant (**figure 17**). Leur chromatine est hyperchromatique et plusieurs nucléoles de grande taille et de forme variée sont visibles. Parfois on peut observer des signes de diskératose comme la présence d'un ou plusieurs anneaux dans le cytoplasme. [42]

Pour finir, la dernière population cellulaire observable est représentée par des cellules possédant une queue cytoplasmique rappelant des queues de comètes, ces cellules reçoivent le nom de cellules 'têtards' par certains auteurs. Quand elles sont observées ces cellules têtards sont très évocatrices de carcinome épidermoïde. [42]

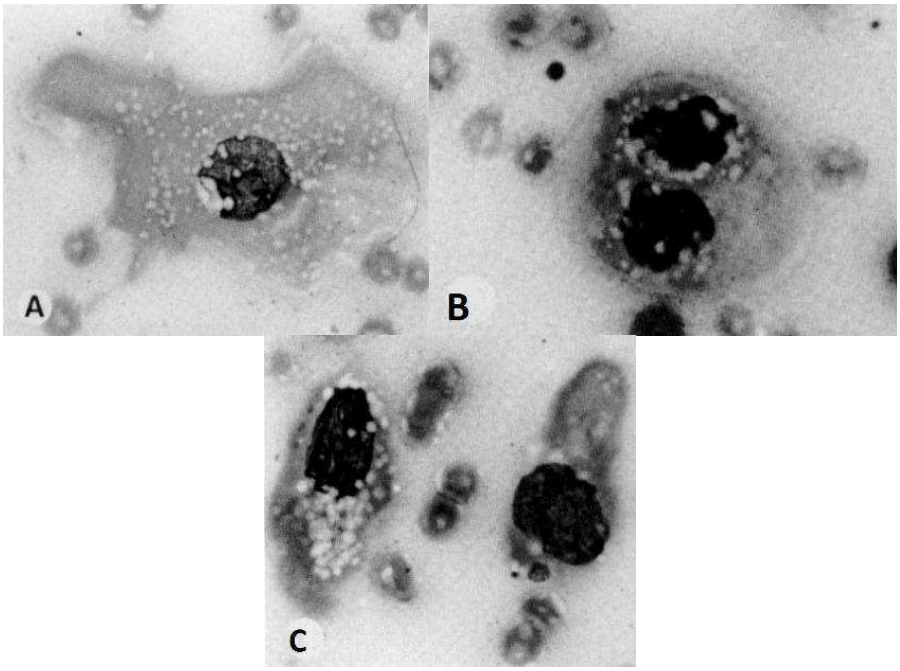
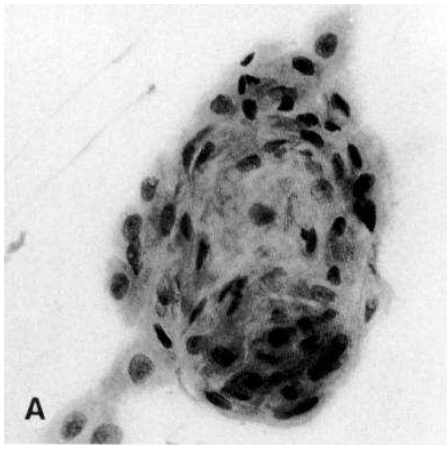


Figure 17 : Carcinomes épidermoïdes bien différenciés cutanés canins, coloration de Wright. A. Grande cellule en forme de flocon possédant plusieurs vacuoles translucides dans son cytoplasme. B. Cellule ronde binucléée avec un noyau hyperchromatique. C. Deux cellules ovales. Celle de gauche contient de nombreuses vacuoles translucides. [D'après Garma-Aviña , 94]

2. Carcinome épidermoïde modérément différencié

Les proportions entre les cellules polyédriques et les cellules rondes ou ovales sont inversées par rapport au carcinome épidermoïde bien différencié, les cellules rondes ou ovales étant majoritaires. Elles sont présentent soit isolément, soit par paires ou en amas suivant la persistance des jonctions intercellulaires. Cet aspect jointif des cellules est un bon indicateur de l'origine épithéliale de ces cellules. Le rapport nucléoplasmique est assez élevé. Le cytoplasme contient parfois de minuscules vacuoles transparentes. Le noyau tend à être circulaire. [42]

Les globes cornés (**figure 18**) sont moins fréquents et les cellules qui les constituent présentent fréquemment une vacuolisation translucide péri-nucléaire. [42]



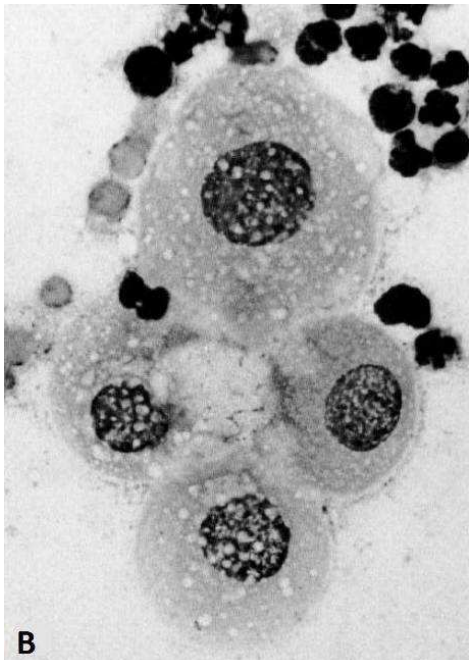
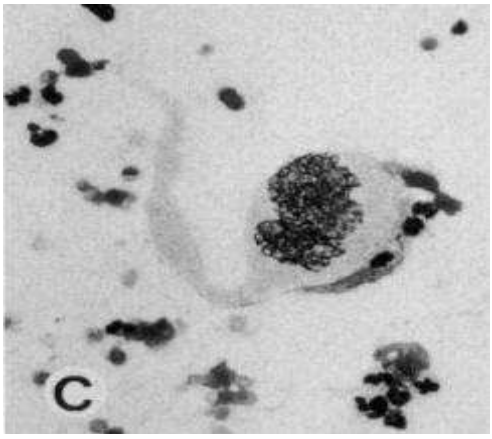


Figure 18 : Carcinomes épidermoïdes modérément différenciés, coloration de Wright.

A. Carcinome épidermoïde cutané canin : globe corné partiellement kératinisé.
B. Carcinome épidermoïde cutané félin : groupe de cellules rondes cohésives.
C. Carcinome épidermoïde cutané félin : cellule « têtard » et nombreux neutrophiles.



3. Carcinome épidermoïde peu différencié

La population de cellules rondes ou ovales représente la quasi-totalité des cellules observées. Les cellules têtards sont encore moins fréquemment observées que pour les autres degrés de différenciation décrits précédemment et leur queue n'est plus qu'une ébauche. [42]

Les cellules rondes ou ovales ont un cytoplasme bleu-gris. Des vacuoles translucides peuvent occasionnellement être observées, elles se localisent préférentiellement autour du noyau. Les nucléoles sont toujours nombreux et bien visibles. Le rapport nucléoplasmique est encore plus

élevé que dans les carcinomes épidermoïdes modérément différenciés. Des cellules plurinucléées peuvent être présentes (**figure 19**). [42]

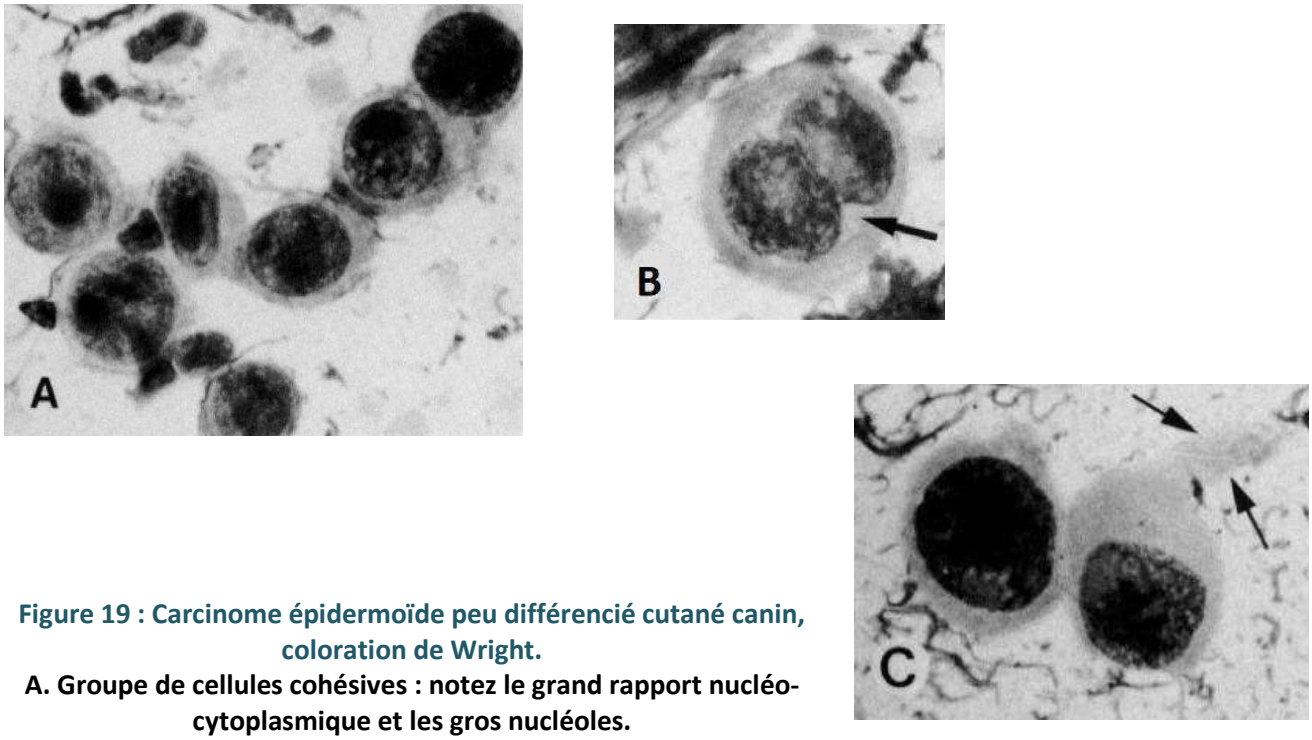


Figure 19 : Carcinome épidermoïde peu différencié cutané canin, coloration de Wright.
A. Groupe de cellules cohésives : notez le grand rapport nucléo-cytoplasmique et les gros nucléoles.
B. Cellule ronde binucléée : discrète dyskératose et quelques vacuoles (flèche) près du noyau.
C. Cellules possédant une ébauche de queue cytoplasmique, mieux visible sur celle de droite (flèches).
[D'après *Garma-Aviña, 94*]

B. Etude histologique

La représentation histologique du carcinome épidermoïde est similaire quelque soit la partie du corps considérée. [28] Ce sont des néoplasmes non encapsulés et asymétriques. [20] Les cellules néoplasiques plus ou moins différenciées rompent l'intégrité de la membrane basale et envahissent alors le derme et le tissu sous-cutané en formant des îlots ou des cordons au sein de ces tissus. Cette infiltration néoplasique peut s'accompagner d'une inflammation plus ou moins marquée. [30]

Pour être qualifié de carcinome épidermoïde unguéal des connections focales ou multifocales entre la tumeur et l'épithélium du lit de l'ongle doivent être observées. Plusieurs coupes sériées peuvent parfois être nécessaires pour mettre en évidence ces connections. [20]

1. Carcinome épidermoïde bien différencié (grade 1)

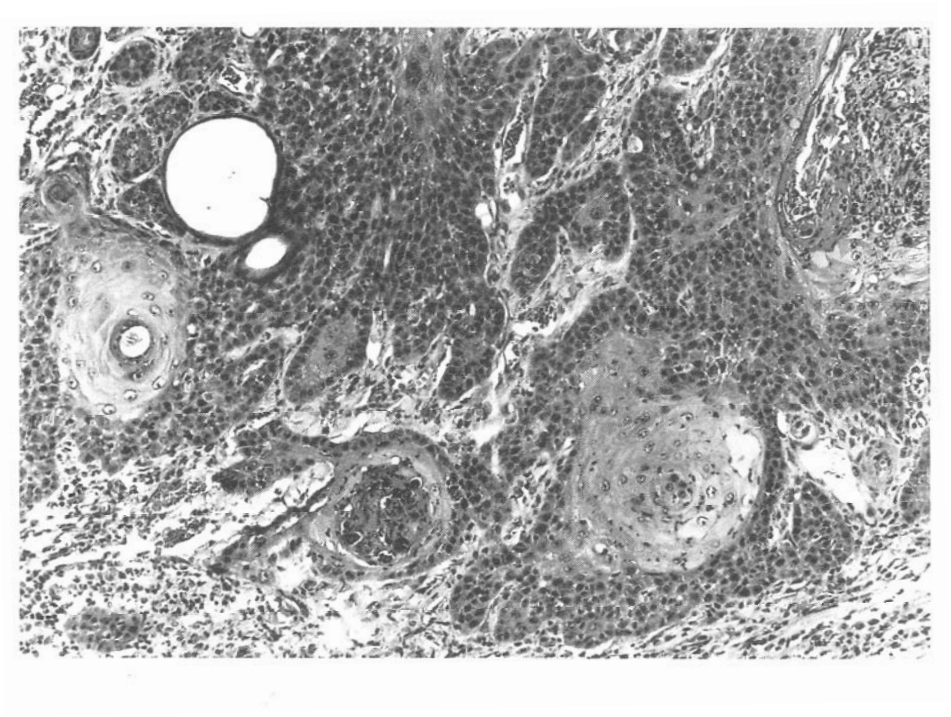


Figure 20 : Carcinome épidermoïde bien différencié chez un chat [D'après Gross, 05]

Lors de carcinome épidermoïde bien différencié les cellules néoplasiques sont généralement organisées en vastes îlots ou travées (**figure 20**). Les cellules sont imbriquées en lamelles concentriques, formant de grands foyers de kératinisation centripète dont le centre est constitué principalement par de la kératine mature, fortement éosinophilique. Ces perles de kératine sont de taille et de nombre variable. Une nécrose du centre de ces structures est possible, accompagnée d'une éventuelle infiltration neutrophilique secondaire. [20,22,27,42]

Dans les carcinomes épidermoïdes bien différenciés les cellules ont les mêmes caractéristiques que les kératinocytes de l'épiderme. On trouve à la périphérie une assise de cellules basales polyédriques, non kératinisées, à cytoplasme amphophile. Au-delà de cette assise, les cellules tumorales connaissent la kératinisation jusqu'au stade des kératinocytes granuleux. Ainsi au

centre de ces formations les cellules sont larges, polygonales, kératinisées. Ces cellules tumorales ont un cytoplasme éosinophilique abondant, plus pâle que celui des cellules épithéliales saines adjacentes. [20,27] Le noyau de ces cellules présente un faible pléomorphisme avec souvent un unique nucléole. [20,27] Les ponts intercellulaires sont nombreux. [20,22,27,42]

L'activité mitotique est faible. [20,27,42]

De petits amas de cellules partiellement kératinisées peuvent être présents dans le stroma. De même des foyers d'infiltration péri-nerveuse sont possibles (**figure 21**). [20]

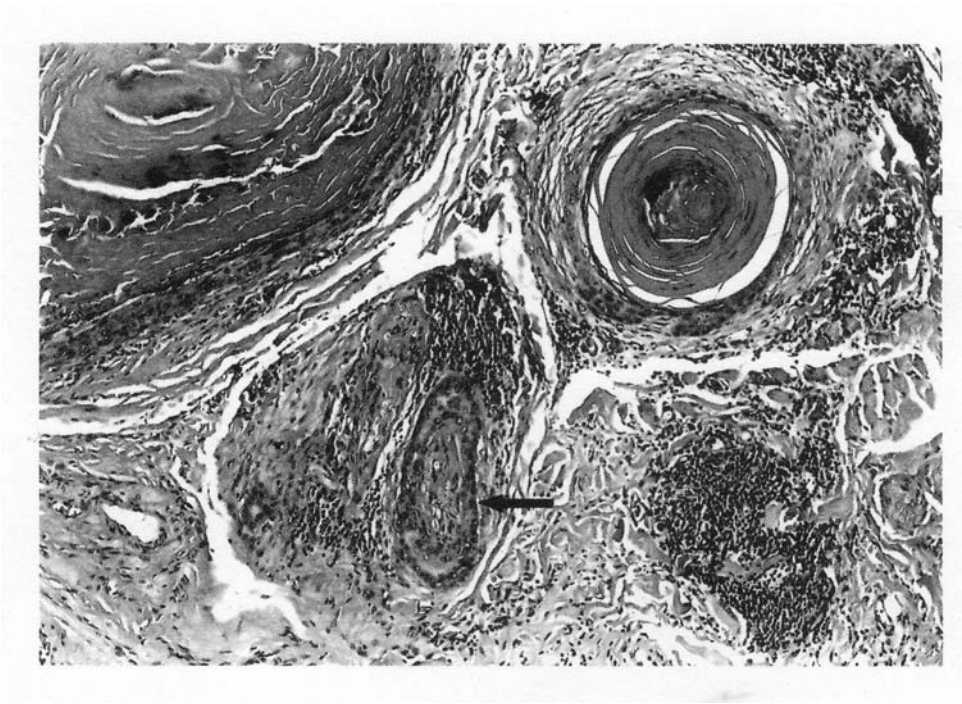


Figure 21 : Carcinome épidermoïde bien différencié avec invasion péri-nerveuse (flèche) chez un chat [D'après Gross, 05]

2. Carcinome épidermoïde modérément différencié (grade 2 et 3)

Ces tumeurs sont plus invasives. Les îlots de cellules tumorales sont plus petits et les perles de kératine sont moins nombreuses et contiennent moins de kératine. [20,27,42] Les cellules basales forment plusieurs assises cellulaires. [20,22]

Les cellules néoplasiques présentent un pléomorphisme nucléaire plus important et la chromatine est plus hyperchromatique. Les ponts intercellulaires sont moins nombreux et plus difficiles à identifier. [20,22,27,42]

L'activité mitotique est plus importante et des atypies peuvent être observées. [20,27]

3. Carcinome épidermoïde peu différencié (grade 4)

Les perles de kératine ne sont plus présentes, seules quelques cellules sont partiellement kératinisées de manière individuelle (**figure 22**). Les cellules sont isolées ou alors rassemblées en petits cordons au sein d'une matrice fibreuse. L'envahissement est encore plus important. **[20,22,27,42]**

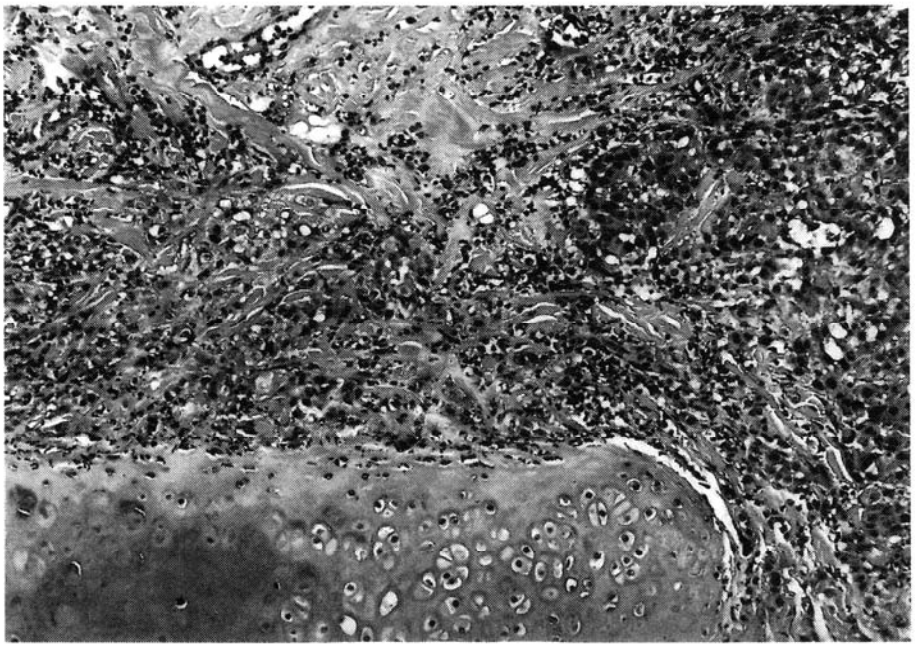


Figure 22 : Carcinome épidermoïde peu différencié chez un chat
[D'après Gross, 05]

Contrairement aux deux degrés de différenciation décrits auparavant, le cytoplasme des cellules néoplasiques lors de carcinome épidermoïde digité peu différencié est amphophile. Les cellules sont de plus petite taille, les noyaux sont extrêmement pléomorphes, la chromatine est très hyperchromatique et les nucléoles sont souvent multiples et prédominants. Les ponts intercellulaires sont très rares. **[20,27,42]**

L'activité mitotique est encore plus importante que dans les carcinomes épidermoïdes modérément différenciés et les mitoses anormales sont fréquentes. **[20,27]**

En plus de cette distinction en fonction du degré de différenciation on peut reconnaître des formes histologiques particulières de carcinome épidermoïde. Parmi celles-ci, les carcinomes épidermoïdes acantholytiques, verruqueux, à cellules fusiformes, à cellules claires, et les carcinomes épidermoïdes produisant de la mucine sont décrits chez le chien. ***[20]*** *Ne seront décrits ici que les trois plus fréquents.*

4. Carcinome épidermoïde acantholytique

Le carcinome épidermoïde acantholytique est une forme non courante qui se caractérise par une absence de cohésion cellulaire. Des petites zones d'acantholyse (**figure 23**) sont toujours présentes au sein des carcinomes épidermoïdes mais ici elles sont prédominantes. La tumeur est organisée en une formation centripète pseudoglandulaire par effondrement des cellules partiellement kératinisées en son centre ; ceci est dû à l'absence de ponts intercellulaires. Des résidus cellulaires flottent au centre de ces structures ou sont suspendus à la périphérie de cette pseudo-lumière par de rares ponts intercellulaires allongés. **[20,27]**

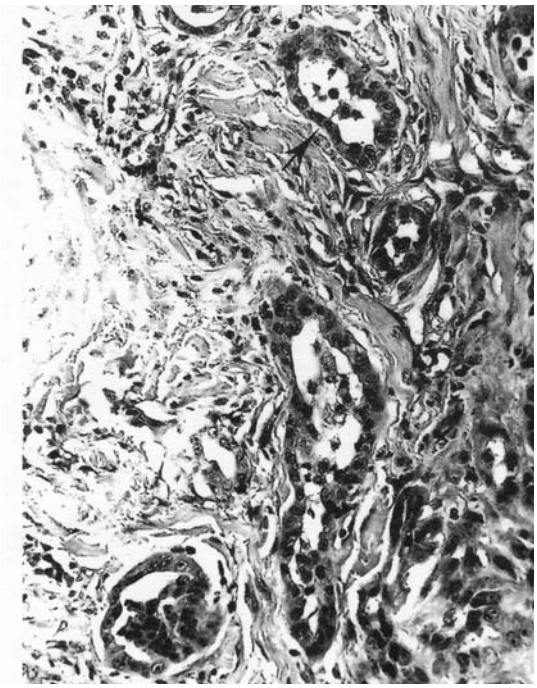


Figure 23 : Carcinome épidermoïde acantholytique chez un chien [D'après Gross, 05]

5. Carcinome épidermoïde verruqueux

La forme verruqueuse est une forme histologique rarement rencontrée. Cette forme est à la fois exophytique et endophytique (**figure 24**), elle se caractérise par de larges proliférations papillaires, par des travées à extrémités aveugles et par de larges invaginations tubulaires, le tout étant fortement anastomosé. **[20]**

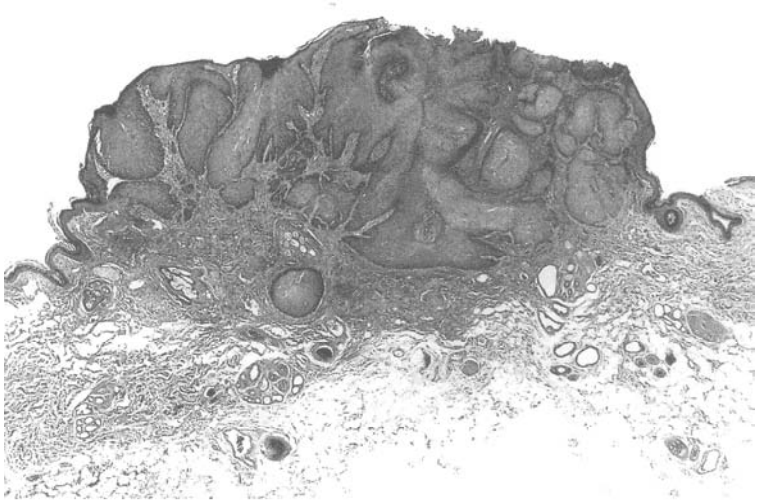


Figure 24 : Carcinome épidermoïde verruqueux chez un chien
[D'après Gross, 05]

Les cellules néoplasiques sont de petits kératinocytes polyédriques à cytoplasme modérément éosinophilique, tels qu'on les rencontre dans le bas de la couche épineuse de l'épiderme. Ces cellules sont entourées d'une assise périphérique de cellules basales. Aucune perle de kératine n'est observable et seuls quelques petits amas de kératine amorphe au centre des travées peuvent être observés. **[20]**

L'activité mitotique est faible bien que des mitoses, pouvant présenter des atypies, sont parfois visibles au sein des couches suprabasales. **[20]**

6. Carcinome épidermoïde à cellules fusiformes

C'est une forme rare. [20,22] Les cellules sont larges, pléomorphes et évidemment fusiformes (**figure 25**). Leur cytoplasme est abondant, pâle ou amphophile. Des foyers de cellules partiellement kératinisées à cytoplasme éosinophilique sont tout de même présents mais ils sont restreints à des zones limitées. [20]

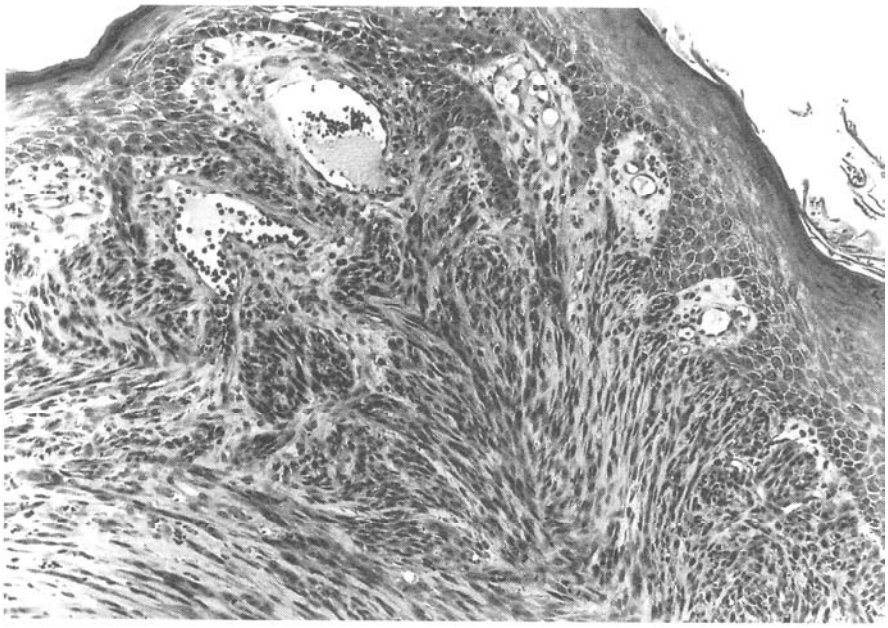


Figure 25 : Carcinome épidermoïde à cellules en fuseau chez un chat [D'après Gross, 05]

7. Les lésions histologiques osseuses associées

L'atteinte de la 3ème phalange est très fréquente. On peut ainsi observer des signes de lyse osseuse et/ou de prolifération osseuse périostée. L'espace médullaire est souvent infiltré par des agrégats de cellules épithéliales néoplasiques (**figure 26 et 27**). [20] Une ostéomyélite peut parfois être présente. L'articulation interphalangienne peut montrer des signes d'invasion tumorale en plus d'une synovite chronique, toutefois le plus fréquemment le tissu tumoral n'envahit pas l'espace interarticulaire mais s'étend le long du périoste et s'infiltre le long du tissu péri-articulaire qui s'y connecte. Une atteinte de la 2ème phalange est possible, sa moitié proximale étant rarement concernée. [20]

Figure 26 : Envahissement de l'os de la 3ème phalange par des cellules peu différenciées de carcinome épidermoïde unguéal chez un chien [D'après Gross, 05]

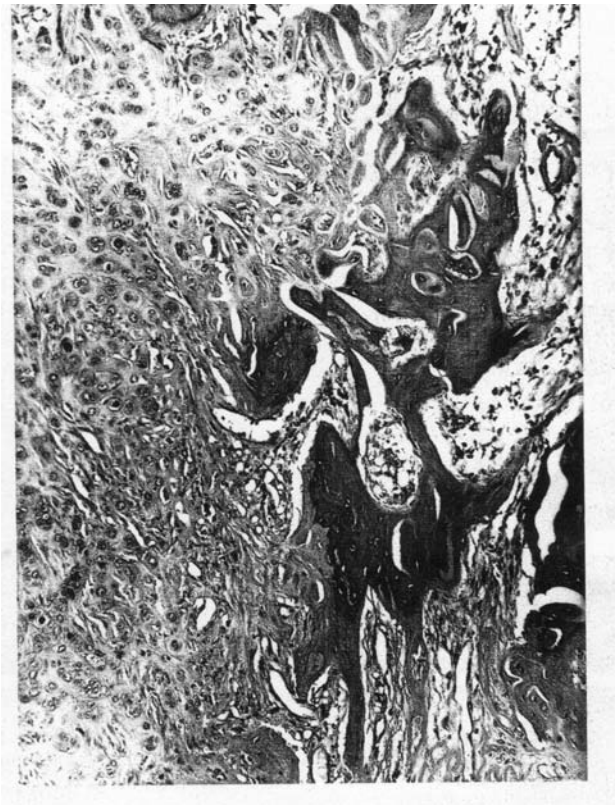


Figure 27 : Envahissement de l'os de la 3ème phalange par des cellules bien différenciées de carcinome épidermoïde unguéal chez un chien [D'après Gross, 05]

V. DIAGNOSTIC

Comme pour toute consultation il convient en premier lieu de se renseigner sur les commémoratifs (âge, race, mode de vie, antécédents pathologiques, traitement (s) précédent (s) ou en cours) et sur l'anamnèse (mode d'installation, durée d'évolution). Ces renseignements sont à rapprocher des données épidémio-cliniques des carcinomes épidermoïdes digités décrits précédemment afin de savoir si on est dans une situation en faveur d'une telle pathologie. Ensuite il est important de réaliser un examen clinique général complet de l'animal. Ceci permet de mettre en évidence d'éventuels signes cliniques dus à des maladies concomitantes, ou conséquences indirectes de la tumeur et d'évaluer ainsi l'état de santé général de l'animal. [43]

Examen local de la tumeur

Puis un examen rapproché de la tumeur est à réaliser. Dans le cas des carcinomes épidermoïdes unguéaux l'examen direct de la tumeur est aisé du fait de sa localisation. Comme détaillé dans la partie consacrée à l'étude clinique des carcinomes épidermoïdes digités les principaux signes cliniques sont des anomalies de la griffe, voire une perte de celle-ci, une inflammation, formation d'une masse plutôt ferme qui souvent s'ulcère ; tout ceci étant associé à une douleur du membre pouvant conduire à une boiterie. [26,27]

Examens complémentaires

La délimitation locale du processus néoplasique nécessite le recours à l'imagerie médicale. En effet la réalisation de clichés radiographiques est nécessaire à l'évaluation de l'infiltration osseuse qui, comme nous l'avons dit précédemment, est très fréquente lors de carcinome épidermoïde digité, pouvant aller jusqu'à affecter la 2ème phalange en plus de la 3ème phalange. [20,26,27,28] Les images obtenues ne sont pas pathognomoniques de processus néoplasique et elles ne permettent pas de déterminer la nature de la tumeur. Les signes radiographiques les plus souvent observés sont essentiellement un gonflement des tissus mous et une lyse osseuse phalangienne marquée par une diminution de l'opacité de l'os. [29,39,44] Cependant, lors de carcinome épidermoïde digité canin, il est parfois décrit des réactions osseuses productives et des réactions périostées. [29]

La nature exacte de la tumeur ne peut cependant être déterminée avec certitude que par examen microscopique (cytologie et/ou histologie) [45]

Diagnostic différentiel

Globalement le diagnostic différentiel du carcinome épidermoïde cutané, dont les carcinomes épidermoïdes digités, comprend de nombreuses affections tumorales et granulomateuses. [35] Dans le cas du carcinome épidermoïde unguéal les lésions de nature traumatique prennent une place importante au sein du diagnostic différentiel. De même il convient de différencier un carcinome épidermoïde d'une onychose. [30,46]

Bilan d’extension

Dès qu’on suspecte un processus néoplasique il convient de réaliser un bilan d’extension.

Bilan d’extension régionale

Les nœuds lymphatiques concernés lors de carcinomes épidermoïdes digités sont les nœuds lymphatiques cervicaux superficiels et les nœuds lymphatiques poplités. Ces nœuds lymphatiques sont palpables, toute anomalie de taille et/ou de consistance de ces nœuds lymphatiques est à rechercher. Lorsque des modifications sont constatées ceci n’est pas pathognomonique d’un envahissement tumoral du nœud lymphatique, mais il peut s’agir d’une adénopathie réactionnelle, particulièrement si la tumeur est ulcérée ou nécrosée. **[45]**

Seul un examen microscopique permet de faire la distinction entre ces deux cas, ainsi si des anomalies des nœuds lymphatiques sont constatées des examens cytologiques et/ou histologiques sont à envisager. **[43,45]**

Bilan d’extension générale

Le carcinome épidermoïde digité peut être à l’origine de métastases pulmonaires. Elles sont plus souvent rencontrées que lors d’autres types de carcinomes épidermoïdes, toutefois elles restent peu fréquentes. Leur recherche se fait grâce aux examens d’imagerie médicale. Pour rechercher des métastases pulmonaires les examens envisageables sont la radiographie, la tomodensitométrie et l’échographie. **[44,47,48,49]**

VI. PRONOSTIC

A. Considérations générales

Lors de processus néoplasiques le pronostic dépend de plusieurs facteurs : [50]

- la nature de la tumeur et son comportement biologique
- les possibilités thérapeutiques fonction de la taille, la localisation, l'accessibilité des moyens thérapeutiques, les moyens financiers
- le malade.

Afin d'aider à l'évaluation du pronostic des systèmes de gradation et l'établissement de stades cliniques ont été mis en place, donnant ainsi des indications aux cliniciens et aidant au choix de la thérapeutique la plus adaptée. [28]

B. Gradation des carcinomes épidermoïdes

Lors de carcinome épidermoïde, quelque soit la localisation, le système de gradation utilisé est le grading de Broders. Il se base sur l'importance de la kératinisation et distingue ainsi 4 grades (**Tableau 4**). [27]

Tableau 4 : Grading de Broders

Grade	Pourcentage de cellules différenciées
I	75-100
II	50-75
III	25-50
IV	< 25

Le grade I correspond à un carcinome épidermoïde bien différencié, il s'agit d'une tumeur dite de bas grade. Le grade IV, quant à lui, correspond à un carcinome épidermoïde peu différencié, dit de haut grade. [28] Cependant les études distinguent bien souvent seulement trois grades, classant les carcinomes épidermoïdes en bien différenciés, modérément différenciés et peu différenciés comme c'est le cas dans le grading de Weiss et Fress. [22,51]

C. Stades cliniques

Les stades cliniques donnent des indications sur le pronostic et aident à établir une stratégie thérapeutique. L'établissement de stades cliniques permet aussi d'harmoniser les études qui comparent les réponses aux traitements. [28] Toutefois il existe de nombreuses classifications et certaines études n'emploient pas de telle classification.

Les stades cliniques sont basés sur un système développé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). [28] La classification repose sur la taille de la tumeur primitive, l'envahissement des nœuds lymphatiques et la présence ou absence de métastases. Les trois niveaux : local (T), régional (N) et à distance (M) sont pris en compte [28], chaque type tumoral possédant une classification spécifique. [28] La classification propre aux tumeurs digitées canines est présentée dans le **Tableau 5**.

Le stade de la tumeur est inversement proportionnel au pronostic : plus la taille de la tumeur est importante, moins le pronostic est bon. [27] De même la présence de métastases péjore généralement le pronostic.

Tableau 5 : Classification TNM des tumeurs digitées canines selon l'OMS [D'après Henry et al, 05]

Tumeur primitive	
T_1	Tumeur < 2 cm de diamètre, superficielle ou exophytique
T_2	Tumeur de 2-5 cm de diamètre avec un faible envahissement indépendamment de la taille
T_3	Tumeur > 5 cm de diamètre, ou envahissant le tissu sous-cutané
T_4	Tumeur envahissant les fascias ou les os
Nœuds lymphatiques	
	Pas de signe d'un envahissement des nœuds lymphatiques
N_0	Exérèse préalable de(s) nœud(s) lymphatique(s)
N_R	Nœud lymphatique ipsilatéral mobile
N_1	Nœuds lymphatiques ipsilatéral ou controlatéral mobiles
N_2	Nœuds lymphatiques fixes
N_3	(1) histologiquement / cytologiquement négatif (2) histologiquement / cytologiquement positif
Métastases à distance	
M_0	Pas de signe de métastases à distance
M_1	Signes de métastases à distance

D. Cas du carcinome épidermoïde digité

Les carcinomes épidermoïde digités sont reconnus pour être plus agressifs et pour avoir un pouvoir métastatique plus important que les autres carcinomes épidermoïdes cutanés. Cependant le temps de survie n'en est pas affecté [26,30,39] et **le pronostic est bon.** D'après *Marino et al* 95% des chiens atteints de carcinome épidermoïde digité survivent au delà d'un an, et 74% vivent au-delà de 2 ans (contre 76,2% et 42,9% lors de mélanome, la deuxième tumeur maligne du lit de l'ongle). [23]

Des pourcentages de survie sont aussi donnés en fonction de la taille de la tumeur. Ainsi, suivant les publications, 76,2% à 95% des chiens présentant une lésion de moins d'1 cm survivent au-delà d'un an contre 42,9% à 75% pour des tumeurs dépassant cette taille. [21,25] Toutefois, dans tous les cas la présence de métastases au moment du diagnostic est corrélée à un temps de survie sans récidive plus court. [26]

Généralement avec un traitement adapté le taux de récidive est faible. D'après les quelques cas décrits quand celles-ci sont présentes elles surviennent en moyenne 7-8 mois après le traitement initial. [40,52] Rappelons que des atteintes digitées multiples surviennent dans moins de 6% des cas [25,26,29,36], des métastases régionales sont possibles dans 10 à 29% des cas [20,21,25,36] et des métastases pulmonaires sont rencontrées dans 2,7% à 13% des cas suivant les auteurs. [23,25]

L'établissement du pronostic est une étape préliminaire au choix par le clinicien de la conduite thérapeutique la plus adaptée à l'animal considéré.

VII. TRAITEMENT

D'une manière générale, lors de processus néoplasique, le choix du traitement dépend de nombreux paramètres dont la localisation et la taille de la tumeur, le stade clinique, l'état général de l'animal, les moyens (techniques et financiers) disponibles,…

A. La chirurgie oncologique

Lors de carcinome épidermoïde digité la chirurgie oncologique de choix est l'amputation du doigt atteint puisque des lésions osseuses de la troisième phalange et éventuellement de la deuxième phalange sont très fréquentes. L'amputation du doigt permet ainsi une exérèse complète et large de la zone tumorale tout en restant peu gênante pour l'animal et simple de réalisation. [24]

L'étude de *Wobeser et al* réalisée sur 42 chiens atteints d'un carcinome épidermoïde unguéal ne permet pas d'établir de médiane de survie suite à la réalisation d'un tel traitement. Sur les 42 chiens, 11 sont décédés de mort naturelle ou suite à une euthanasie, due au développement de métastases (10 individus) ou à une récidive locale (1 individu), la plupart dans l'année suivant l'amputation. [24]

B. Les traitements adjuvants

La radiothérapie

La radiothérapie peut être effectuée seule ou associée à d'autres thérapeutiques. [19] Dans le cas des carcinomes épidermoïdes digités la radiothérapie est surtout employée en traitement adjuvant à la chirurgie et/ou lors de récidive locale. La radiothérapie externe est la technique la mieux adaptée du fait de son bon rendement en profondeur. [19]

Les principaux inconvénients de la radiothérapie sont les risques associés à l'exposition, la disponibilité (nécessité de structures spécifiques soumises à autorisations) et son coût.

La chimiothérapie

Lors de carcinome épidermoïde digité, du fait des bons résultats de l'amputation, la chimiothérapie est principalement envisagée comme traitement adjuvant lors de carcinome épidermoïde de haut grade et/ou de stade clinique élevé. Jusqu'à peu les molécules anti-cancéreuses utilisées en chimiothérapie systémique avaient peu voire pas d'effet sur les carcinomes épidermoïdes. [30,53] De nouvelles molécules anti-tumorales ayant des mécanismes

d’action très différents font actuellement l’objet de recherche ; parmi celles-ci on peut citer les inhibiteurs des tyrosine-kinases et les inhibiteurs des EGF-R et de l’IGF-1R. **[54,55]**

PARTIE 3 :

LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE

INTRODUCTION

Une des divergences les plus primitives au cours du développement embryonnaire est la distinction entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses. Les cellules épithéliales sont des cellules qui présentent une forte cohésion intercellulaire, essentielle à l'intégrité des organismes pluricellulaires et à l'établissement d'un environnement interne régulé indépendamment du milieu extérieur. **[56,57]** Cependant le développement de structures et de fonctions plus complexes requièrt une certaine flexibilité de la part des cellules, cette flexibilité est apportée par les cellules mésenchymateuses qui sont des cellules à forte motilité capables de migration. **[56,58,59]**

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un processus complexe par lequel des cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques et acquièrent le phénotype et les propriétés des cellules mésenchymateuses. D'une manière générale la TEM se caractérise par une sous-expression des marqueurs épithéliaux et une sur-expression des marqueurs mésenchymateux, l'ensemble conférant un caractère motile et invasif aux cellules. **[56,59]**

A l'origine la TEM fut mise en évidence et étudiée dans l'embryogénèse et l'organogenèse, où des dédifférenciations passagères associées à des migrations de cellules épithéliales sont observées. Ainsi la TEM intervient lors de la gastrulation, de la formation de la crête neurale ou encore lors de la palatogenèse, lors de la formation des valvules cardiaques, la néphrogenèse, la myogenèse, ... **[56,57,60,61]** Plus récemment la TEM a été mise en cause dans d'autres processus, en effet elle est impliquée dans certains mécanismes physiologiques de l'adulte, comme la réparation tissulaire, mais également dans des mécanismes pathologiques comme la fibrose et la cancérogenèse. **[56,60]** En effet dernièrement de nombreux gènes et voies de régulation de la TEM ont été incriminés dans des processus néoplasiques et inversement des gènes connus pour leur implication dans l'oncogenèse ont été redécouverts comme étant des éléments importants de l'embryogenèse. **[61]**

Depuis il a été admis et décidé de classer la TEM en trois types, en fonction du contexte biologique dans lequel ils ont lieu et des biomarqueurs [62] qui y sont associés. Ainsi on reconnaît aujourd'hui (**Figure 28**). :

- la TEM de **type 1** regroupant les phénomènes de TEM observés lors de l'embryogenèse et l'organogenèse,
- la TEM de **type 2** qui concerne la cicatrisation, la régénérescence tissulaire et la fibrose qui sont des TEM fortement dépendantes de l'inflammation,
- et la TEM de **type 3** qui est celle ayant lieu dans les cellules épithéliales néoplasiques, les modifications d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs réactivant des mécanismes de TEM. [63]

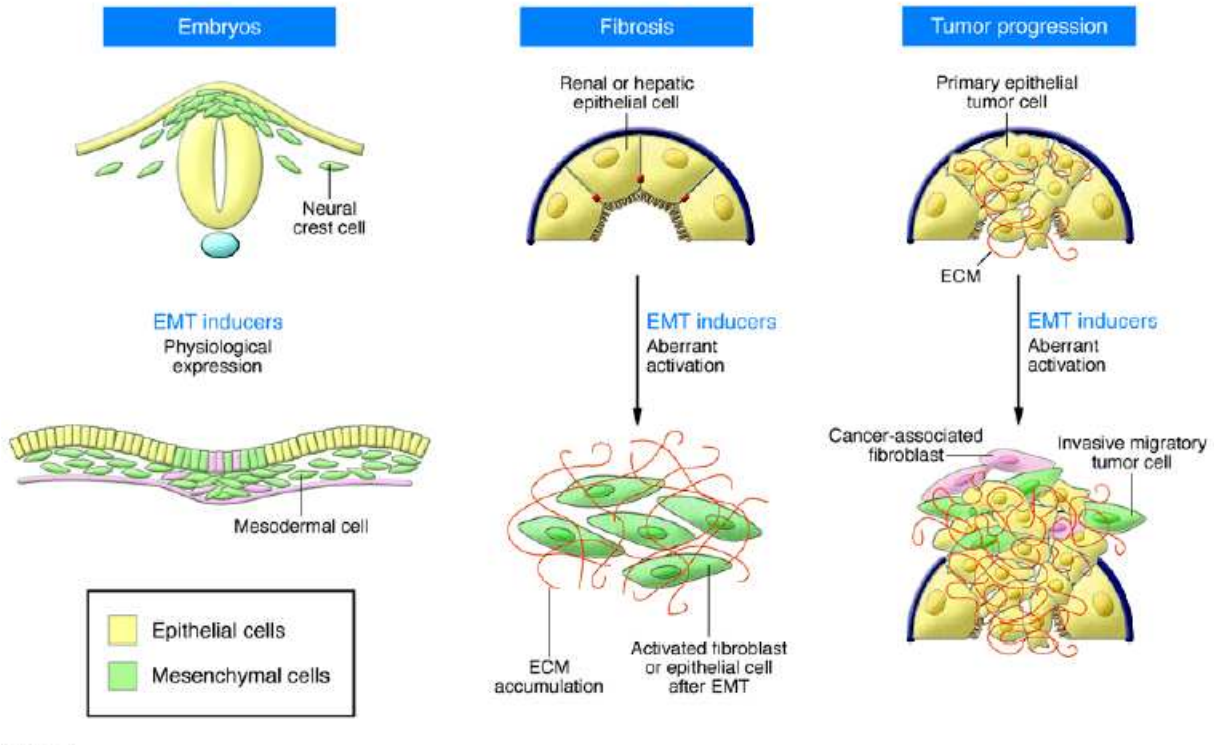


Figure 28 : Les trois types de TEM, d'après Acloque, 09

I. LES EVENEMENTS MORPHOLOGIQUES ET MOLECULAIRES DE LA TEM

La TEM est le processus par lequel les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques et acquièrent le phénotype des cellules mésenchymateuses. D'un point de vue cellulaire on peut distinguer plusieurs étapes (**Figure 29**) au sein de la TEM : **[56,57,59,64]**

1. perte de l'adhésion intercellulaire et de l'adhésion à la MEC (matrice extra-cellulaire)
2. perte de la polarité cellulaire et modification de la forme des cellules
3. acquisition de la motilité
4. effraction de la membrane basale
5. migration des cellules
6. protection des cellules contre l'apoptose dont l'anoikis

Ces étapes n'ont pas toutes lieu de manière chronologique car elles ne sont pas totalement indépendantes les unes des autres. Par exemple la perte de l'adhésion cellulaire et de la polarité sont deux phénomènes quasiment simultanés car les mécanismes moléculaires qui sont à leur origine sont intimement liés. Par ailleurs, pour survivre à toutes ces modifications, les cellules doivent être protégées face à l'apoptose et cette protection doit être maintenue tout du long de la TEM. **[56,64]**

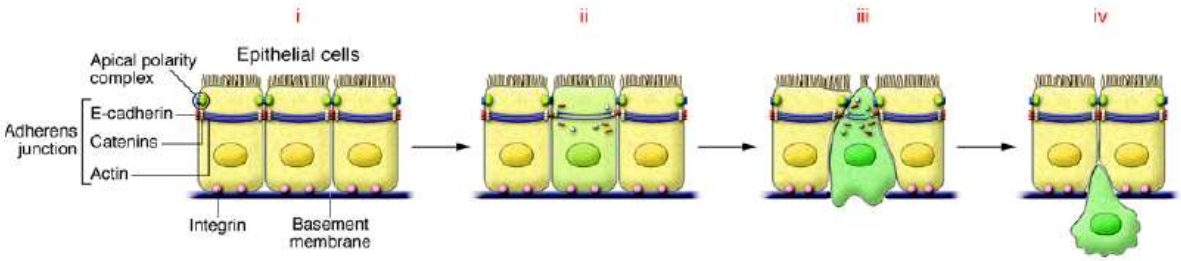


Figure 29 : Les aspects cellulaires de la TEM, d'après Acloque, 09

A l'échelle moléculaire, la TEM débute par la dissolution des jonctions serrées et des jonctions adhérentes qui entraîne à leur suite le désassemblage des autres jonctions cellulaires. **[56,64,65]** Dans le même temps les cellules perdent leur polarité. **[64]** Ces modifications sont principalement dues à la sous-expression voire à la perte de l'E-cadhérine, en effet les cellules

épithéliales subissant la TEM voient leurs protéines de surfaces remplacées par des protéines de surfaces spécifiques des cellules mésenchymateuses. Ainsi l'E-cadhérine est remplacée par la N-cadhérine et les intégrines qui permettaient la fixation des cellules à la MEC, en particulier à la membrane basale, sont remplacées par d'autres intégrines à faible pouvoir d'adhésion. Les éléments du cytosquelette sont réorganisés, les cytokératines sont remplacées par d'autres filaments intermédiaires tels que la vimentine et le cytosquelette périphérique d'actine est remplacé par des fibres de stress. **[56]** Toutes ces modifications sont à l'origine du changement de la forme des cellules, qui de cubiques deviennent fusiformes **[56]**, et de l'acquisition de la motilité car les cellules ainsi modifiées sont capables de déplacements par contractions de leur ceinture apicale d'actine-myosine et par internalisation de leur matériel apical. **[57,64]** Parallèlement les cellules ont acquis la capacité de synthèse de protéines dégradant la MEC comme les métalloprotéases. **[56,57,64]** Les cellules ainsi dépourvues de tout contact et ayant la capacité de se mouvoir peuvent alors migrer à travers et au-delà de la membrane basale. Cette migration se fait aux moyens des nouvelles protéines de surface et suivant des messagers qui guident cette migration. **[56,64]**

A. Place des cadhérines dans la TEM

Parmi tous les changements d'expression de gènes et de protéines qui ont lieu au cours de la TEM, l'altération de l'adhésion intercellulaire et de l'adhésion des cellules à la MEC semble jouer un rôle central dans la capacité de migration et d'invasion des cellules ainsi que dans la dissémination métastatique. **[57,66]** Ainsi la sous-expression de l'E-cadhérine est un des points clés de la TEM. En effet l'E-cadhérine joue un rôle fondamental dans l'homéostasie des épithéliums **[57,60,61,64]** et sa diminution est suffisante pour conduire à une diminution de l'expression des autres marqueurs épithéliaux, principalement des molécules intervenant dans les jonctions d'adhésion cellulaire : plakoglobine, desmogléines, desmoplakine, protéines ZO, occludine, claudines, caténines…, ou dans la polarité. **[60]** Ceci suffit à induire de nombreux changements dans la forme et le comportement des cellules, des changements qui sont étroitement associés à la TEM. **[57,64]** C'est pourquoi le gène de l'E-cadhérine peut être considéré comme un gène suppresseur de tumeur **[61]** puisque la perte de l'expression de l'E-cadhérine permet le maintien à long terme du phénotype mésenchymateux. **[64]**

Rôle des cadhérines dans la force des jonctions cellulaires

La force des jonctions d'adhésion cellulaire dépend des cadhérines de plusieurs manières.

-Le type de cadhérine

Les cadhérines de type I sont à l'origine d'une adhésion cellulaire forte et rapide par rapport aux cadhérines de type II qui sont à l'origine d'une adhésion instable rendant les migrations cellulaires possibles. **[67]**

-Le type de liaison des cadhérines

Classiquement les cadhérines forment des liaisons homophiliques calcium-dépendantes. Il en est ainsi au niveau des desmosomes de l'épiderme ce qui leur confère leur très importante force d'adhésion. Cependant lors de cicatrisation les cadhérines modifient leurs liaisons, ne faisant plus intervenir le calcium, ce qui rend les desmosomes moins adhérents. **[67]** Ceci pourrait avoir son importance dans la TEM oncologique car une telle modification des desmosomes pourraient être une étape précoce. **[67]**

-Les interactions de l'E-cadhérine

La force des jonctions adhérentes dépend de l'interaction de l'E-cadhérine avec le cytosquelette périphérique d'actine via les caténines. **[61,67]** Par ailleurs ces interactions sont à l'origine de l'activation de certains signaux intracellulaires pouvant provenir de la β-caténine ou des intégrines, ces signaux ayant, entre autre, un effet sur la stabilité des jonctions d'adhésion cellulaire et pouvant être ainsi mis en jeu dans la TEM. **[67]**

Place de la N-cadhérine dans la TEM

Au cours de la TEM on observe un changement d'expression des cadhérines, l'E-cadhérine disparaissant en faveur de la N-cadhérine. Toutefois l'implication de la N-cadhérine dans la TEM est encore peu connue (**Figure 30**). **[64]** La N-cadhérine a la capacité de conférer un phénotype mésenchymateux dominant aux cellules, même en présence d'E-cadhérine, et cette sur-expression de la N-cadhérine est corrélée, dans les cellules épithéliales, à une augmentation de la motilité cellulaire et à l'invasion et la progression tumorales. **[64]** Bien que l'E-cadhérine soit moins compliante et plus résistante aux stress mécaniques que la N-cadhérine, les différences fonctionnelles entre l'E-cadhérine et la N-cadhérine ne sont pas clairement comprises **[68]** d'autant plus que ces distinctions semblent être subtiles puisqu'il existe des cas où l'E-

cadhérine peut elle-même médier des migrations cellulaires et des cas où la N-cadhérine participe à la formation d'épithélium, [64] et l'E-cadhérine peut également favoriser la tumorigenèse quand elle est exprimée dans des cellules qui ne l'expriment pas en temps normal. [65]

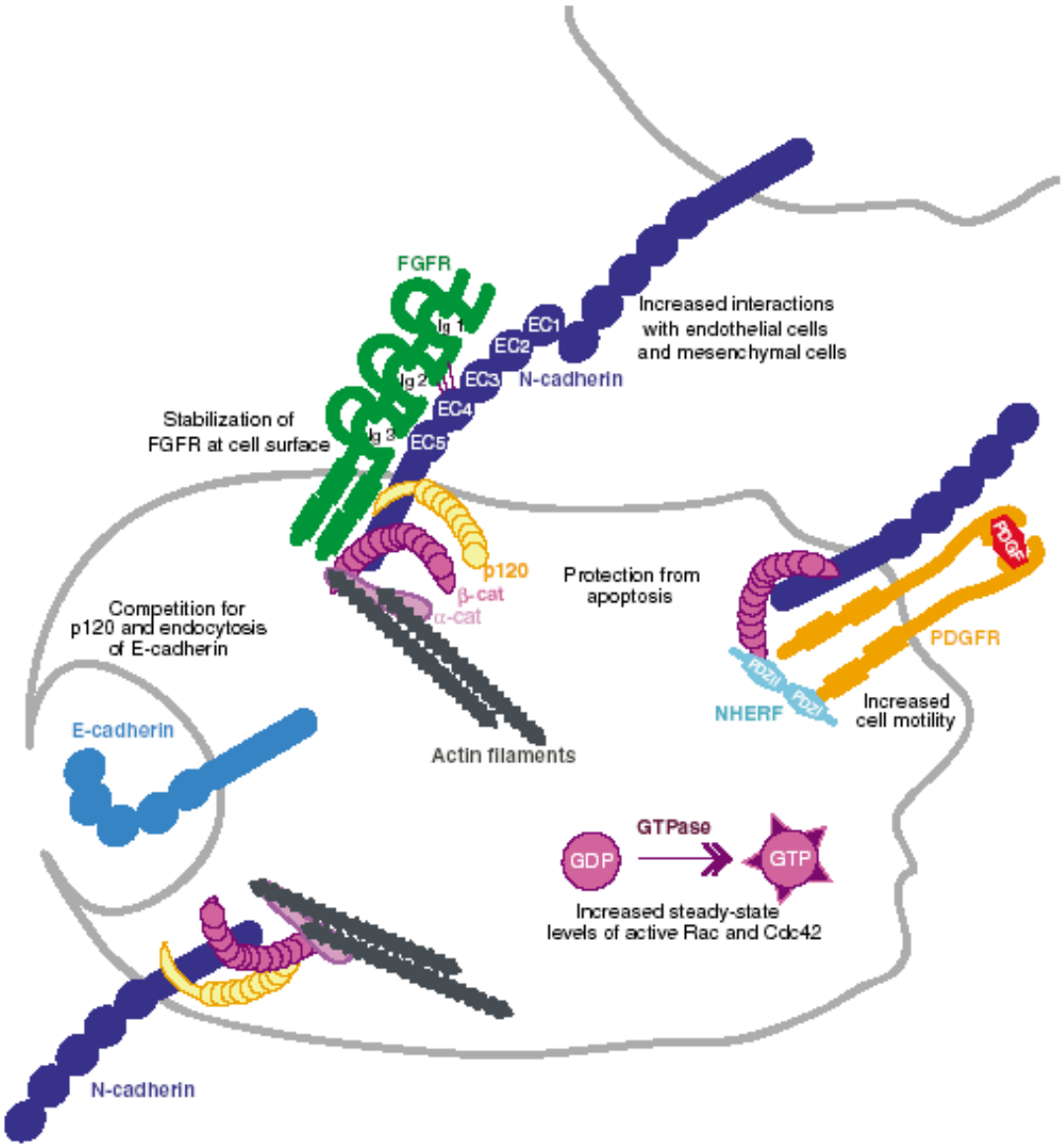


Figure 30 : Effet de l'expression de la N-cadhérine dans les cellules épithéliales d'après Wheelock, 07

Régulation locale de l'E-cadhérine

L'E-cadhérine est régulée localement au niveau des jonctions cellulaires par phosphorylation [64] suite à l'action de nombreuses kinases comme les RTK ou la Src. [66] L'action des tyrosine-

kinases a pour effet une augmentation du niveau de β-caténine cytoplasmique tout en promouvant l'endocytose de l'E-cadhérine. **[66]** Cependant la régulation par phosphorylation du complexe caténine-cadhérine est un processus complexe qui varie en fonction du contexte. [64]

B. Place des caténines dans la TEM

Le domaine cytoplasmique de l'E-cadhérine interagit avec de nombreuses protéines intracellulaires dont les caténines. Les caténines font le lien entre l'E-cadhérine et le cytosquelette d'actine contribuant ainsi à la dynamique d'adhésion et à la force mécanique des jonctions adhérentes. Elles sont aussi à l'origine de signaux d'adhésion naissant au niveau de ces jonctions. En effet les caténines interviennent dans la régulation locale de l'assemblage/désassemblage et de la stabilité des jonctions adhérentes. Par exemple la demie-vie de l'E-cadhérine est plus que doublée quand celle-ci est liée à la caténine p120. **[65]** Les caténines sont aussi responsables de l'activation de nombreux seconds messagers tels que la Src, les GTPases Rho et de nombreux régulateurs de polarité épithéliale. Depuis, beaucoup de ces protéines ont été impliquées directement dans la TEM et de nombreux processus post-transcriptionnels déstabilisant les jonctions adhérentes ont montré qu'ils agissent via les caténines. **[64]**

D'autre part la perte de l'adhésion homophilique de l'E-cadhérine est fréquemment associée à la libération dans le cytoplasme de β-caténine. La β-caténine peut également être transloquée de la membrane plasmique au cytoplasme où, suite à des signaux exogènes, elle est soit dégradée soit dirigée jusqu'au noyau **[67]** où elle peut alors servir dans la transduction nucléaire de diverses voies de régulation **[64]** car la β-caténine, en s'associant au facteur de transcription LEF-1/Tcf (voir plus loin), peut affecter la transcription de nombreux gènes intervenant dans des processus cellulaires variés, notamment la prolifération et la différenciation cellulaire, et peut ainsi induire la TEM. **[58,67]**

Ainsi la β-caténine contrôle l'activité de l'E-cadhérine à la fois au niveau des jonctions cellulaires et au niveau génomique. **[64]**

C. Place des intégrines dans la TEM

Pour se détacher et pouvoir migrer, les cellules épithéliales doivent modifier leurs interactions intercellulaires et leurs interactions avec la MEC, c'est pourquoi il est couramment admis que la forte adhésion des cellules épithéliales à la MEC doit être supprimée tout en conservant des interactions faibles et fugaces pour permettre la migration. Or il a été constaté que les intégrines épithéliales sont remplacées lors de TEM par d'autres intégrines ayant un pouvoir d'adhésion faible et transitoire, ce qui permet alors la migration cellulaire, servant à la fois de guide à cette migration. **[69]**

En plus de cela, lorsque les intégrines mettent en place des liaisons avec des molécules de la MEC , elles sont activées et induisent une cascade de messagers intracellulaires qui vont moduler la prolifération, la survie, la polarité, la motilité et la différenciation des cellules. **[66]** En raison du grand nombre d'intégrines et de leurs fonctions très variées, leurs implications dans la TEM et la progression tumorale restent encore très évasives.

Les modifications de l'adhésion cellulaire, de la polarité, de la viabilité, de la motilité, ainsi que de la dégradation de la MEC ayant lieu lors de la TEM font intervenir un très grand nombre de gènes. Par conséquent il est difficile d'imaginer que lors de TEM oncogénique tous ces changements soient dus à des mutations indépendantes. Mais de nombreux gènes et voies de signalisation ont montré leurs implications dans l'induction de la TEM, or ces processus semblent tous converger vers des facteurs de transcription qui répriment l'expression de l'ensemble des gènes à l'origine du phénotype épithélial dont le gène de l'E-cadhérine. **[64,70]**

II. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION CENTRAUX DE LA TEM

Le gène de l'E-cadhérine est sous le contrôle d'un promoteur proximal qui chez le chien contient deux E2-boxes (CACCTG) une boite CCAAT et une boite GC. [71,72, 3] Les E-boxes sont des sites de fixation pour de nombreux facteurs de transcription, lorsqu'un répresseur se lie à une de ces E-boxes leur action surpasse les effets des régulateurs positifs de la transcription de l'E-cadhérine. [58,64]

Lors de TEM les promoteurs de l'E-cadhérine sont réprimés par des facteurs de transcription spécifiques dont les principaux sont les Snail et Slug, Twist, Zeb 1 et Zeb 2, et E12/E47 [58,66,67]

A. Snail et Slug

Snail (=Snai1) et Slug (=Snai2) sont deux inducteurs majeurs de la TEM. Ils sont essentiels au bon développement embryonnaire, la déficience en Snail pouvant même être létale. Chacun est plus ou moins prédominant et peut induire une TEM complète en fonction du contexte. [67,70,72,73,74]

Snail et Slug sont des répresseurs de l'E-cadhérine. [57,60,67,75] Ils régulent la stabilité des jonctions adhérentes et des jonctions serrées, l'expression des protéines des jonctions communicantes, l'assemblage des desmosomes et l'expression de protéases. [75] L'expression de Snail conduit à la répression transcriptionnelle de nombreux autres gènes épithéliaux dont notamment celui de l'α-caténine, les occludines, les claudines et elle augmente l'expression de gènes mésenchymateux ce qui ensemble induit une TEM avec acquisition d'un comportement migratoire et invasif par les cellules. [60,76] Slug a les mêmes effets que Snail mais il agit sur des gènes différents, de ce point de vue il partage plus de similitude avec le facteur E12/E47 (voir plus loin) qu'avec Snail. [70]

Snail et Slug sont deux facteurs de transcription en doigt de zinc appartenant à la même famille [74] Ces protéines possèdent quatre motifs en doigt de Zinc à leur extrémité C-terminale et un domaine répresseur SNAG constitué des premiers acides aminés de leur extrémité N-terminale qui est un puissant motif de répression [60] qui reconnaît les E2-boxes. [61,64,72,73] Slug

présente une moins grande affinité que Snail pour ces E2-boxes et contrairement à celui-ci il se lie au promoteur sous forme multimérique. [72]

Snail est une protéine très instable, elle est rapidement phosphorylée par la *glycogen-synthase-kinase 3β* (GSK-3β) et ensuite dégradée. [66,77] Par conséquent l'inhibition de la GSK-3β permet une accumulation de Snail. [60] Toutefois de nombreuses protéines sont capables de stabiliser la protéine Snail et de même diverses protéines sont capables d'interagir avec le domaine SNAG, stabilisant ainsi Snail et renforçant son effet répresseur. [60,66,67,78] Ces co-répresseurs permettent également le recrutement d'autres co-répresseurs aboutissant à la formation de complexes de transcription (**Figure 31**) [60,77,79] qui directement ou indirectement par le biais de déacétylases des histones (HDAC1 et 2) modifient l'activité des histones H3 et H4. Ainsi Snail réprime l'expression de l'E-cadhérine en permettant un remodelage de la chromatine. [60,77]

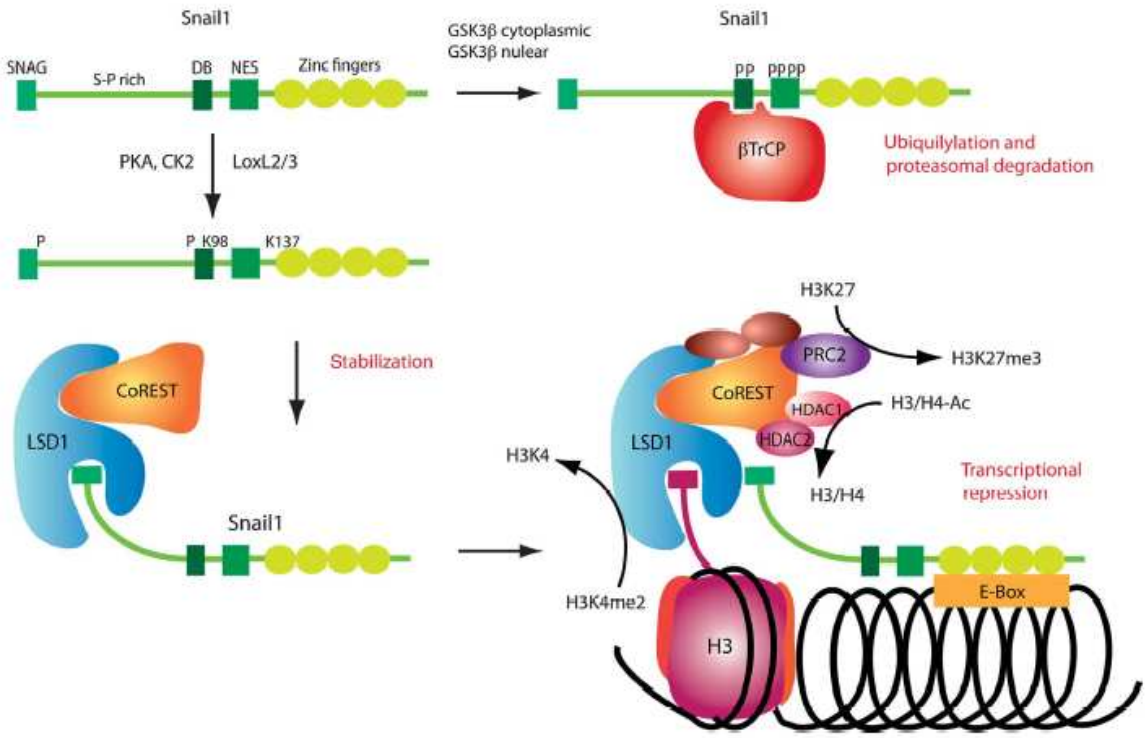


Figure 31 : Exemple d'un mécanisme de régulation mettant en jeu le facteur de transcription Snail d'après Christofori, 10

B. Twist

Twist est un facteur de transcription basique en hélice-boucle-hélice (bHLH) qui peut être impliqué dans la cascade de messagers et effecteurs à l'origine de l'induction de la TEM. **[61,64,80,81]** C'est lui-aussi un répresseur du gène de l'E-cadhérine et un activateur de l'expression de certains gènes mésenchymateux tels que le gène codant pour la N-cadhérine. **[64,65,80]** En plus de son effet inducteur de la TEM Twist agit aussi sur l'intravasation des cellules dans lesquelles il est exprimé, **[61,64,75,80]** en effet des études *in vitro* comme *in vivo* montrent que Twist augmente de façon spécifique l'intravasation de cellules sans avoir d'effet sur la survie et l'extravasation de celles-ci ou sur le taux de croissance des cellules tumorales. [61]. Twist est donc considéré comme un gène pro-métastase. **[61]**

Le facteur Twist agit sur les même E2-boxes que Snail et Slug. **[61,64]** A l'heure actuelle on ne connaît pas tous les mécanismes indirects d'action de Twist mais on pense que son action pourrait, en partie tout du moins, être relayée par Snail qui est un de ses gènes cibles et dont il maintient et prolonge l'expression chez la Drosophile. **[64,80,81]**

C. Zeb 1 et Zeb 2 (Zinc finger E-Box binding homeobox)

Zeb-1 (=δEF1) et Zeb-2 (=SIP1 pour *SMAD interacting protein 1*) sont des protéines à homéodomaine encadré par des motifs en doigts de zinc. Elles régulent négativement l'expression de l'E-cadhérine et de nombreuses autres molécules des jonctions cellulaires (caténines, claudine, plakophiline 2, ZO-3…) **[64,71,82]** en se fixant aux boites CACCT des différents promoteurs. **[73,82]** Ces protéines ont la particularité de maintenir le phénotype mésenchymateux induit par l'expression transitoire de Snail. **[74]** Par ailleurs l'activité de Zeb-2 est sous contrôle de Snail qui dirige son épissage. **[67]**

La convergence de nombreuses voies indutrices de la TEM sur Snail, Slug et Twist suggère qu'ils sont des points clés dans le réseau de messagers et effecteurs intervenant dans la réalisation de la TEM. Les protéines Zeb-1 et 2 sont également considérées comme des régulateurs majeurs de la TEM que ce soit dans l'embryogenèse ou la cancérogenèse. **[75]**

D. E12/E47

E12/E47 fait partie d'une famille de facteurs de transcription reconnaissant les gènes E2A qui codent tous des protéines bHLH. E12/E47 joue un rôle important dans la régulation de la croissance cellulaire et la différenciation en agissant comme partenaire de dimérisation pour des protéines bHLH spécifiques. Ainsi elle réduit l'expression de l'E-cadhérine et confère des propriétés invasives et migratoires aux cellules où elle est exprimée. C'est donc un médiateur important de la TEM. [64]

E. NFκB (Nuclear Factor-kappa B)

Le NFκB est une famille de 5 protéines impliquées dans la survie des cellules et la régulation de la réponse immunitaire.

Dans le cytoplasme le NFκB est présent sous forme d'homo ou hétérodimères qui se complexent avec l'IκB. La formation de ces complexes permet de garder le NFκB sous forme inactivée car sa liaison à l'IκB l'empêche d'entrer dans le noyau. En réponse à des cytokines et des facteurs de croissance l'IκB est phosphorylé ce qui le libère du NFκB qui peut alors entrer dans le noyau où il agit comme facteur de transcription, modifiant l'expression de gènes cibles dont Snail, Slug, Twist, et Zeb-2. [64,67,83] Le NFκB peut lui-même orchestrer sa libération de l'IκB et son activation en se liant au TGFβ-R ce qui a pour effet l'activation de l'IκB-kinase-2 (IKK-2) qui phosphoryle alors l'IκB. [84]

Ce facteur de transcription coopère avec d'autres voies d'induction de la TEM comme la voie des protéines Smad (voir plus loin le TGF) et la voie des MAPK. [84]

F. LEF-1/Tcf (Lymphoid enhancer factor/T cell factor)

LEF-1/Tcf est un facteur de transcription appartenant aux protéines du groupe hyper motile (HMG) qui peut s'apparier avec d'autres facteurs de transcription dont la β-caténine ou encore les protéines Smads (voir plus loin). La fixation de la β-caténine au LEF-1 déloge les autres co-répresseurs qui y sont déjà liés, altérant ainsi le programme transcriptionnel en place en faveur de la TEM. [64] Ce facteur de transcription intervient dans de nombreuses voies de signalisation

inductrices de la TEM, c'est un acteur principal du signal Wnt (voir plus loin) mais il intervient également lors de l'activation des *integrin-linked-kinases* (ILK) suite à l'action du TGFβ. [58]

III. LES VOIES D'INDUCTION DE LA TEM

De nombreux polypeptides sécrétés sont impliqués dans le processus de TEM et leurs voies de transduction intracellulaire forment un vaste réseau interconnecté (**Figure 32**). [66,84] Le TGFβ, le Wnt et des facteurs de croissance agissant via des récepteurs à activité tyrosine-kinase induisent la TEM en agissant de manière séquentielle. Tous ces facteurs orchestrent une régulation concertée d'un programme génétique élaboré et d'un réseau complexe de protéines nécessaires à l'établissement du phénotype cellulaire. [60,84] En plus de leur action sur les RTK les facteurs polypeptidiques peuvent faire intervenir des récepteurs couplés à des protéines G qui mobilisent alors une cascade de seconds messagers qui cible Snail et la régulation de l'expression de l'E-cadhérine au cours de la TEM. [80]

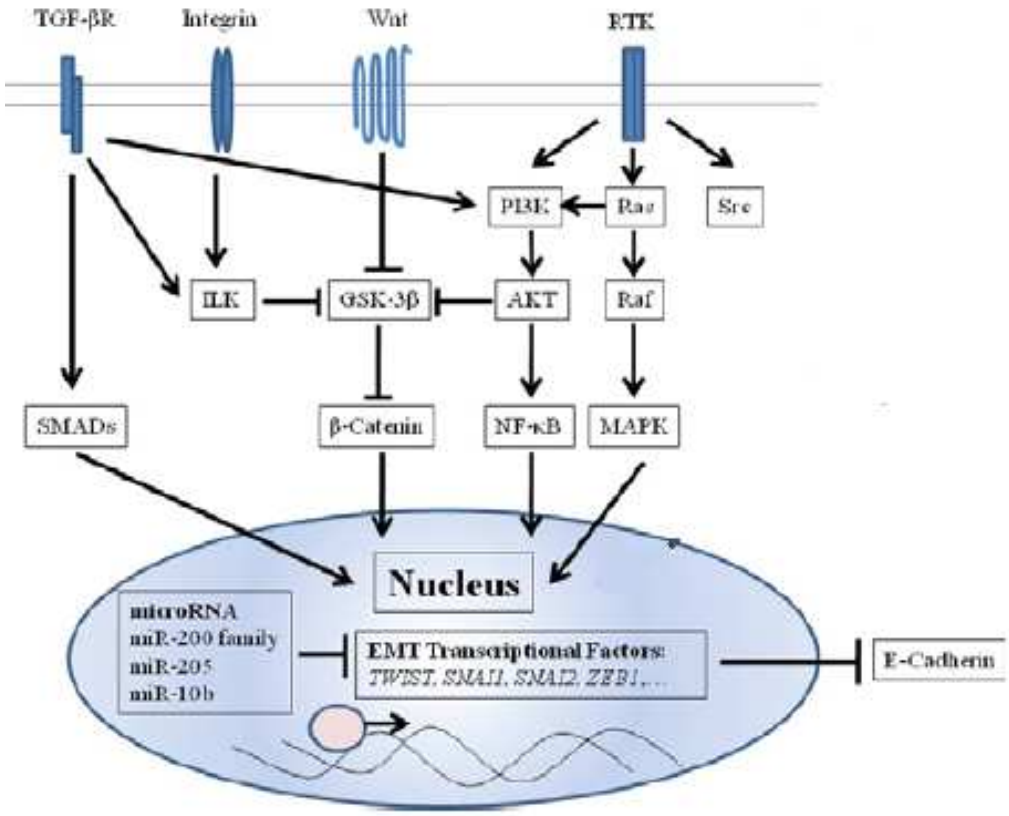


Figure 32 : Les voies d'induction de la TEM, d'après Iwatsuki

A. TGFβ

La voie du TGFβ est une des voies cellulaires inductrices de TEM des plus étudiées et des mieux connues à l'heure actuelle.

Les membres de la famille du TGFβ sont des cytokines ubiquistes qui se lient à des récepteurs transmembranaires à activité sérine/thréonine-kinase (TGFβ-R) présents à la surface de leurs cellules cibles. **[56,64,85,86]** Ils sont impliqués dans la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire, mais aussi dans la synthèse de la MEC et dans la migration cellulaire. **[64,86]** Il existe plusieurs isoformes du TGFβ et toutes ont été impliquées dans la TEM. Par exemple au cours du développement embryonnaire le TGFβ2 intervient dans la formation des valvules cardiaques **[56,84]** et le TGFβ3 est quant à lui mis en jeu dans la palatogenèse. **[56]**

Dualité d'action du signal TGFβ

Normalement, dans les tissus sains le TGFβ inhibe la croissance des cellules épithéliales. Toutefois, dans les néoplasmes il favorise la progression tumorale par sa capacité à induire la TEM. **[64,86]** Cependant ceci n'est pas tout à fait exact car le TGFβ présente une certaine dualité d'action. En effet lorsqu'il agit de manière précoce dans la cancérogenèse il inhibe la croissance tumorale par arrêt du cycle cellulaire et par apoptose des cellules anormales **[56,84]**, ralentissant ainsi la croissance des adénomes bénins **[84]** alors que dans les étapes tardives, c'est-à-dire dans les carcinomes agressifs, il favorise l'invasion tumorale et l'extension métastatique en partie par son effet inducteur de TEM. **[56,67,84]** Par ailleurs son expression est corrélée avec le caractère agressif des tumeurs du sein chez l'Homme. **[56,69]**

Le TGFβ agit aussi sur l'angiogenèse car il augmente l'expression de facteurs angiogéniques tels que le VEGF-A (*vascular endothelial growth factor*) et l'Angiopoiétine-1. Il intervient dans l'immunité car il réprime l'expression du CMHII (complexe majeur d'histocompatibilité) et il exergue les effets néfastes des cellules présentatrices d'antigènes. **[66]**

Mécanisme d'action du signal TGFβ

Le signal TGFβ est à l'origine d'une perte de la polarité apico-basale des cellules, il diminue l'adhésion cellulaire et il induit l'expression de protéines du cytosquelette spécifique des cellules mésenchymateuses telles que la vimentine ainsi que celle de protéases extracellulaires. [56,84]

La voie des Smad

Les protéines Smad sont un ensemble de 8 protéines dont on distingue trois groupes :

- les Smad régulées par les récepteurs : R-smad, qui comprend les Smad 1, 2, 3, 5 et 8.

- le médiateur commun : Co-Smad qui correspond à la protéine Smad 4.

- les Smad inhibitrices : I-Smad, Smad 6 et 7 agissant en compétition avec les R-Smad et en activant la dégradation des TGFβ-R. **[85,86,87]**

Le TGFβ agit par l'activité tyrosine-kinase de ses deux récepteurs. **[84]** Après fixation de son ligand le TGFβ-R II forme des hétérotétramères avec le TGFβ-RI qu'il transphosphoryle. Le TGFβ-R I phosphoryle alors à son tour les protéines cytoplasmiques Smad 2 et 3. Une fois ces deux protéines activées elles forment des complexes avec la protéine Smad 4 (**Figure 33**). Ces complexes se transloquent dans le noyau où ils se lient à la chromatine et régulent ainsi l'expression de gènes jouant un rôle sur des mécanismes cellulaires fondamentaux comme la prolifération, la différenciation, l'apoptose et par conséquent sur la TEM. **[84,85,86]** Le signal Smad est dépendant de son médiateur commun Smad 4 qui est indispensable au mécanisme transcriptionnel, permettant la répression de nombreux gènes. **[84,85]**

Les protéines Smad 2/3 et Smad 4 peuvent se complexer également avec le facteur LEF-1 tout aussi efficacement que la β-caténine, réprimant alors le gène de l'E-cadhérine et intervenant ainsi dans l'induction de la TEM. **[58,63,64]** En plus de leur action de concert, le complexe de protéine Smad 2/4 exerce un rétro-contrôle positif sur LEF-1, ce qui prolonge la répression de l'E-cadhérine. **[64]**

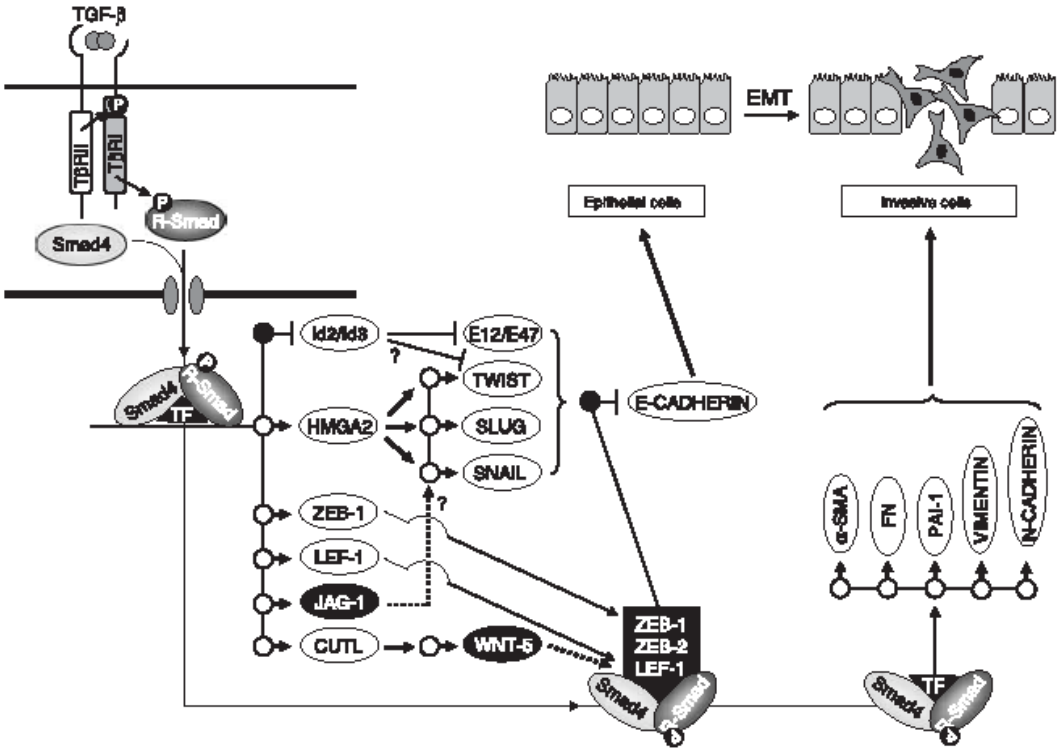


Figure 33 : La voie des Smad, d'après *Moustakas, 07*

Autres voies

Par ailleurs le TGFβ-R active d'autres cascades alternatives de seconds messagers (**Figure 34**) comme les MAPK, la PI3K, les petites GTPases Rho et des intégrines, ils ont des effets sur les signaux cytoplasmiques impliqués dans le contrôle de la motilité cellulaire et l'apoptose. **[63,84,88]** Par ailleurs les complexes de TGFβ-R sont recrutés au niveau des jonctions serrées par l'occludine où ils interagissent avec la protéine de polarité Par 6 ce qui aboutit à la dégradation de la petite GTPase Rho A. Il y a alors désassemblage des filaments d'actine et dissolution des jonctions serrées. **[88]**

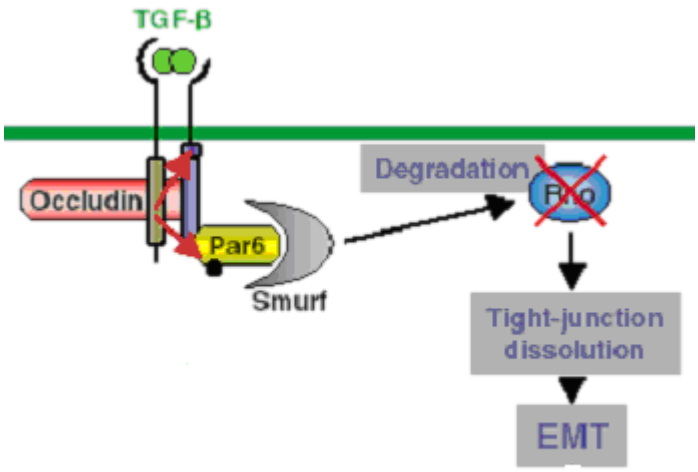


Figure 34 : Exemple de mécanisme non Smad dans la transduction du signal TGFβ, d'après Moustakas 05

Les cibles du signal TGFβ

Les autres voies inductrices de TEM

Le TGFβ interagit avec un grand nombre d'autres voies inductrices de TEM dont notamment les RTK et le signal Wnt mais le TGFβ coopère tout particulièrement avec l'oncogène Ras dans certaine situation. L'action séparée de la voie des Smad ou de la voie issue de Ras sont insuffisantes pour induire une TEM complète mais leur association le permet. [74] En général cet oncogène est à l'origine de l'activation des protéines MEK et Rac ou de Raf/MAPK, mais certains variants de Ras activent la PI3K. La mise en jeu de la PI3K joue surtout sur l'apotose alors que les autres voies ont principalement un effet sur la dissémination métastatique. [74] Le TGFβ en coopérant avec l'oncogène Ras diminue le niveau d'E-cadhérine dans les membranes plasmiques par endocytose. En effet le TGFβ induit l'expression de *l'adaptator protein disabled 2* (Dab2) qui participe à l'endocytose dépendante des clathrines et protège les cellules de l'apoptose tout en permettant la survenue de la TEM. Une fois endocytée l'E-cadhérine est alors dégradées par les enzymes lysosomiales. [84]

Ras et PI3K active probablement des tyrosine-kinases de la famille Src qui phosphorylent l'α et la β-caténine ce qui déstabilise l'E-cadhérine au sein des jonctions adhérentes. [84] La PI3K est un médiateur cellulaire des voies issues des RTK mais qui intervient dans de nombreuses autres voies de régulation, elle joue donc un rôle important dans la TEM et permet de faire le lien entre les différentes voies que ce soit celles provenant des facteurs de croissance, celles des récepteurs des intégrines ou des petites GTPases Rho. [84] La Src est un effecteur majeur de la TEM car

elle contrôle l'intégrité des jonctions adhérentes et donc également les autres structures d'adhésion intercellulaire. Cependant l'action isolée de la protéine Src est seulement capable d'induire des sarcomes et non pas des carcinomes. **[74]**

Sur les facteurs de transcription

Le signal TGFβ augmente l'expression de la plupart des gènes codant pour les facteurs de transcriptions majeurs de la TEM. **[67]** tout en diminuant l'expression de leurs inhibiteurs. **[64,84]** Par exemple le signal TGFβ induit l'expression du gène Snail par action de Smad3 et/ou par l'activation de la voie Erk/PI3K. **[84]** Les protéines Smad interagissent également avec les protéines Zeb-1 et Zeb-2 formant alors un complexe de répression sur l'E-box du gène de l'E-cadhérine mais également d'autres gènes cibles. **[71,82,84]** Le TGFβ peut également activer le facteurs de transcription LEF-1 directement au moyens des protéines Smad, ou indirectement par intervention du signal PDGF ou Wnt. **[84]**

En plus de l'effet direct du signal TGFβ sur ces facteurs de transcription il réprime des gènes Id par action du complexe de répression transcriptionelle Smad or les régulateurs transcriptionnels Id sont connus pour être des inhibiteurs de la différenciation et aussi de la TEM. La répression de l'expression des gènes Id par le TGFβ est nécessaire à la diminution de l'expression des gènes codant pour l'E-cadhérine et la protéine ZO-1 et ainsi à l'établissement de la TEM. Par exemple lorsque le gène Id-2 est réprimé sous l'action du TGFβ cela permet la liaison du facteur E12/E47 au promoteur de l'E-cadhérine. [84]

Sur les gènes à l'origine du phénotype mésenchymateux

Snail, Slug, Twist et E12/E47 répriment tous des gènes nécessaires au phénotype épithélial mais pour parler de TEM il faut aussi qu'il y ait apparition d'un phénotype mésenchymateux. Jusqu'à présent les gènes responsables du phénotype mésenchymateux ont été peu étudiés pour leurs implications dans la TEM. Toutefois on sait que la majeure partie des facteurs de transcriptions incriminés jusqu'à présent dans la TEM permet aussi l'expression de protéines mésenchymateuses. **[81]**

B. Wnt

Les Wnt sont une famille d'environ 20 glucoprotéines riches en cystéine. [58,64] Ce sont de puissants régulateurs de la prolifération et de la différenciation cellulaire très conservés au sein des différentes espèces. Elles contrôlent la spécificité, le maintien et l'activation des cellules souches de nombreux tissus jouant ainsi un rôle important dans l'organisation et le maintien des zones germinatives des différents tissus. [64,89] Ainsi on comprend que le signal Wnt soit impliqué dans la TEM et dans la progression tumorale en intervenant à la fois sur les cellules souches et la TEM. [56]

Le signal Wnt induit la TEM en agissant à la fois au niveau génomique et au niveau cellulaire [64], ces principaux effecteurs étant la β-caténine et son partenaire nucléaire LEF-1. [84] La β-caténine en position nucléaire régule divers gènes de facteurs de transcription intervenant dans TEM, contrôlant l'invasion cellulaire et l'inhibition de la croissance. [84] Normalement la β-caténine est soumise à un important turn-over en étant détruite par un complexe protéique comprenant, entre autre, l'axine, le suppresseur de tumeur APC et la GSK-3β (**Figure 35**). Quand une protéine Wnt se lie à son récepteur cela conduit à une série d'événements qui rompt le complexe de dégradation de la caténine β, principalement par exclusion de l'axine hors du complexe. Or l'axine est une molécule présente en faible quantité dans les cellules ainsi toute action sur elle est rapidement suivi d'un effet. [64,84,89] Ainsi le signal Wnt augmente le taux de β-caténine libre dans le cytoplasme et elle peut alors se lier à la LEF-1/Tcf.

Le turn-over de la β-caténine comme celui de l'E-cadhérine est fonction de la densité cellulaire : plus la densité est faible, plus la β-caténine est dirigée dans le noyau et plus elle réprime l'expression de l'E-cadhérine via son action sur le facteur Slug ce qui fonctionne comme une boucle de rétro-contrôle positif. Et inversement quand l'E-cadhérine est surexprimée la β-caténine est séquestrée par celle-ci au niveau de la membrane plasmique ce qui prévient alors son action en tant que répresseur transcriptionnel. [67] Par ailleurs la diminution de la β-caténine cytoplasmique active, amplifie et maintien le signal Wnt [64] et active la transcription de LEF-1/Tcf. [58] Ainsi la relation entre le pool d'E-cadhérine et de la β-caténine est primordiale pour l'induction de la TEM et surtout pour le maintien du phénotype mésenchymateux. [67]

Rappelons que ce signal agit en synergie avec le signal TGFβ par l'interaction des protéines Smad avec le complexe caténine β /LEF-1 qui amplifie leurs effets. [64]

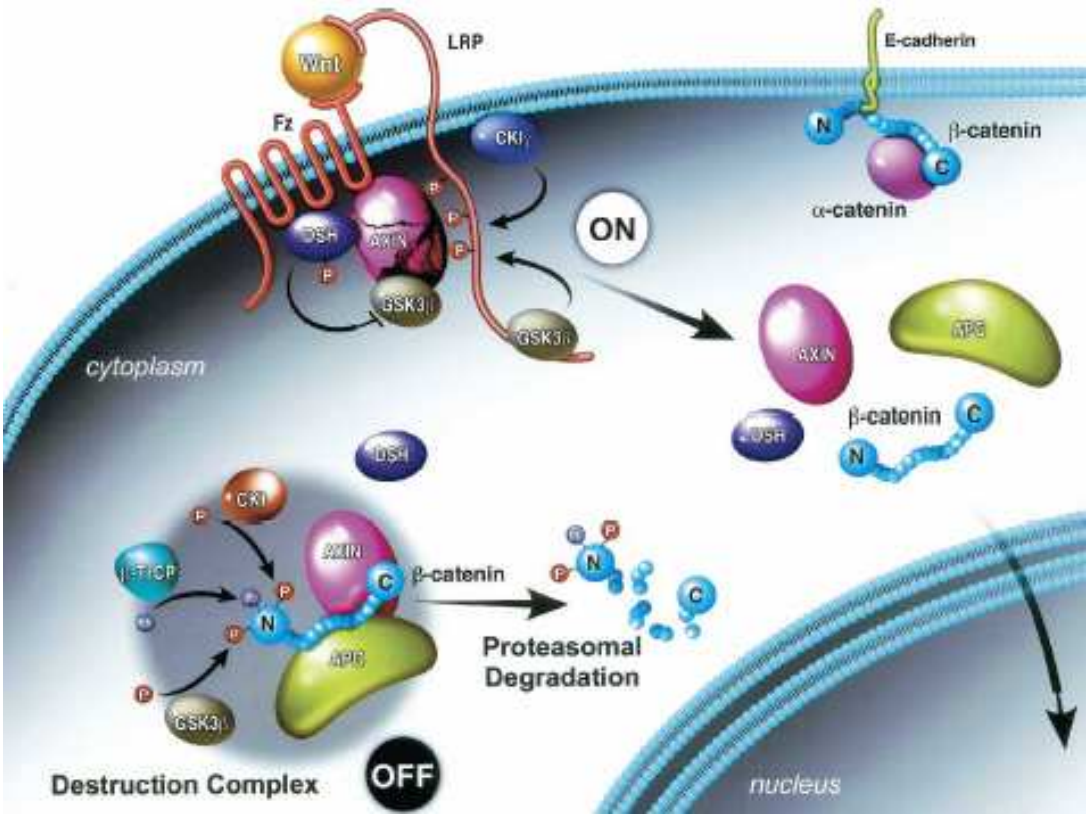


Figure 35 : Mécanisme de transduction du signal Wnt, d'après *Willert, 06*

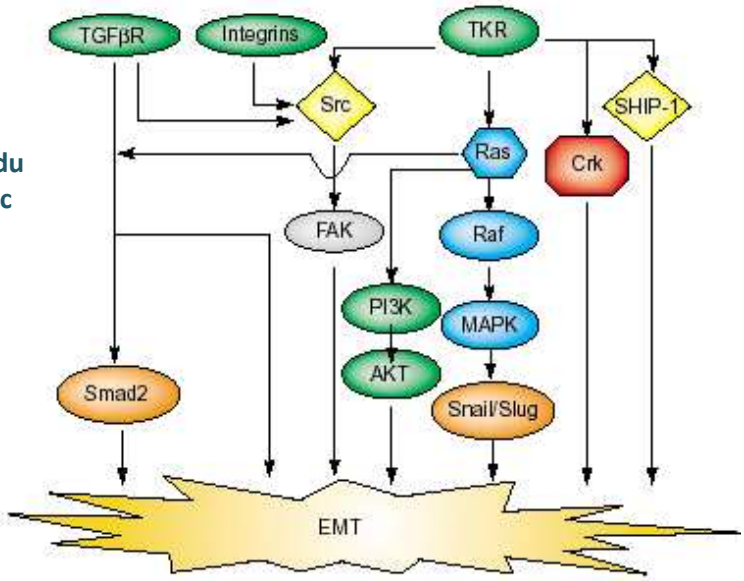
C. Les RTK

Les RTK sont nombreux et par conséquent ils sont impliqués dans des voies de régulations variées. D'après certaines études il semble que les signaux provenant des RTK ne seraient pas suffisants pour induire une TEM complète car leurs actions entraineraient une perte de la polarité et de l'adhésion cellulaire mais pas l'apparition d'un phénotype mésenchymateux. [84]

Quand un ligand se lie à son RTK cela induit la phosphorylation de résidus tyrosines de nombreuses protéines adaptatrices et régulatrices. Ainsi les RTK agissent via de nombreuses cascades de seconds messagers (**Figure 36**) dont deux sont particulièrement bien définies : la voie des MAPK et la voie PI3K-PDK1-Akt. La phosphorylation de la PI3K par les RTK l'active, la PI3K peut alors phosphoryler le phosphatidyl-inositol biphosphate (PIP2) en phosphatidyl-inositol triphosphate (PI3P) qui recrute la PDK1 et Akt au niveau de la membrane plasmique. Akt est alors phosphorylée par la PDK1 et d'autres molécules qui finissent de l'activer, or la

GSK-3β est un des principaux substrats de la protéine Akt qu'elle inhibe ce qui permet une stabilisation de Snail et de la β-caténine. [89]

Figure 36 : Mécanisme de transduction du signal issus des RTK et coopération avec les autres voies inductrices de TEM, d'après Thiery, 03



Le FGF-R

L'activation du FGF-R par le FGF a pour effet une surexpression de Snail. [56,84] Son mécanisme d'action repose sur la phosphorylation de la protéine p53 en réponse à l'activation de la voie des Erk/MAPK. La phosphorylation de la p53 lui permet d'interagir avec les protéines Smad ce qui a pour effet une augmentation de l'action du signal TGFβ. [84]

Le c-Met, récepteur du HGF

Le signal HGF est relayé par le récepteur à activité tyrosine-kinase c-Met. [84] En plus des deux voies de transduction classiques des RTK le c-Met phosphoryle de manière sélective les intégrines α6β4 des hémidesmosomes ce qui recrute des sites additionnels de fixation pour les autres molécules adaptatrices et messagers qui à leur tour pourront potentialiser l'invasion et la

dissémination métastasique induite par le HGF indépendamment de leur effet sur l'adhésion cellulaire. [66]

Les EGF-R

ErbB2 est un des EGF-R fréquemment surexprimé dans de nombreux types de cancer très variés. Comme les autres RTK son action est transmise principalement par la voie des Erk or la voie Erk5 augmente de façon spécifique l'activité du promoteur du gène Slug. [67] Il agit également sur la migration cellulaire via le messager Memo qui relait les signaux aux microtubules du cytosquelette. [66]

Les PDGF-R

L'isoforme PDGFA et les PDGF-R α et β sont surexprimés dans des cellules subissant la TEM, ils sont alors à l'origine d'une stimulation autocrine des cellules. Le PDGF-R phosphoryle directement l'ARN-hélicase p68 qui rompt alors le complexe cytoplasmique que forme la β-caténine avec l'axine et la GSK-3β. L'ARN-hélicase p68 et la β-caténine passe alors en position intranucléaire où la β-caténine agit classiquement en association avec LEF-1. [84]

D. Les petites GTPases Rho

Les petites GTPases Rho sont des enzymes ayant un effet sur les molécules d'adhésion cellulaire et le cytosquelette.

Des niveaux normaux en GTPase Rho A sont en faveur de la formation de complexe d'E-cadhérine/caténine et de leur connexion à l'actine. Cependant une forte expression de la petite GTPase Rho A peut contrôler la rupture des jonctions adhérentes dans des cellules épithéliales saines comme malignes. Or la GTPases Rho A peut être activée par le TGFβ1 et induire la TEM. Le mécanisme implique l'activation de ROCK (*Rho-associated kinase*) qui peuvent également être induites pour des niveaux normaux en GTPases Rho C. [74]

E. Les microARN

Ce sont de petits ARN non codant. Ils sont impliqués dans de nombreux processus du développement tel que la prolifération et la différenciation cellulaire. Ils ont également été mis en cause récemment dans les cancers et d'intrigantes relations ont étés faites entre ces microARN et des tumeurs de diverses origines.

5 membres de la famille des miR-200 sont réprimés au cours de la TEM induite par le TGFβ or il semble que leur rôle est normalement de diminuer l'expression des gènes codant pour les facteurs Zeb-1 et Zeb-2 et ainsi de maintenir le phénotype épithélial. miR-21 est quant à lui surexprimé dans des carcinomes humains et est même induit au cours de la TEM résultante de l'action du TGFβ dans certain modèle de fibrose rénale. Il semble avoir comme cible l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéase 3 (TIMP-3) augmentant ainsi la dégradation de la MEC. [67]

Les résultats des recherches menées jusqu'à présent sur ces microARN suggèrent que la surexpression ou la sous-expression respective d'un grand nombre de ces microARN pourraient être fondamentales pour la régulation des phénotypes cellulaires et donc pour la TEM et la progression tumorale. [67]

IV. LA TEM DANS LES CANCERS

Le changement le plus évident lors de l'évolution d'une tumeur épithéliale bénigne en une tumeur maligne avec formation éventuelle de métastases est la perte de différenciation des cellules néoplasiques qui acquièrent ainsi des capacités de migration et d'invasion. [61] Des recherches ont alors été menées afin de découvrir les mécanismes génétiques et moléculaires à l'origine de ces modifications. C'est ainsi que la TEM fut envisagée et impliquée dans la progression tumorale. [56,59,61,84] De nombreuses voies de régulation et de nombreux facteurs de transcription de la TEM ont montré leur intervention dans des cancers et la parallèle entre les TEM développementale et oncogénique est dorénavant bien établie. [56] En effet de nombreux gènes majeurs de la TEM ayant lieu lors du développement embryonnaire ont été incriminés dans la formation de certain cancer et inversement des gènes connus pour leur implication dans

l'oncogenèse ont montré depuis qu'ils agissent dans l'embryogenèse. [56,61] Les tumeurs peuvent être alors considérées comme des formes corrompues de la TEM développementale [61], les cellules cancéreuses réactivant des processus cellulaires préexistants, de façon inappropriée, sans ordre, et de manière incoordonnées chez des individus adultes. [56] Cependant la TEM oncologique diffère des autres types de TEM par la présence de marqueurs évocateurs de cellules souches. [62]

Dans le contexte des cancers d'origine épithéliales la TEM fournit un mécanisme plausible expliquant comment les cellules néoplasiques de la tumeur primitive envahissent le tissu local et notamment comment elles peuvent faire effraction à travers la membrane basale puis entrer dans des vaisseaux sanguins ou lymphatiques jusqu'à former des métastases (**Figure 37**). [56]

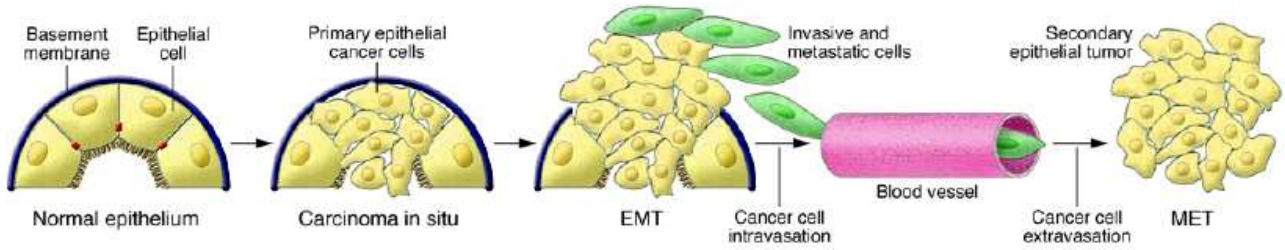


Figure 37 : Contribution de la TEM dans les cancers, d'après Kalluri et al

Cependant l'intervention de la TEM dans la progression des cancers d'origine épithéliale a été hautement débattue car dans de nombreux cancers la TEM n'est pas complètement observée. Généralement la perte en marqueurs épithéliaux et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux ne sont pas complètes. D'ailleurs certains marqueurs épithéliaux comme les cytokératines sont utilisés en routines pour aider à caractériser ces tumeurs. [66] Ceci s'explique par le fait que la TEM soit un processus difficile à observer et à prévoir dans la carcinogenèse car la TEM est un mécanisme fugace qui affecte seulement une fraction de la population de cellules tumorales à un moment donné. [56,61,63] En effet la TEM oncogénique a lieu dans un contexte anormal formé de l'association de changements génétiques imprévisibles au sein des cellules tumorales et d'un milieu local inadapté. D'ailleurs la TEM est bien souvent observée en des sites particulier des tumeurs [74] comme à la périphérie des tumeurs, sur le front d'invasion [64] là où l'exposition aux cytokines et au milieu extracellulaire qui sont en mesure de promouvoir la TEM est la plus

importante [60] et où les cellules sont les plus susceptibles de poursuivre les étapes menant à l'invasion métastatique. [63]

De manière générale l'observation de la TEM au sein de tumeur est corrélée à un mauvais pronostic et à l'agressivité des tumeurs. L'expression de l'E-cadhérine est souvent diminuée dans les tumeurs *in situ* [65] et elle est corrélée au grade et au stade des tumeurs épithéliales. [61] Ainsi la perte en E-cadhérine semble contribuer à la transition des adénomes en carcinomes et le gène codant pour l'E-cadhérine peut être considéré comme un gène suppresseur de tumeurs d'origine épithéliale. [61] En ce qui concerne la N-cadhérine, lorsqu'elle est exprimée dans des cellules épithéliales elle promeut l'évolution tumorale. On pense aussi que la N-cadhérine pourrait faciliter la formation de métastase en permettant l'intravasation en interagissant avec les N-cadhérines présentent dans les membranes des cellules endothéliales. [65] L'expression des facteurs de transcription tels que Snail, Slug et Twist, est corrélée à des formes agressives de cancers. [75] Snail apparaît comme un marqueur précoce du phénotype mésenchymateux et se comporte comme un facteur pronostic. [67] Par ailleurs des mutations des gènes de l'E-cadhérines, de Snail et de Zeb-2 sont connues pour être à l'origine du développement de carcinomes chez l'homme. [73,74,76] De même tout défaut dans l'expression ou la fonctionnalité de LEF-1/Tcf peut conduire au développement de cancers. [64]

Snail favorise la progression tumorale tout en atténuant la prolifération [61] et cette atténuation de la prolifération cellulaire semble être une caractéristique associée à la TEM. Cela se comprend puisque de nombreuses voies inductrices de TEM convergent vers les facteurs de transcription Snail et Zeb-2 qui répriment l'expression de la cycline D [67] bloquant le cycle cellulaire en phase G1/S. [85] On pense que l'arrêt des divisions cellulaires seraient nécessaires aux réarrangements du cytosquelette ayant lieu lors de la TEM. [57]

Les cytokines et facteurs de croissance à l'origine de l'activation des différentes voies d'induction de la TEM sont sécrétés soit par les cellules néoplasiques elles-mêmes, agissant de manière autocrine, ou par le stroma, agissant de manière paracrine. [66]

Le TGFβ est souvent mal exprimé dans des modèles murins de carcinogenèse conduisant au développement accéléré d'un carcinome à cellules fusiformes. [84] La sécrétion importante de TGFβ observée dans des carcinomes épidermoïdes cutanés humains laisse penser qu'un scénario similaire puisse avoir lieu *in vivo* chez l'homme. [84] D'ailleurs les inhibiteurs du TGFβ ont montré qu'ils pouvaient prévenir l'invasion des carcinomes et la formation de métastases. [84]

Les RTK tels que Erb2, l'IGF-1R et le c-Met, sont fréquemment surexprimés dans de nombreux types de cancers très variés. **[66]** L'IGF-1R, par exemple, agit sur la croissance cellulaire et la survie des cellules. Il favorise l'invasion tumorale et la formation de métastases dans des modèles murins transgéniques. **[66]** Il semble être une excellente cible multifonctionnelle pour le développement de nouvelles thérapeutiques anticancéreuses puisqu'il a été prouvé que les inhibiteurs de l'IGF-1R préviennent la croissance tumorale en bloquant la prolifération et induisant l'apoptose sur modèle cellulaire et sur modèle animaux. **[66]**

ETUDE EXPERIMENTALE

INTRODUCTION

L'implication de la transition épithélio-mésenchymateuse dans la cancérogenèse des tumeurs d'origine épithéliale est fortement étudiée depuis les vingt dernières années. De nombreuses recherches ont été faites tout d'abord *in vitro* sur cultures cellulaires puis *in vivo* sur modèles animaux et *in situ* au sein même de tumeurs humaines. Ces études ont permis une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans les étapes tardives de la progression tumorale et elles débouchent aujourd'hui sur le développement de nouvelles drogues anti-cancéreuses, tout particulièrement prometteuses pour la chimiothérapie des carcinomes. Ces nouvelles molécules développées chez l'homme sont en passe d'être utilisées chez les carnivores domestiques. Toutefois peu de recherches préalables montrant l'implication de la TEM dans les carcinomes des carnivores domestiques ont été réalisées.

La peau et le tissu sous-cutané sont le siège des tumeurs primitives les plus couramment rencontrées chez les carnivores domestiques et le carcinome épidermoïde représente la tumeur cutanée d'origine épithéliale la plus fréquente. Nous avons alors décidé de choisir ces tumeurs comme matériel d'étude, en nous restreignant au cas des carcinomes épidermoïdes digités, plus agressifs, pour étudier l'implication de la TEM au sein des carcinomes des carnivores domestiques.

Étant la première fois qu'une telle recherche est menée par le Laboratoire d'anatomie pathologique et d'histologie de VetAgro Sup, l'objectif de cette étude préliminaire est en fait triple :

- **le recueil des échantillons tumoraux et des données épidémiologiques nécessaires à notre étude et pouvant également servir à des études ultérieures,**
- **l'analyse histologique des échantillons tumoraux à notre disposition,**
- **l'étude préliminaire sur la possible mise en jeu de la TEM au sein de ces tumeurs au moyen de l'analyse de trois marqueurs immunohistochimiques : les cytokératines, l'E-cadhérine et la vimentine.**

Par ailleurs nous avons saisi l'occasion pour réaliser une analyse statistique afin de voir si certaines tendances transparaissaient dans nos résultats histologiques et immunohistochimiques.

I. MATERIELS ET METHODES

A. Matériel tumoral

L'étude a été réalisée à partir des cas de carcinomes épidermoïdes digités canins ayant fait l'objet d'un diagnostic histologique auprès du Laboratoire d'anatomie pathologique et d'histologie de VetAgro Sup entre le 1er janvier 2000 et le 30 juin 2010 ou auprès du Laboratoire IDEXX Alfort entre le 1er janvier 2009 et le 30 juin 2010, l'accès à des cas plus anciens nous étant impossible en raison de l'absence d'archivage informatique avant 2009.

Les archives du Laboratoire d'anatomie pathologique et d'histologie de VetAgro Sup comptent 27 prélèvements correspondant à 24 chiens pour lesquels un diagnostic de carcinome épidermoïde digité a été établi au cours de la période précédemment citée. Le Laboratoire IDEXX Alfort a mis à notre disposition les 90 cas de carcinome épidermoïde digité canin diagnostiqués en 2009 et les 52 cas diagnostiqués entre le 1er janvier et le 30 juin 2010.

Ces différents prélèvements ont été fixés au formol mais le temps de fixation n'est pas connu. Un certain nombre de ces prélèvements contiennent du tissu osseux et des griffes, une étape de décalcification a alors été nécessaire mais là aussi la technique de décalcification (agent de décalcification, durée) n'est pas connue. Ces prélèvements ont ensuite été inclus en blocs de paraffine.

B. Recueil des cas

Les données nécessaires à la réalisation de cette étude rétrospective ont été obtenues au moyen de la feuille d'accompagnement des demandes d'analyses et d'un questionnaire envoyé à chaque vétérinaire ayant fait initialement la demande d'analyse histologique. Ce questionnaire concerne l'identification précise de l'animal atteint du carcinome épidermoïde digité (race, robe, âge,

sexe…), les caractéristiques de la tumeur (aspect macroscopique, localisation), les données cliniques (bilan d'extension locale et à distance, examens complémentaires), le traitement mis en place et le devenir de l'animal après traitement (atteinte digitée multiple, récidive, extension métastatique, date et cause précise de la mort si celle-ci est survenue au cours de la période de suivi). Un modèle type de ce questionnaire est présenté en **Annexe 1.**

Pour les cas provenant du Centre Hospitalier d'Enseignement Vétérinaire des Animaux de Compagnie de VetAgro Sup (CHEVAC) nous avons rempli nous-mêmes le questionnaire grâce aux données disponibles dans les dossiers cliniques des animaux concernés et les propriétaires ont été contactés lorsque certains renseignements étaient manquants, notamment pour les questions relatives au devenir de l'animal.

Nous avons ainsi recueilli les données épidémio-cliniques complètes de 14 chiens issus des archives du Laboratoire d'anatomie pathologique et d'histologie de VetAgro Sup et de 49 chiens issus des archives mises à notre disposition par le Laboratoire IDEXX Alfort.

C. Analyse épidémiologique

Cette partie de l'étude repose sur l'ensemble des données récoltées pour les 166 chiens qui ont fait l'objet d'un diagnostic histologique de carcinome épidermoïde digité par les deux laboratoires ayant collaborés à cette étude.

Nous avons considéré les critères épidémiologiques suivant :

- **Sexe**
- **Age**
- **Race**
- **Robe**
- **Poids**
- **Localisation**
- **Aspect clinique**

Tous les paramètres n'étaient pas toujours renseignés ainsi le nombre de cas analysés varie pour chaque facteur épidémiologique étudié.

Nous nous sommes également intéressés au **comportement biologique et à l'évolution** de ces tumeurs (atteinte multicentrique, récidive, métastases, taux et durée de survie). Une période de suivi étant nécessaire à cette partie de l'analyse épidémiologique, les cas pris en compte sont les 49 chiens retenus dans l'étude histologique détaillée ci-après.

D. Analyse histologique

Matériel

Nous avons concentré nos analyses sur les cas pour lesquels nous disposions d'un suivi grâce à la fiche de renseignement, c'est-à-dire sur 14 cas issus du Laboratoire d'anatomie pathologique et d'histologie de VetAgro Sup et 49 cas provenant du Laboratoire IDEXX Alfort.

Critères d'inclusion :

- les cas en apparente rémission ayant fait l'objet d'un suivi de plus de 6 mois.
- tous les cas de non rémission quelque soit la durée de suivi (suivi inférieur à 6 mois possible)

Critère d'exclusion :

- les cas ayant fait l'objet d'un traitement autre que l'amputation.

D'après les données compilées dans cette étude, tous les chiens ont été traités de façon similaire, à l'exception d'un chien pour qui une radiothérapie adjuvante fut réalisée. Ce chien a alors été exclu de cette partie de l'étude.

Ainsi 49 chiens furent inclus dans l'analyse histologique.

Méthode

Réalisation des colorations histologiques

Les blocs de paraffine contenant les échantillons tumoraux des 49 chiens de cette analyse ont été fondus et les prélèvements ont été de nouveau inclus en bloc de paraffine afin d'en faciliter la coupe. Des coupes sériées de 4 µm d'épaisseur ont été réalisées au microtome pour chacun des blocs. Pour chaque bloc, 5 coupes adjacentes ont été montées sur lame et à chaque fois une de ces lames a été colorée à l'hémalun-éosine, coloration histologique de routine, les autres lames servant à l'analyse immunohistochimique. Le protocole de coloration à l'hémalun-éosine est indiqué en **Annexe 2.**

Analyse histologique

L'analyse histologique a consisté en :

- la **confirmation de la présence de carcinome épidermoïde**, vérification de la quantité et de qualité suffisante du matériel tumoral pour la bonne réalisation de l'étude,
- **l'identification des degrés de différenciation** des carcinomes épidermoïdes. Pour ce faire les zones peu, modérément et bien différenciées ont été repérées et le pourcentage que représente chacun de ces trois degrés de différenciation au sein de l'ensemble du tissu tumoral a été estimé,
- la recherche d'**emboles**,
- l'évaluation de **l'index mitotique**, réalisée pour chaque degré de différenciation présent sur les lames étudiées. Il a été évalué en considérant le nombre moyen de mitoses observées au fort grossissement (x400) au sein de dix champs choisis au hasard,
- la **mise en relation du degré de différenciation moyen par cas avec le devenir des animaux** (rémission, atteinte multicentrique, récidive, embole/métastase).

E. Analyse immunohistochimique

Matériel

L'analyse immunohistochimique s'est basée sur les 49 cas inclus dans l'analyse histologique exceptés 5 cas qui furent sortis de l'analyse immunohistochimique en raison de l'absence de tumeur sur les lames. Les cas pour lesquels la présence d'emboles fut révélée par l'analyse histologique ont été retenus et considérés de façon équivalente aux cas ayant développé des métastases au cours du suivi.

Méthode

Réalisation des marquages immunohistochimiques

L'analyse immunohistochimique a été réalisée sur des sections issues de coupes sériées adjacentes de celles qui ont été utilisées pour l'examen histologique. Elle a concerné la détection immunohistochimique des cytokératines avec l'anticorps AE1/AE3, de l'E-cadhérine et de la vimentine. Contrairement aux cytokératines et à la vimentine, l'E-cadhérine n'avait encore jamais été utilisée comme marqueur immunohistochimique par le Laboratoire d'anatomie pathologique et d'histologie de VetAgro Sup. Des essais méthodologiques préliminaires ont alors été nécessaires afin de mettre au point un protocole de préparation des lames adapté. Les protocoles des techniques immunohistochimiques utilisés sont indiqués en **Annexe 3.**

La 5ème lame issue des coupes sériées adjacentes a subi les mêmes étapes permettant la réalisation des marquages immunohistochimiques des cytokératines et de la vimentine sauf que l'anticorps primaire a été remplacé par du PBS ; ces lames ont alors servi de témoin négatif pour la lecture des différents marquages immunohistochimiques.

Les témoins positifs de la sensibilité et de la spécificité des anticorps utilisés sont internes aux lames immunomarquées. Sur chacune des lames ainsi préparées des zones saines d'épiderme et de derme étaient présentes. Les cytokératines et l'E-cadhérine sont censées colorer uniquement les cellules épithéliales, représentées sur les lames analysées par les kératinocytes ; la vimentine est exprimée par toutes les cellules mésenchymateuses, dont le derme est riche, mais elle est négative au niveau des cellules épithéliales, notamment celles de l'épiderme.

Analyses immunohistochimiques

Pour chacun des marqueurs immunohistochimiques l'analyse a été réalisée par un examen direct des lames au microscope optique. La lecture des lames a été réalisée en double aveugle par deux lecteurs différents.

Pour les trois marqueurs, l'évaluation des immunomarquages a consisté en :

- **une estimation semi-quantitative du nombre de cellules marquées positivement.** Pour les cytokératines les résultats de l'évaluation ont été transcrits sous la forme de trois catégories (notées de + à +++). Pour l'E-cadhérine et la vimentine les résultats de l'évaluation ont directement été transcrits sous la forme de pourcentage,

- une évaluation de **l'intensité du marquage** (faible, modérée, forte),

- la recherche de toutes **anomalies de répartition** (localisation intra/extracytoplasmique, hétérogénéité du marquage),

- la **mise en relation de l'immunoréactivité moyenne par cas avec le devenir des animaux** (rémission, atteinte multicentrique, récidive, embole/métastase).

Ces évaluations ont été faites pour chacun des degrés de différenciation présents sur les lames étudiées par les deux lecteurs, puis rendues sous la forme de pourcentage par lame. Pour un certain nombre de cas le matériel tumoral à notre disposition se composait de plusieurs blocs, ainsi nous avons étudié plusieurs coupes pour une même tumeur. La valeur obtenue pour chaque cas est donc le fruit de diverses moyennes.

F. Analyses statistiques

Les différents tests et analyses statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel R, version 1.8.0, copyright 2003, The R development Core Team, The Free Software Foundation, Inc., 59 Temple Place - Suite 330, Boston, MA 02111-1307, USA.

Les résultats des comptages sont exprimés sous la forme : moyenne ± écart type. Pour les analyses une valeur de $p<0,05$ a été considérée comme significative.

Pour toutes les analyses des tests de Shapiro-Wilk ont été réalisés sur chacun des groupes considérés pour vérifier la normalité des distributions. Lorsque c'était le cas un test de Fisher a été effectué, montrant à chaque fois une absence de différence significative ce qui nous a permis d'utiliser le test de Student pour réaliser nos analyses. Lorsque les distributions n'étaient pas normales les analyses ont alors été faites au moyen du test non paramétrique de Mann-Whitney-Wilcoxon.

II. RESULTATS

A. Analyse épidémiologique

Cette analyse concerne les 166 chiens qui ont fait l'objet d'un diagnostic histologique de carcinome épidermoïde digité par les deux laboratoires ayant collaboré à cette étude. Les données proviennent principalement des feuilles d'accompagnement des demandes d'analyses, complétées par les données fournies par le questionnaire pour les 66 cas où celui-ci fut renseigné.

Répartition selon le sexe

Le sexe des chiens atteints est connu pour 164 d'entre eux**. 88 sont de sexe masculin, soit 53,66%, et 76, soit 46,34%, sont des femelles.**

La répartition complète par sexe au moment du diagnostic est représentée dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Répartition selon le sexe

	Total	Stérilisé	Non stérilisé	Non renseigné
Femelle	76 (46,34%)	35	14	27
Mâle	88 (53,66%)	11	21	56

Répartition selon l'âge

L'âge de survenue du carcinome épidermoïde digité est connu pour 142 chiens. L'âge moyen de survenue présenté par la population considérée est de **10,13 ans, avec un écart-type de 2,30 ans**. Le plus jeune animal atteint était âgé de 4 ans au moment du diagnostic et le plus âgé avait 16 ans.

Si l'on considère l'âge de survenue en fonction du sexe, celui-ci ne présente pas de différence : l'âge moyen de survenue étant de 9,93 ans ± 2,10 pour les mâles et de 10,13 ans ± 2,41 pour les femelles.

La répartition complète par âge au moment du diagnostic est représentée dans la **Figure 38**.

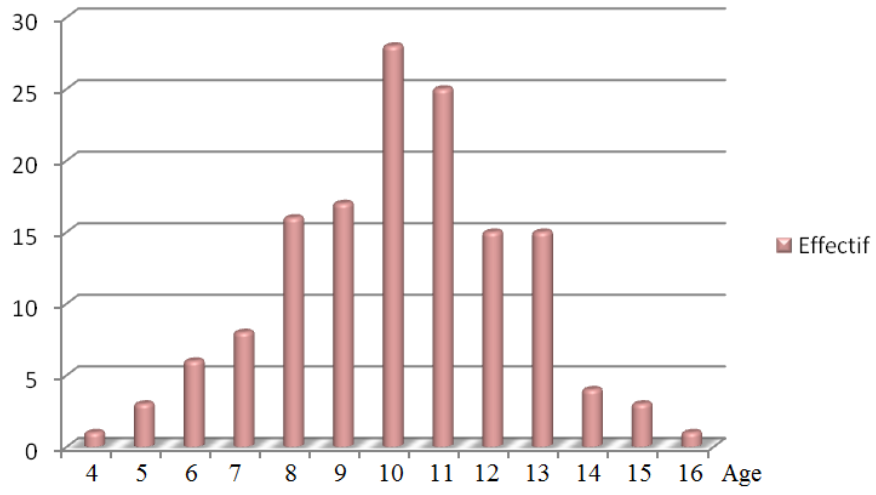


Figure 38 : Répartition selon l'âge

Répartition selon la race

Parmi les 163 chiens pour lesquels la race est connue, 147 sont des chiens de race pure. Au total 28 races sont représentées.

Les races canines les plus représentées sont :

- **Rottweiler** (n=30 chiens, 18,4% des cas)
- **Schnauzer moyen** (n=21, 12,9%)
- **Beauceron** (n=20, 12,3%)
- **Briard** (n=12, 7,4%)
- **Caniche** (n=9, 5,5%)
- **Labrador** (n=9, 5,5%)
- **Schnauzer géant** (n=7, 4,3%)

La répartition complète par race des chiens de cette étude est présentée dans le **Tableau 7** ; les résultats qui y sont présentés laissent apparaître une prédominance des femelles parmi les Rottweilers atteints.

Tableau 7 : Répartition selon la race
(NR = non renseigné)

Race	Effectif	Pourcentage (%)	Mâle	Femelle	Age moyen
Rottweiler	30	18,4	9	21	9,38
Schnauzer moyen	21	12,9	11	10	9,65
Beauceron	20	12,3	10	9	10,47
Briard	12	7,4	8	5	9,09
Caniche	9	5,5	6	2	12,29
Labrador	9	5,5	4	4	10
Schnauzer géant	7	4,3,	5	2	10,14
Teckel	4	2,5	3	1	10,67
Airedale terrier	3	1,8	3	-	11,5
Berger allemand	3	1,8	2	1	10
Leonberg	3	1,8	2	1	7,33
Scottish terrier	3	1,8	3	-	12,5
Setter anglais	3	1,8	3	-	10
Berger picard	2	1,2	2	-	11
Bichon frisé	2	1,2	1	1	13
Cocker spaniel	2	1,2	2	-	8,5
Golden retriever	2	1,2	1	1	11,5
Terre neuve	2	1,2	1	1	11.5
Am. Staff. Terrier	1	0,6	-	1	10
Bouvier bernois	1	0,6	-	1	12
Cocker américain	1	0,6	1	-	11
Drahthaar	1	0,6	-	1	7
Epagneul breton	1	0,6	1	-	7
Fox terrier	1	0,6	-	1	NR
Lévrier afghan	1	0,6	1	-	13
Pinscher	1	0,6	1	-	12
Rhodesian ridgeback	1	0,6	-	1	12
Shih tzu	1	0,6	1	-	9

Répartition selon la robe

La robe est clairement stipulée pour 51 chiens mais elle est connue pour un plus grand nombre de chien en raison de leur race. Ainsi 115 chiens ont pu être considérés dans cette analyse. Ils se répartissent de la façon suivante :

- **98 chiens, soit 85% des cas, sont de robe foncée** (noir, noir et feu, poivre et sel, bleu…)
- **10 chiens, soit 9% des cas, sont de robe intermédiaire** (noir et blanc, charbonné, robe à manteau noir, …)
- **7 chiens, soit 6% des cas, sont de robe claire** (blanc, beige, sable, fauve,…).

Répartition selon le poids

Le poids est connu pour 46 chiens. **Le poids moyen est de 31,9 kg** mais l'écart-type est de 16,48 kg, ce qui signifie que plus de 90% de ces 46 chiens pèsent plus de 15,4 kg.

Répartition selon la localisation tumorale

Le membre atteint est connu pour 152 chiens, et le doigt atteint est quant à lui connu pour 115 chiens. Pour **104 sur 152 chiens, soit 68,4%, le membre atteint est un membre thoracique et pour 48 sur 152 chiens, soit 31,6%, il s'agit d'une atteinte d'un membre pelvien.** Dans l'ensemble il y a autant de membres droits (76) que de membres gauches (75) atteints. **Il ne semble pas y avoir de doigt plus prédisposé qu'un autre à développer un carcinome épidermoïde.**

La répartition des localisations tumorales répertoriées dans notre étude est indiquée dans le **Tableau 8** et la **Figure 39**

Tableau 8 : Répartition selon la localisation tumorale
NR=Non renseigné

	Membre gauche 75						
Antérieurs 104 (68%)	Antérieur Gauche 48 (32%)	NR	5 (3%)	NR	6 (4%)	Postérieur Gauche 27 (18%)	**Postérieurs 48** (32%)
		I	16 (11%)	I	3 (2%)		
		II	10 (7%)	II	3 (2%)		
		III	6 (4%)	III	6 (4%)		
		IV	2 (1%)	IV	5 (3%)		
		V	9 (6%)	V	4 (3%)		
	NR 1 (0%)	NR	1 (0%)	NR	0 (0%)	NR 0 (0%)	
	Antérieur Droit 55 (36%)	I	6 (4%)	I	2 (1%)	Postérieur Droit 21 (14%)	
		II	7 (5%)	II	2 (1%)		
		III	7 (5%)	III	5 (3%)		
		IV	8 (5%)	IV	1 (0%)		
		V	8 (5%)	V	5 (3%)		
		NR	19 (13%)	NR	6 (4%)		
	Membre droit 76						

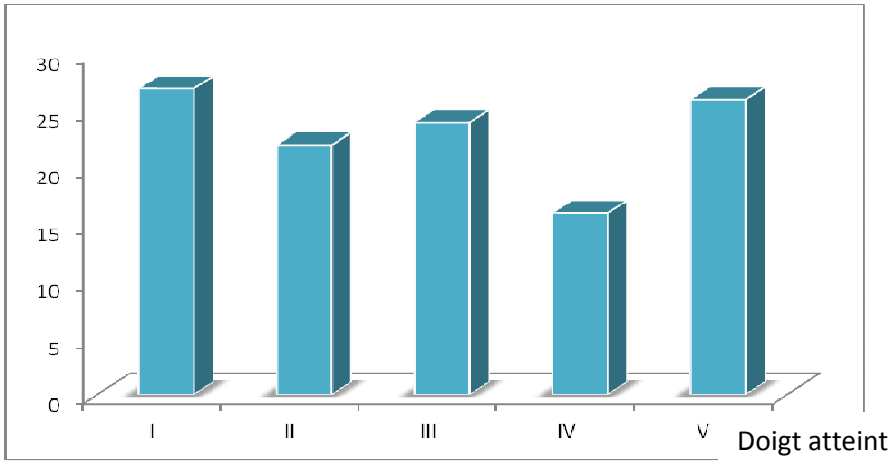


Figure 39 : Répartition selon le doigt

Répartition selon l'aspect clinique

L'aspect clinique est renseigné pour 105 cas de carcinomes épidermoïdes digités. Les signes cliniques observés sont principalement :

- une **hypertrophie du doigt** : 47 cas soit 44,76%.
- une **modification/perte de la griffe** : 39 cas soit 37,14%
- une **masse** : 35 cas soit 33,33%
- une **boiterie** : 22 cas soit 20,95%
- un **léchage** : 9 cas soit 8,57%.

Plusieurs de ces signes cliniques peuvent être présents en même temps. Parmi les 47 cas d'hypertrophie digitée, 13 d'entre eux, soit 27,66%, présentaient une infection locale associée, et lors de la présence de **masse**, celle-ci est **ulcérée et/ou nécrosée dans 68,57% des cas**.

Comportement biologique et évolution

Cette partie s'appuie sur les 49 chiens dont nous disposons d'un suivi. On dénombre 31 chiens en apparente rémission, 7 chiens ayant présenté une atteinte multiple, 6 chiens ayant fait une récidive et 2 chiens ayant développé des métastases.

Atteinte digitée multiple

Parmi les 49 chiens ayant fait l'objet d'un suivi, 7 chiens, soit **14,29% des cas,** ont présenté une atteinte digitée multiple. Pour tous les cas les diverses atteintes ont été successives. Les durées avant l'apparition d'une nouvelle atteinte digitée sont présentées dans le **Tableau 9**. **Dans notre étude la durée moyenne avant l'apparition d'une nouvelle atteinte digitée est de 8,34 mois** mais la distribution est très étalée, les durées allant de l'ordre de la semaine à une année.

Si on s'intéresse à la localisation de ces atteintes digitées multiples on observe au total 8 atteintes d'un membre thoracique (62%) pour 5 atteintes d'un membre pelvien (38%). Ces proportions sont comparables à celles obtenues dans l'analyse générale de la localisation des carcinomes épidermoïdes digités précédente. Parmi ces 7 chiens, deux ont développé des carcinomes sur des doigts d'un même membre alors que pour les autres les atteintes ont impliqué des membres différents à chaque fois.

Tableau 9 : durée avant nouvelle atteinte
NR = Non renseigné

Cas	Durée avant nouvelle atteinte digitée
27	2e atteinte : NR 3e atteinte : 11 mois après
28	12 mois
29	1 mois
30	16 mois
31	2e atteinte : 13 mois 3e atteinte : 11 mois après
32	3 semaines
33	2 mois

Récidive locale

Parmi les 49 chiens ayant fait l'objet d'un suivi, 6 chiens, soit **12,24% des cas,** ont fait une récidive locale. Deux récidives successives sont rapportées pour un de ces chiens. Les durées avant récidive sont indiquées dans le **Tableau 10**. **La durée moyenne avant récidive présentée dans la population de chiens étudiée ici est de 7,3 mois** mais la distribution est fortement étalée, allant de 1,5 mois à 24 mois.

Tableau 10 : Durée avant récidive
NR = Non renseigné

Cas	Durée avant récidive
34	3 mois
36	NR
37	2 mois
42	24 mois
43	NR
44	1ère récidive : 1,5 mois 2de récidive : 6 mois après

Dissémination métastatique

Dans cette étude seulement 2 chiens, soit **4,08% des cas**, se sont avérés développer des métastases. Pour ces deux chiens les métastases étaient uniquement loco-régionales, c'est-à-dire localisées aux nœuds lymphatiques satellites. Ces métastases ont été diagnostiquées **2 à 3 mois après** l'amputation.

L'un de ces deux chiens est le chien décrit comme ayant été euthanasié pour cause de récidive et métastase ganglionnaire dans la partie traitant du taux et de la durée de survie. L'autre chien ayant manifesté des métastases ganglionnaires n'a pas été euthanasié, les propriétaires ayant opté pour l'essai d'une chimiothérapie. Toutefois nous ne disposons d'aucune information sur le devenir de cet animal au-delà de ce choix thérapeutique.

Taux et durée de survie

Parmi ces 49 chiens, 7 sont morts au cours du suivi réalisé, tous par euthanasie. Seulement 4, soit 8,33% de ces chiens, ont été euthanasiés en raison du développement du carcinome épidermoïde digité. Les causes de l'euthanasie et la durée avant décès de ces quatre chiens sont présentées dans **Tableau 11**. **En moyenne le décès de ces 4 chiens est survenu 7,75 ± 4,03 mois après l'amputation du doigt atteint primitivement**.

Tableau 11 : Durée de survie

Cause de l'euthanasie	Durée de survie
Récidive	8 mois
Récidive	10 mois
Atteintes multiples	Plus de 11 mois
Récidive et métastase ganglionnaire	2 mois

En ce qui concerne les trois autres chiens décédés au cours de la période de suivi dont ils ont fait l'objet, deux des chiens ont été euthanasiés pour raison médicale (œdème aigu du poumon, collapsus trachéal) et pour le dernier il s'agit d'une euthanasie liée aux conséquences de l'âge avancé de l'animal.

Nous disposons pour cette étude d'un suivi pour 49 chiens, avec une durée moyenne de suivi de 13,5 mois, s'étalant de 1 à 45 mois. Les données de notre étude ne permettent pas le calcul d'un taux et d'une durée de survie.

B. Analyse histologique

49 cas étaient susceptibles d'être inclus dans l'analyse histologique mais lors de celle-ci 5 cas n'ont pas montré de tumeur sur les lames observées. Ainsi au final **44 chiens furent inclus** dans l'analyse histologique. Ils se répartissent de la façon suivante :

- **26 chiens en apparente rémission**
- **6 chiens ayant présenté une atteinte multiple**
- **5 chiens présentant des métastases ou des emboles**
- **3 chiens ayant fait une récidive locale**
- **3 chiens ayant à la fois fait une récidive locale et développé des métastases ou présentant des emboles**
- **1 chien ayant présenté une atteinte multiple et des emboles.**

Pour 5 cas ayant manifesté une atteinte multicentrique nous disposons de prélèvements correspondant à deux localisations distinctes, ainsi cette analyse concerne 49 échantillons tumoraux.

Reconnaissance des carcinomes épidermoïdes

L'examen des différentes lames montre la présence de tumeurs dans le derme superficiel, moyen et profond, parfois en lien avec l'épiderme du lit de l'ongle. Dans tous les cas analysés il s'agit d'une tumeur mal délimitée, non encapsulée et à croissance infiltrante. Le stroma est plus ou moins abondant et un infiltrat neutrophilique peut être présent notamment lors de tumeur ulcérée ou lorsque la kératine est abondante. Une réaction granulomateuse peut également être rencontrée dans ce dernier cas. Les carcinomes épidermoïdes sont des tumeurs multinodulaires organisées en îlots ou travées et plus rarement en cordons de cellules néoplasiques polygonales fortement jointives qui présentent une différenciation épidermique plus ou moins marquée suivant le degré de différenciation de ces cellules. L'anisocytose et l'anisocaryose sont modérées. Des zones de nécrose sont parfois visibles au sein des tumeurs.

Différenciation

L'analyse histologique des différents échantillons tumoraux a montré que les carcinomes épidermoïdes digités présentent des degrés de différenciation variables. On retrouve dans cette étude les trois aspects histologiques des carcinomes épidermoïdes les plus courants.

Ainsi nous avons pu observer :

- des **carcinomes épidermoïdes bien différenciés**, reconnaissables par leur organisation en vastes îlots ou travées de cellules imbriquées en lamelles concentriques, formant fréquemment en leur centre des perles de kératine, (**figure 41**)

- des **carcinomes épidermoïdes modérément différenciés** qui peuvent se présenter sous deux aspects : le premier se composant d'îlots ou travées de petite taille avec de rares perles de kératine; le second, moins fréquent, correspondant à de larges plages de cellules d'aspect homogène, l'organisation concentrique centripète habituelle n'étant plus observée, (**figure 42**)

- des **carcinomes épidermoïdes peu différenciés** qui se présentent sous la forme de cellules isolées ou rassemblées en petits cordons au sein d'une matrice fibreuse souvent abondante (desmoplasie). (**figure 43**)

Toutefois la différenciation des tumeurs n'est pas uniforme au sein des néoplasmes et des zones de différenciation différente peuvent être observées au sein d'une même coupe d'une tumeur.

Pour un des 44 cas (le cas n°1) l'analyse histologique a révélé une forme de carcinome épidermoïde acantholytique à l'exception de quelques zones peu différenciées.

Ainsi les 49 tumeurs correspondant aux 44 cas inclus dans cette analyse se répartissent en fonction de leur degré moyen de différenciation de la manière suivante :

- **40 tumeurs, soit 82% des cas, sont bien différenciées**

- **8 tumeurs, soit 16% des cas, sont modérément différenciées**

- **1 tumeur, soit 2% des cas, est peu différenciée.**

Les valeurs moyennes obtenues pour chaque cas sont indiquées dans l'**Annexe 4** et leur distribution est représentée dans la **figure 40**.

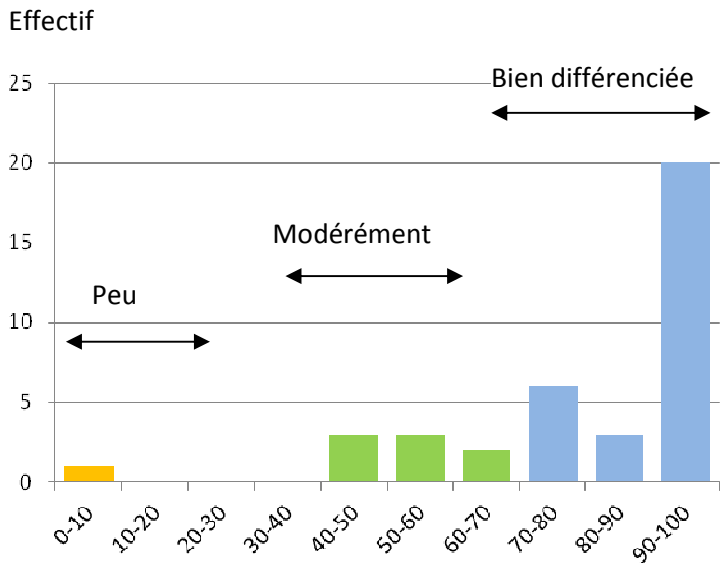


Figure 40 : Degré moyen de différenciation des tumeurs

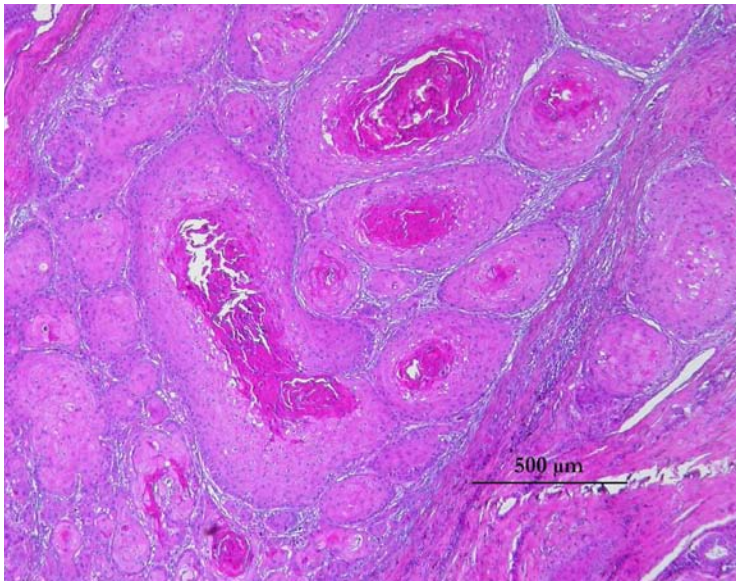


Figure 41 : Aspect microscopique de carcinome épidermoïde bien différencié Les cellules néoplasiques sont organisées en vastes îlots à différenciation centripète. C*as n°26, coloration HE (x40)*

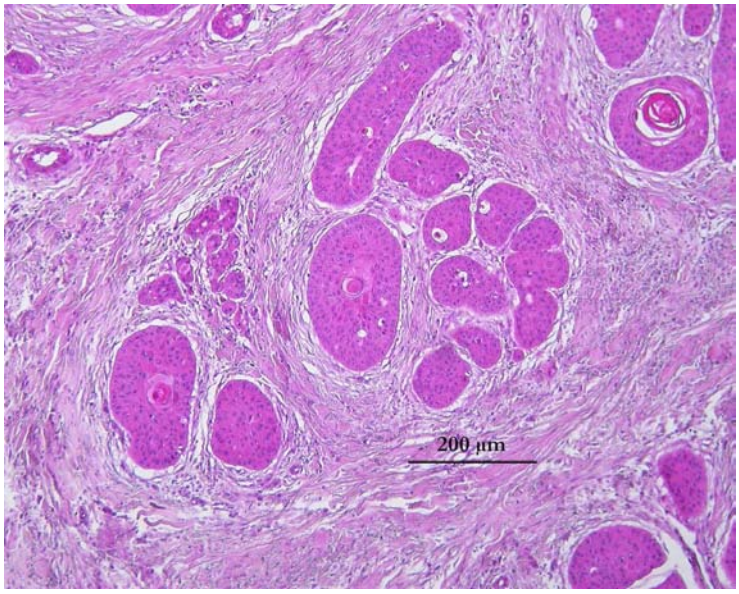


Figure 42 : Aspect microscopique de carcinome épidermoïde modérément différencié On observe de nombreux îlots de petite taille de cellules néoplasiques organisées de façon centripète, les perles de kératine sont peu nombreuses. *Cas n°39, coloration HE (x100)*

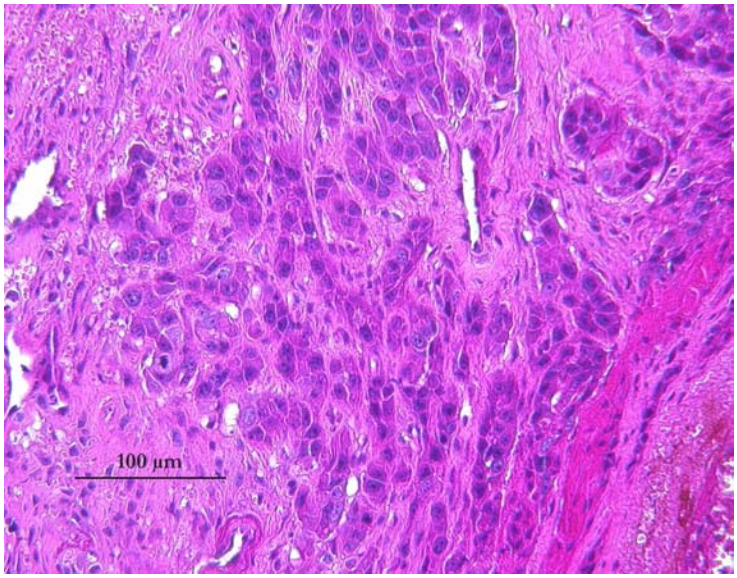


Figure 43 : Aspect microscopique de carcinome épidermoïde peu différencié Les cellules néoplasiques forment de fins et courts cordons. C*as n°1, coloration HE (x40) (x200)*

Emboles

Des emboles ont été recherchés lors de l'examen histologique de nos échantillons tumoraux. La présence d'emboles a alors été révélée pour 7 des 49 cas. Pour les deux chiens ayant développé des métastases ganglionnaires, aucun embole n'a été identifié.

Pour les 7 cas avec emboles, ceux-ci étaient constitués en moyenne d'une dizaine de cellules néoplasiques jointives à fort rapport nucléo-cytoplasmique, en grande majorité peu différenciées, organisées en structures rondes plus ou moins ovalaires. (**figure 44**)

Mitoses

Le nombre de mitoses est très variable d'un champ à un autre, pouvant aller de plus de 16 mitoses à 0, alors que l'index mitotique calculé est en moyenne de 2 mitoses par champ et pour plus de 90% des cas analysés l'index mitotique calculé est inférieur à 4 mitoses par champ (**Annexe 4**). Toutefois des images de mitoses anormales, tout particulièrement des images de mitose tripartite, ont été observées de manière assez fréquente. Par ailleurs, notons que le nombre de mitoses observées est souvent plus élevé au sein des zones de plus faible différenciation.

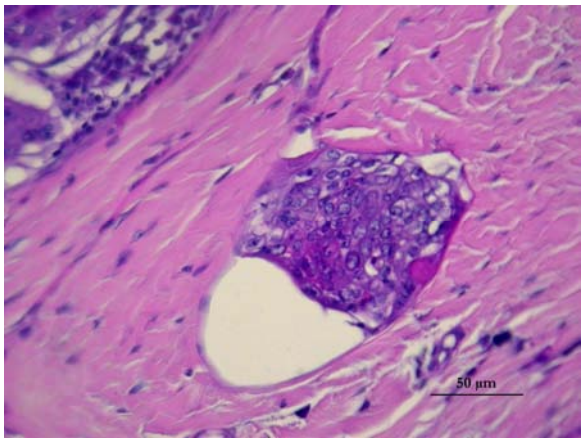


Figure 44 : Aspect microscopique d'un embole de carcinome épidermoïde digité. Nous observons un amas (ici d'un nombre élevé) de cellules néoplasiques au sein d'un vaisseau. *Cas n°35, coloration HE, (x400)*

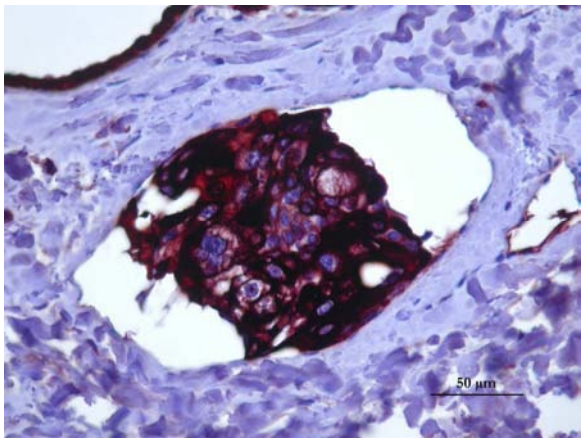


Figure 45 : Aspect microscopique d'un embole de carcinome épidermoïde digité suite à l'immunomarquage des cytokératines. Nous observons que toutes les cellules tumorales de l'embole sont fortement positives. *Cas n°35, coloration immunohistochimique avec l'anticorps AE1/AE3 (x400)*

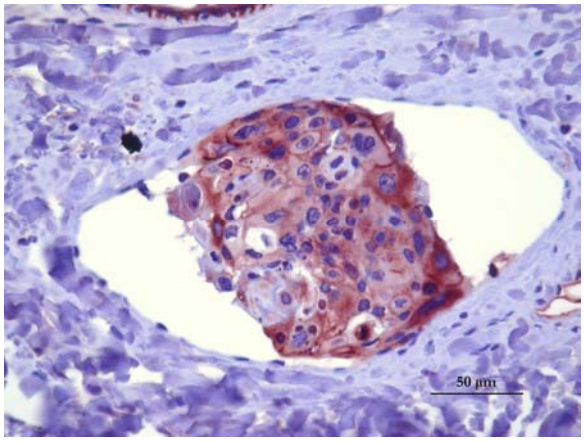


Figure 46 : Aspect microscopique d'un embole de carcinome épidermoïde digité suite à l'immunomarquage de l'E-cadhérine. Nous observons que la majorité des cellules tumorales de l'embole sont positives, avec des anomalies de localisation notables. *Cas n°35, coloration immunohistochimique avec l'anticorps anti-E-cadhérine (x400)*

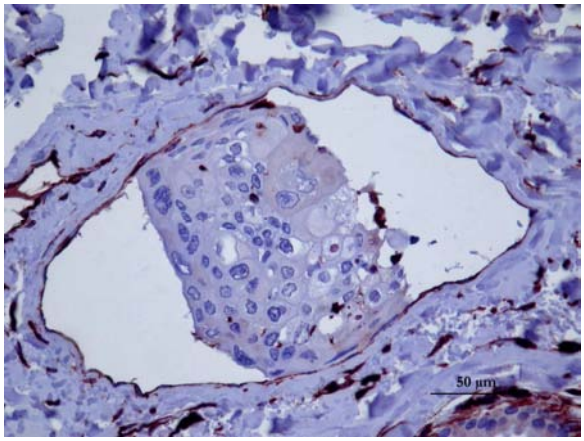


Figure 47 : Aspect microscopique d'un embole de carcinome épidermoïde digité suite à l'immunomarquage de la vimentine. Les cellules tumorales au sein de l'embole sont négatives. Un marquage faible de certaines cellules est présent mais il est comparable à du bruit de fond. *Cas n°35, coloration immunohistochimique avec l'anticorps anti-vimentine (x400)*

,

C. Analyse immunohistochimique

Cette analyse repose sur les mêmes 44 cas et 49 échantillons tumoraux que l'analyse histologique.

Les valeurs moyennes obtenues pour chaque cas sont indiquées dans l'**Annexe 4**.

Cytokératines

L'aspect présenté par l'épiderme suite à l'immunomarquage des cytokératines par l'anticorps AE1/AE3 est présenté dans la photographie suivante. (**figure 48**)

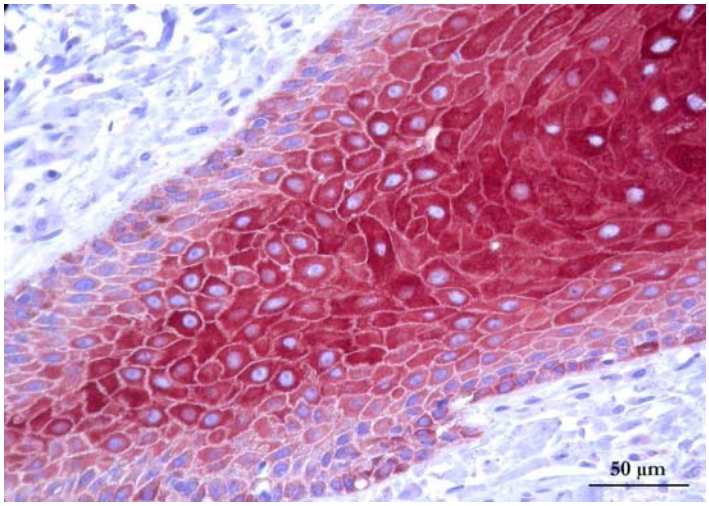


Figure 48 : Aspect de l'immunoréactivité de l'épiderme suite à l'immunomarquage des cytokératines. Les kératinocytes de la couche basale et du bas de la couche épineuse présentent un marquage peu soutenu alors que dans le haut de la couche épineuse et dans la couche granuleuse les cellules présentent une forte immunoréactivité. *Cas n°2, coloration immunohistochimique avec l'anticorps AE1/AE3 (x400)*

Nous avons constaté que les tumeurs ainsi marquées pouvaient prendre en fait trois aspects caractéristiques distincts auxquels le pourcentage de cellules positives et l'intensité du marquage sont liés:

- les tumeurs catégorisées '+++' : toutes les cellules sont positives et plus de 66% d'entre elles présentent une forte immunoréactivité, (**figure 49**)

- les tumeurs catégorisées '++' présentent un aspect proche de celui de l'épiderme sain : toutes les cellules sont positives avec une intensité faible dans les couches les plus externes et forte au-delà (entre 33 et 66% des cellules présentent une forte immunoréactivité, (**figure 50**)

- et les tumeurs catégorisées '+' : un plus grand nombre de cellules est peu marqué, voire le marquage est négatif. L'immunoréactivité est alors très variable d'une cellule à l'autre avec des cellules très pales et des cellules (0-33%) présentant un marquage très soutenu. (**figure 51**)

- Notons qu'il a été constaté pour un seul de ces cas que les cytokératines étaient surexprimées sur le front d'invasion de la tumeur.

Par ailleurs on a constaté que l'aspect du marquage était fortement lié au degré de différenciation de la zone tumorale considérée. Ainsi les zones bien différenciées présentent la plupart du temps une immunoréactivité correspondant à l'aspect '++'. Les zones modérément différenciées sont d'aspect plus variable mais le plus souvent elles présentent les aspects '++' voire '+++'. L'aspect '+' est prédominant dans les zones peu différenciées.

Ces analyses ont également concerné les emboles. Pour 6 des 7 cas pour lesquels des emboles ont été identifiés, les cellules de ceux-ci présentent une immunoreactivité '+++', pour le 7ème cas bien que quelques cellules soient négatives l'aspect du marquage est '++'. Ces résultats sont supérieurs aux valeurs attribuées à leur tumeur d'origine. . (**figure 45**)

Aucune anomalie de distribution cellulaire du marquage n'a été observée.

Toutes les valeurs moyennes par cas obtenues sont présentées dans l'**Annexe 4**, et les résultats en fonction du devenir des animaux sont résumés dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 : Expression des cytokératines en fonction du devenir des animaux.

	Total	Rémission	Multiple	Récidive	Embole
Pourcentage moyen de cellules à forte immunoréactivité	63 ± 19%	60 ± 19%	65 ± 13%	58 ± 21%	75 ± 19%
Pourcentage minimum de cellules à forte immunoréactivité	31%	33%	33%	31%	31%
Pourcentage maximum de cellules à forte immunoréactivité	100%	100%	85%	83%	100%

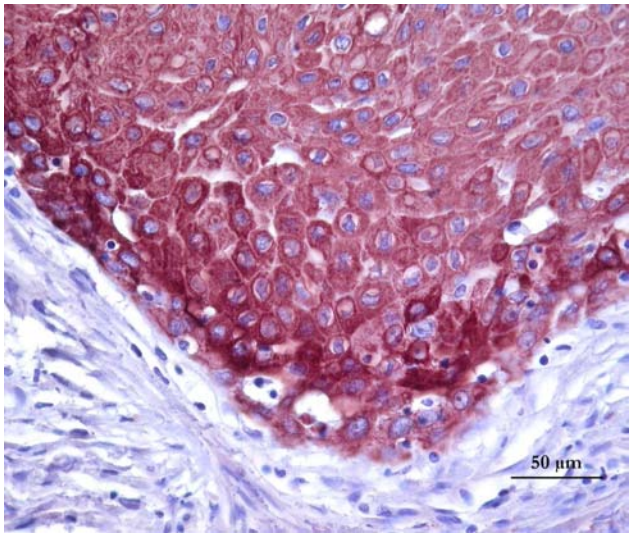


Figure 49 : Aspect '+++' pris par les carcinomes épidermoïdes digités canins suite à l'immunomarquage des cytokératines. La totalité des cellules tumorales sont positives avec un marquage de forte intensité. *Cas n°2, coloration immunohistochimique avec l'anticorps AE1/AE3 (x400)*

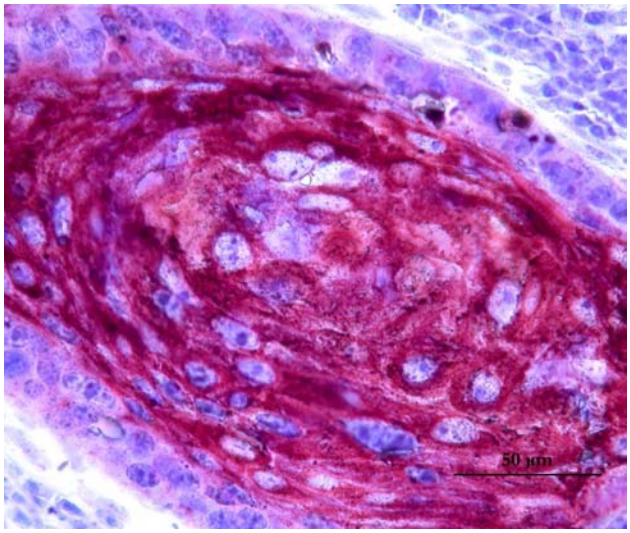


Figure 50 : Aspect '++' pris par les carcinomes épidermoïdes digités canins suite à l'immunomarquage des cytokératines. A ce grossissement on observe que les cellules des assises cellulaires les plus externes présentent une plus faible immunoréactivité que les cellules plus au centre. *Cas n°6, coloration immunohistochimique avec l'anticorps AE1/AE3 (x400)*

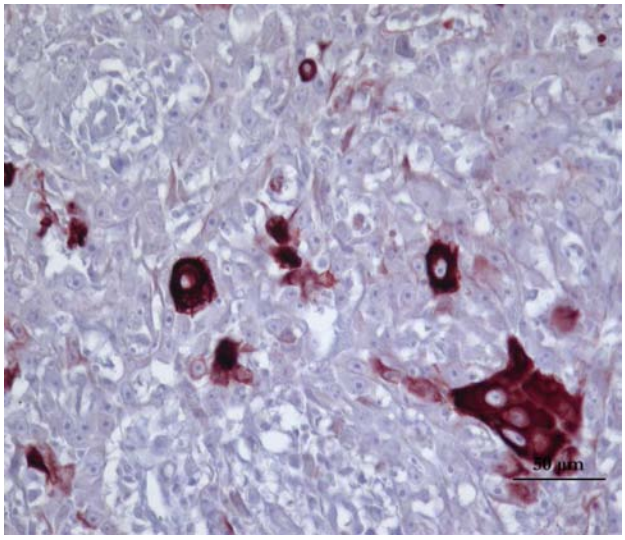


Figure 51 : Aspect '+' pris par les carcinomes épidermoïdes digités canins suite à l'immunomarquage des cytokératines. Un grand nombre de cellules néoplasiques sont négatives au marquage alors que les quelques cellules positives le sont pour la plupart très intensément. *Cas n°3, coloration immunohistochimique avec l'anticorps AE1/AE3 (x400)*

E-cadhérine

Nous avons constaté lors de la lecture des lames immunomarquées par l'antigène anti-E-cadhérine que sur certaines lames le marquage n'était pas pris de façon homogène sur l'ensemble de la lame. La peau saine présente sur les coupes a servi de témoin positif de la bonne réalisation du marquage, ainsi pour 8 cas les lames montrent des zones d'épiderme non marqué, ces cas ont alors été considérés comme non valides et n'ont donc pas été analysés. (**Annexe 4**)

Au sein de l'épiderme sain le marquage immunohistochimique de l'E-cadhérine est membranaire, intense et homogène. (**figure 52**)

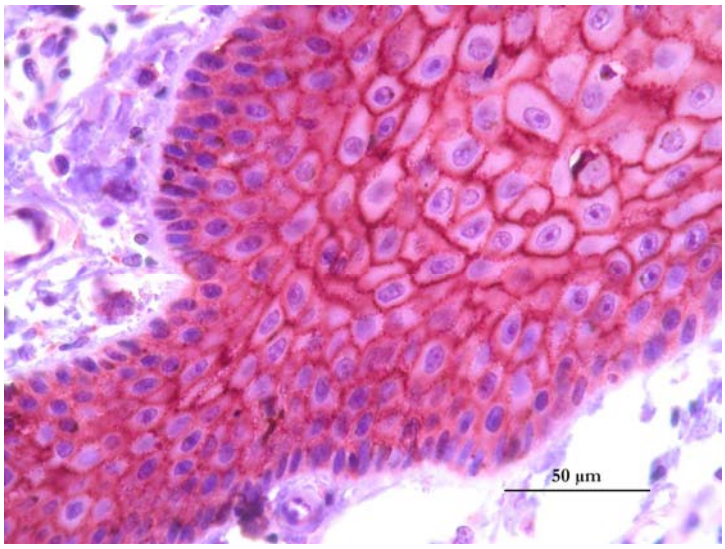


Figure 52 : Aspect de l'immunoréactivité de l'épiderme suite à l'immunomarquage de l'E-cadhérine. L'immunoréactivité est principalement membranaire bien qu'un bruit de fond soit présent dans le cytoplasme des cellules. *Cas n°18, coloration immunohistochimique avec l'anticorps anti-E-cadhérine (x400)*

La majorité des zones bien différenciées présente un pourcentage de cellules positives supérieur à 66%. Les zones peu différenciées présentent un pourcentage de cellules positives inferieur à 33%. Les résultats concernant les zones modérément différenciées sont très variés.

A l'exception de 7 cas (14%) les tumeurs présentent une immunoréactivité plus faible que celle observée dans l'épiderme sain ; la faible intensité du marquage ne permet pas d'évaluer ses variations dans les tumeurs. (**figure 53 et 54**)

En ce qui concerne la localisation cellulaire de l'immunomarquage, nous avons observé des cellules marquées au niveau cytoplasmique. (**Annexe 4** et .**figure 55**)

Pour l'E-cadhérine, seulement trois cas ont présenté des emboles sur la lame traitée pour cet immunomarquage. Pour ces trois cas l'E-cadhérine est exprimée dans plus de 70% des cellules et des anomalies de localisation (marquage cytoplasmique) ont été observées au sein des cellules constitutives de ces emboles. . (**figure 46**)

Les valeurs moyennes du nombre de cellules positives par cas sont présentées dans l'**Annexe 4** , et les résultats en fonction du devenir des animaux sont résumés dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : Expression de l'E-cadhérine en fonction du devenir

	Total	Rémission	Multiple	Récidive	Embole
Pourcentage moyen de cellules positives	68 ± 30%	66 ± 25%	89 ± 11%	53 ± 41%	85 ± 23%
Pourcentage minimum de cellules positives	0%	15%	65%	0%	36%
Pourcentage maximum de cellules positives	100%	100%	100%	97.5%	100%

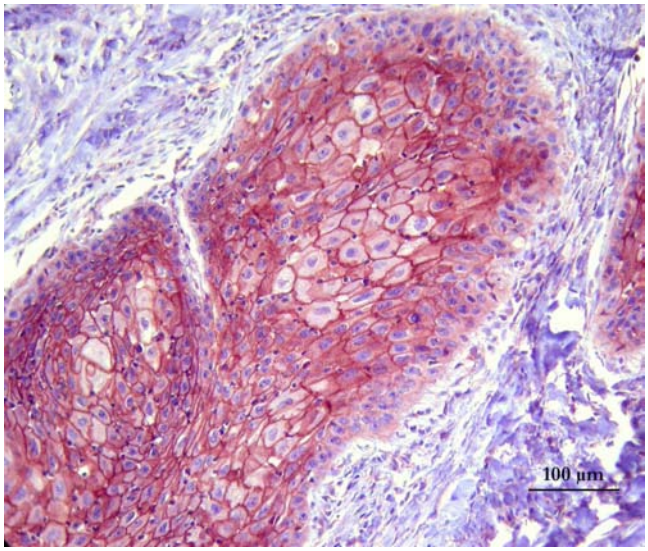


Figure 53 : Immunoréactivité la plus intense prise par les carcinomes épidermoïdes digités canins suite à l'immunomarquage de l'E-cadhérine. *Cas n°38, coloration immunohistochimique avec l'anticorps anti-E-cadhérine (x200)*

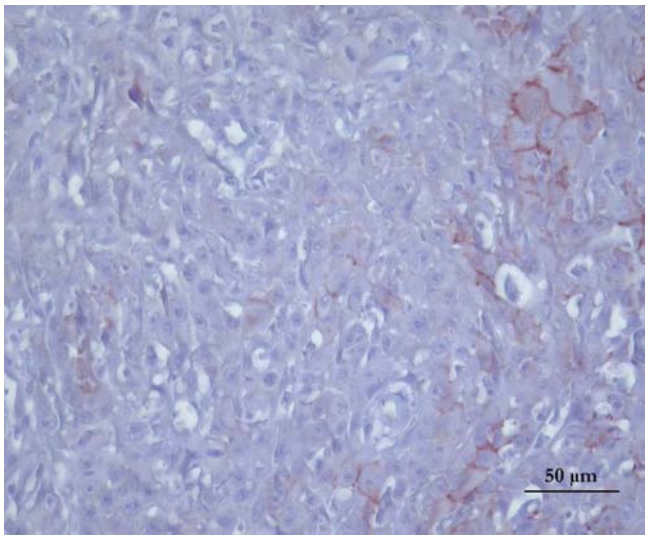


Figure 54 : Exemple de faible immunoréactivité présentée par les carcinomes épidermoïdes digités canins suite à l'immunomarquage de l'E-cadhérine. La plupart des cellules néoplasiques sont négatives, seules quelques cellules néoplasiques présentent un marquage de faible intensité.. *Cas n°3, coloration immunohistochimique avec l'anticorps anti-E-cadhérine (x400)*

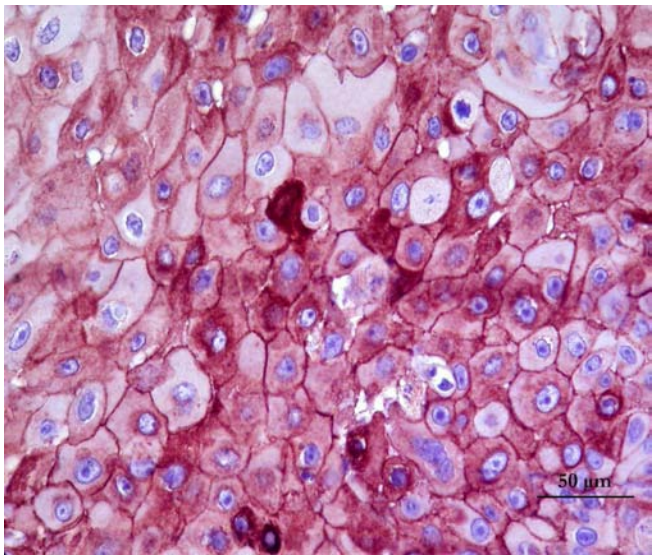


Figure 55 : Marquage cytoplasmique anormal pris par certaines cellules de carcinomes épidermoïdes digités canins suite à l'immunomarquage de l'E-cadhérine. Bien qu'un bruit de fond soit présent on observe que des cellules présentent une immunoréactivité cytoplasmique d'intensité modérée à sévère. *Cas n°33 (1ère localisation), coloration immunohistochimique avec l'anticorps anti-E-cadhérine (x400)*

Vimentine

La vimentine est une protéine cytoplasmique qui n'est normalement pas exprimée dans les cellules épithéliales. Ainsi l'immunomarquage de la vimentine est négatif au sein des kératinocytes. (**figure 56**)

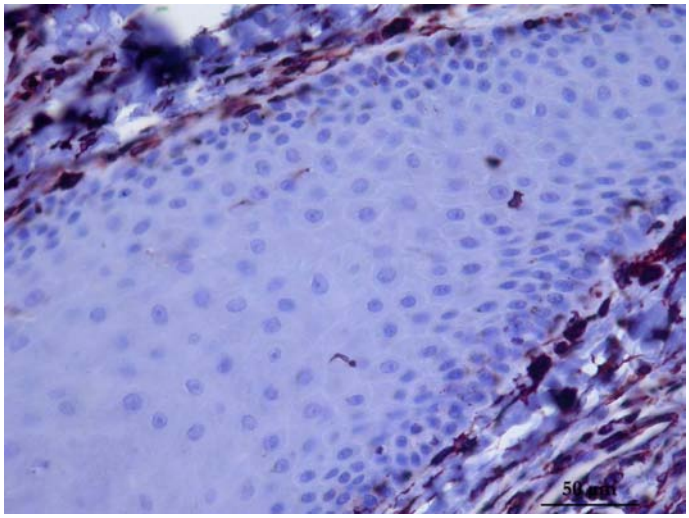


Figure 56 : Aspect de l'immunoréactivité de l'épiderme suite à l'immunomarquage de la vimentine. Nous observons sur cette coupe que les kératinocytes sont négatifs à l'immunomarquage anti-vimentine. Les cellules mésenchymateuses présentes dans le derme sont positives. *Cas n°2, coloration immunohistochimique avec l'anticorps anti-vimentine (x400)*

Au sein des carcinomes épidermoïdes digités on observe parfois des cellules néoplasiques présentant une immunoréactivité positive. Comme pour les cytokératines il parut évident lors de la lecture des lames que l'expression de la vimentine par les cellules tumorales était liée au degré de différenciation de la zone tumorale considérée. Pour 88% des cas, dans les zones bien et modérément différenciées moins de 5% des cellules peuvent être positives. (**figure 57**) Dans les zones peu différenciées le nombre de cellules positives est très variable d'une tumeur à l'autre, allant de 0 à 70% avec une moyenne de 35% de cellules positives. En plus de ceci, il a été constaté que l'expression de la vimentine était également plus fréquente en périphérie des tumeurs et tout particulièrement dans les zones infiltrantes de celles-ci, quelque soit leur degré de différenciation. (**figure 58**)

Des variations importantes de l'intensité de l'immunoréactivité ont été constatées, les cellules présentent le plus souvent une immunoréactivité modérée mais des cellules très fortement positives ont également été observées, sans corrélation avec le degré de différenciation.

En ce qui concerne les emboles, ils présentent un marquage négatif à l'exception de deux cas pour lesquels la positivité est estimée à moins de 5% des cellules pour l'un et de 15% pour le second, avec dans les deux cas certaines cellules présentant un marquage de très forte intensité. Dans tous les cas le nombre de cellules positives dans les emboles est comparable à la tumeur dont ils sont issus. (**figure 47**)

Dans tous les cas aucune anomalie de localisation n'a été observée, le marquage étant toujours en position cytoplasmique.

Les valeurs moyennes du nombre de cellules positives par cas sont présentées dans l'**Annexe 4** et les résultats en fonction du devenir des animaux sont résumés dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 : Expression de la vimentine en fonction du devenir des animaux

	Total	Rémission	Multiple	Récidive	Embole
Pourcentage moyen de cellules positives	9 ± 17%	5 ± 9%	6 ± 11%	13 ± 23%	9 ± 19%
Pourcentage minimum de cellules positives	0%	0%	0%	0%	0%
Pourcentage maximum de cellules positives	60%	34.25%	22%	60%	60%

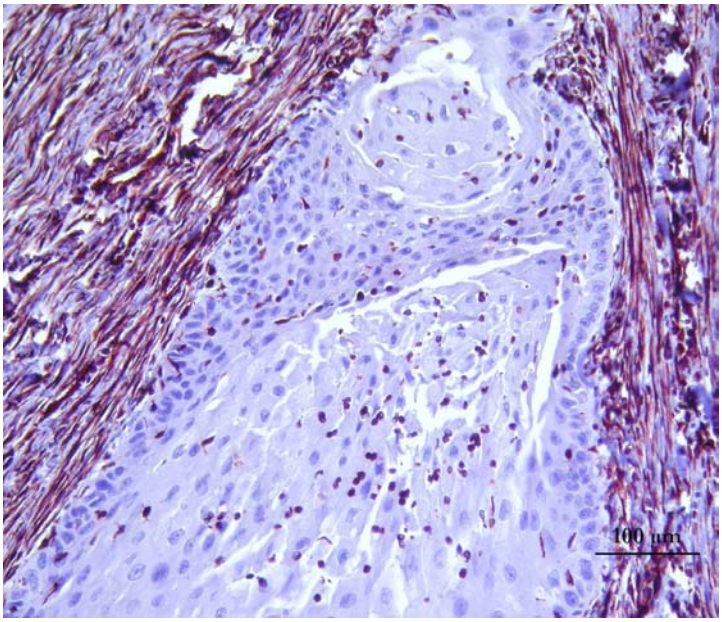


Figure 57 : Aspect microscopique le plus fréquent pris par les carcinomes épidermoïdes digités suite à l'immunomarquage de la vimentine. Cette coupe représente l'aspect classiquement pris par les carcinomes épidermoïdes digités canins lors d'immunomarquage de la vimentine. Les cellules néoplasiques sont négatives, les quelques cellules positives visibles au sein de la photographie étant des neutrophiles. *Cas n°38, coloration immunohistochimique avec l'anticorps anti-vimentine (x200)*

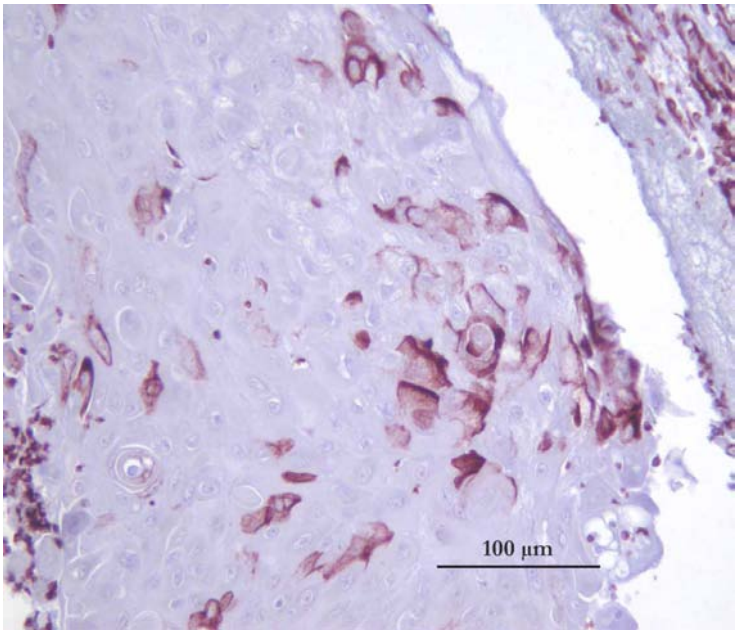


Figure 58 : Aspect microscopique observé dans les zones peu différenciées ou dans les zones les plus infiltrantes des carcinomes épidermoïdes digités suite à l'immunomarquage de la vimentine. Il s'agit ici du front tumoral d'un carcinome épidermoïde digité canin bien différencié observé à un fort grossissement. On observe un certain nombre de cellules néoplasiques positives. Le marquage est cytoplasmique mais non homogène, il est plus soutenu en région sous-membranaire. *Cas n°40, coloration immunohistochimique avec l'anticorps anti-vimentine (x200)*

D. Analyses statistiques

Nous cherchons ici à voir si la différenciation et les différents marqueurs immunohistochimiques sont corrélés au devenir des animaux, et donc s'ils se comportent comme des marqueurs pronostic. Ainsi nous avons comparé la population de chiens en rémission par rapport aux chiens en non rémission.

Différenciation

Le degré de différenciation des tumeurs en fonction du devenir (rémission, atteinte multiple, récidive, embole/métastase) est représenté dans la **figure 59**.

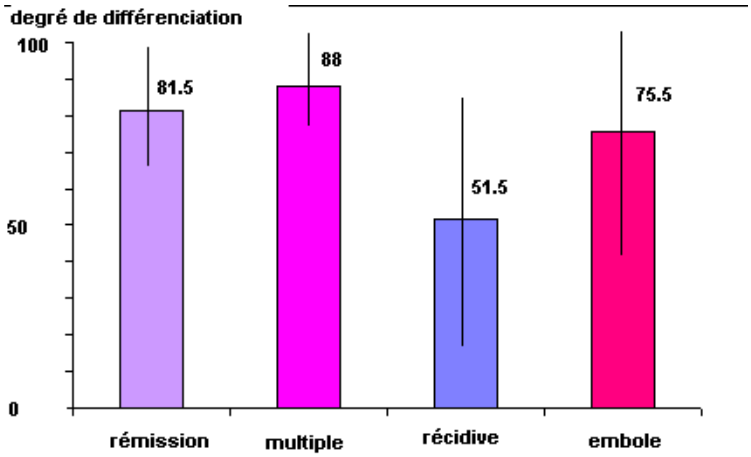


Figure 59 : Représentation du degré de différenciation des tumeurs en fonction du devenir (moyenne et écart-type)

L'analyse statistique comparant la différenciation des tumeurs issues de chiens en apparente rémission de celles issues de chiens non en rémission ne montre pas de différence significative (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, p=0,7231). Ce résultat est en accord avec ce que l'on peut présager en observant la **figure 59** puisque les intervalles formés par les écart-types des différents groupes se chevauchent.

Cependant si on s'intéresse au devenir des animaux en fonction de la différenciation (**Figure 60**) et non pas le contraire, on a alors l'impression que plus le degré de différenciation d'une tumeur est faible plus le risque de ne pas faire de rémission est faible.

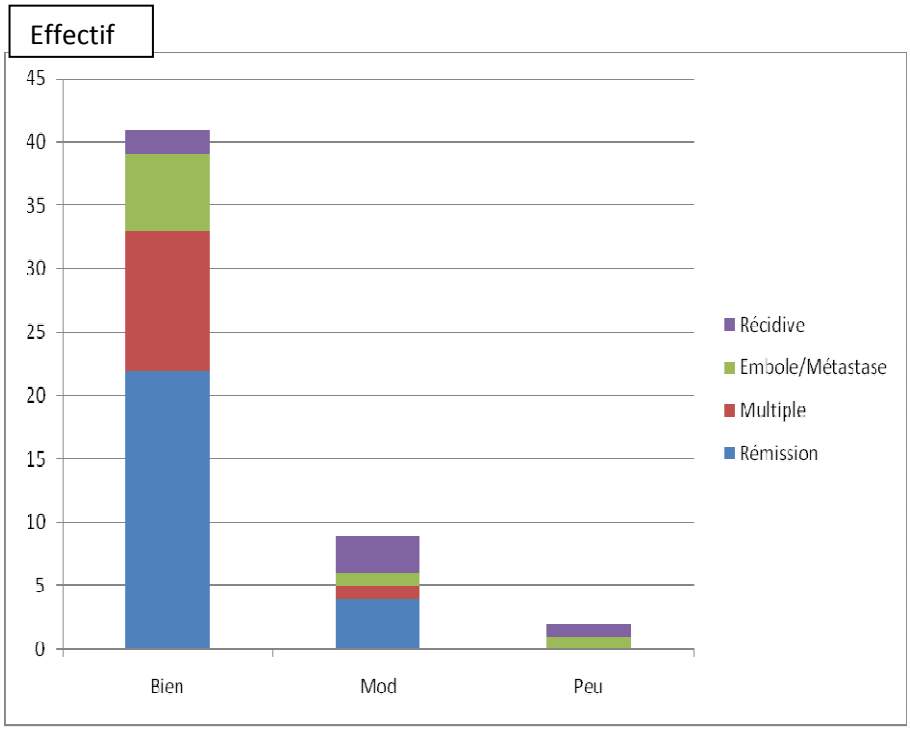


Figure 60 : Représentation du devenir des animaux en fonction du degré de différenciation.

Cytokératines

L'analyse statistique comparant l'expression des cytokératines des tumeurs issues de chiens en apparente rémission de celles issues de chiens non en rémission ne montre pas de différence significative (test de Student, p=0,1628). Cependant le nombre de cas par groupe considéré est très faible et les valeurs sont très étalées.

E-cadhérine

L'analyse statistique comparant l'expression de l'E-cadhérine des tumeurs issues de chiens en apparente rémission de celles issues de chiens non en rémission montre une différence significative (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, p=0,02438). Cependant le nombre de cas par groupe considéré est très faible et les valeurs sont très étalées.

Vimentine

L'analyse statistique comparant la vimentine des tumeurs issues de chiens en apparente rémission de celles issues de chiens non en rémission ne montre pas de différence

significative (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, p=0,3672). Cependant le nombre de cas par groupe considéré est très faible et les valeurs sont très étalées.

III. DISCUSSION

A. Analyse épidémiologique

Cette partie de l'étude a été réalisée pour un nombre variable de chiens en fonction des renseignements à notre disposition pour chacun des paramètres envisagés. Le nombre de cas ainsi considéré est conséquent puisque plus de cent animaux sont pris en compte pour chacun des paramètres, à l'exception du poids pour lequel nous disposons seulement des données de 46 cas.

Les résultats obtenus dans cette étude pour l'âge et le sexe sont comparables aux données disponibles dans la littérature. On retrouve l'absence de prédisposition en fonction du sexe. [20,25,27] De même, l'âge de survenue dans notre étude est de 10,1 ± 2,3 ans ce qui est en adéquation avec l'âge de 9-10 ans que l'on rencontre dans les publications. [20,25,27,28,29] En effet la plupart des tumeurs canines touchent des individus âgés en raison du temps nécessaire à l'apparition et à l'accumulation de modifications du génome responsables d'une multiplication cellulaire incontrôlée. [90,91]

Trois principaux facteurs prédisposant ont été rapportés dans la littérature : la race, la robe et le poids. [20,24,25,28,29]

En ce qui concerne les races nous retrouvons bien dans cette étude une importante représentation des Rottweilers, des Schnauzers moyens et géants et des Caniches, comme il est décrit dans la littérature. [28] En revanche, dans notre étude, la race Beauceron apparaît comme étant prédisposée, ce qui n'a été rapporté nulle part auparavant. En effet il s'agit d'une race française dont très peu d'individus sont présents à l'étranger. La majorité des études épidémiologiques traitant du carcinome épidermoïde digité canin ayant été menées par des équipes américaines, il semble logique qu'aucune d'entre elles n'ait pu mettre en évidence cette prédisposition. Par ailleurs, dans notre étude comme dans la littérature [25,29], nous

trouvons une prédisposition des chiens de grande race à robe foncée dont font partie les Beaucerons.

Contrairement à ce qui est rapporté dans plusieurs études **[25,29,35]** nous avons observé un nombre plus important d'atteintes intéressant les membres antérieurs (deux fois plus) que de membres postérieurs. Nos résultats évoquent ceux que nous observons lors d'ostéosarcome appendiculaire chez le chien. **[92]** Les membres antérieurs supportent les 2/3 du poids du corps, ils sont donc soumis à deux fois plus d'efforts et contraintes que les membres postérieurs, ce qui pourrait expliquer cette différence. Le doigt I n'intervient pas dans la locomotion mais il est plus exposé aux traumatismes (arrachement) que les autres doigts.

Tous ces résultats suggèrent que certains chiens sont génétiquement prédisposés au développement de carcinome épidermoïde digité en raison de leur race et de leur robe, et qu'alors les traumatismes tiennent une place importante dans la cancérogenèse de ces tumeurs chez ces chiens.

Les descriptions cliniques des cas rapportés dans cette étude ne varient pas de celles décrites dans la littérature. **[27,28,29]** Nous retiendrons que cette affection se caractérise le plus souvent par une hypertrophie digitée et/ou d'une onychose. Nos résultats diffèrent cependant légèrement de ce qui est décrit par une plus grande proportion à l'ulcération ; cette dernière étant rapportée dans 68% des cas alors que selon *Henry et al* elle n'est présente que dans 38% des cas. **[26]**

Nous nous sommes également intéressés au comportement clinique de ces tumeurs grâce aux 49 cas pour lesquels nous disposions d'un suivi.

Dans cette étude nous observons 14% de cas d'atteinte digitée multiple. Notre étude recense donc deux fois plus d'atteintes multicentriques que les études antérieures, toutefois les publications sur ce sujet s'appuient également sur un nombre limité de cas. **[25,26,29,36]**
Si on s'intéresse aux délais avant l'apparition de ces diverses évolutions cliniques, bien que les durées de suivi dans notre étude ne soient guère satisfaisantes, on retrouve des valeurs comparables aux quelques cas décrits dans la littérature **[35,37]**, en effet nous obtenons une durée comprise entre 2 et 16 mois avec une moyenne de 8 mois.

En ce qui concerne les récidives, nous en avons recensé pour 12% des cas et la durée avant apparition de celles-ci est comprise entre 1 et 24 mois avec une moyenne de 7,3 mois, ce qui est comparable aux données bibliographiques. [40,52]

Pour les métastases, nous avons recensé seulement deux cas, soit 4%, avec métastases ganglionnaires, et aucun cas de métastases pulmonaires. La prévalence de métastases présentée par la population de chiens de notre étude est donc faible par rapport à ce qui est décrit dans la littérature. [20,21,25,36]

Pour ces deux cas la durée avant l'établissement du diagnostic de métastase est de l'ordre de quelques mois (2 et 3 mois). Ces durées sont faibles par rapport aux cas décrits dans la littérature (8 mois en moyenne). [20,40] L'attention du propriétaire à son animal de compagnie a augmenté au cours des dernières années et l'oncologie vétérinaire a fait des progrès en terme de dépistage, diagnostic et traitement. Il paraît donc logique de penser qu'un faible taux de métastases puisse s'expliquer aussi par un diagnostic plus précoce et donc un traitement efficace de la tumeur. La localisation des métastases dans nos cas (ganglionnaire et non pulmonaire) est également en faveur de cette hypothèse ; le nœud lymphatique étant la première étape de dissémination des tumeurs d'origine épithéliale qui métastasent par voie lymphatique. Il est cependant possible qu'en raison de la durée de suivie réalisée sur les animaux de cette étude, certains cas aient été considérés en rémission trop précocement. Un suivi plus long et plus homogène serait souhaitable afin de s'assurer de ces résultats.

B. Analyse histologique

L'examen histologique en oncologie sert à poser un diagnostic et aide à établir un pronostic en définissant le grade des tumeurs.

Nous avons retrouvé les trois degrés de différenciation décrits en littérature. [20] Au sein d'une même tumeur des zones de différent degré de différenciation ont pu être observées mais lorsque nous avons calculé la moyenne par cas, la majorité s'est révélée être bien différenciée. Même s'il semble qu'un faible degré de différenciation ne soit pas en faveur d'une rémission, les analyses statistiques réalisées ici ne montrent pas de différence

significative du degré de différenciation des tumeurs entre les cas en rémission et les cas en non rémission.

L'index mitotique montre très peu de variation entre les différentes tumeurs et son évaluation semble donc ne pas présenter d'intérêt pour aider à l'établissement d'un pronostic.

En ce qui concerne les emboles, nous en avons observé pour 7 cas. A chaque fois ils étaient constitués de plusieurs cellules regroupées en structures rondes à ovalaires. Cette organisation en embole pluricellulaire arrondi permettrait aux cellules de résister aux contraintes liées à la circulation dans les vaisseaux et de limiter la surface d'exposition avec l'environnement ce qui pourrait permettre à ces emboles d'échapper à l'immunité cellulaire. **[93]**

Aucun embole n'a été identifié sur les lames issues des deux cas ayant développé des métastases ganglionnaire mais cela n'est pas étonnant du fait de la faible probabilité que les coupes réalisées au sein de la tumeur passent justement au niveau d'un embole.

Il ressort de notre étude que la sensibilité de l'examen histologique basé sur le degré de différenciation cellulaire, sur l'index mitotique et sur l'identification d'emboles n'est pas très satisfaisante. Nous sommes conscients du fait que l'examen histologique se base souvent sur l'analyse d'une seule coupe bidimensionnelle d'une tumeur qui souvent mesure plusieurs centimètres ; cette analyse n'est donc pas représentative de la tumeur. D'autre part, l'analyse de plusieurs coupes d'une même tumeur représenterait un coût supplémentaire pour le propriétaire et n'est donc guère envisageable. D'autres études doivent donc être menées afin de trouver des paramètres plus fiables pour établir un pronostic.

C. Analyse immunohistochimique

Pour affiner le pronostic des analyses immunohistochimiques peuvent compléter les analyses histologiques de routine, comme c'est le cas avec l'évaluation de la localisation de l'expression intracellulaire du c-kit associée à l'évaluation de la prolifération cellulaire au moyen du Ki-67 lors de mastocytome chez le chien, ou avec l'évaluation des Cox-2 pour les carcinomes mammaires du chien.

Nous avons choisi d'étudier l'expression des trois marqueurs iummunohistochimiques qui sont impliqués dans la transition d'un phénotype bénin à un malin.

Nous avons considéré l'expression de ces trois marqueurs en fonction du degré de différenciation des cellules tumorales. Les zones bien et modérément différenciées ont tendance à bien exprimer les cytokératines et l'E-cadhérine et à très peu exprimer la vimentine. Les zones peu différenciées, au contraire, expriment moins les cytokératines, peu l'E-cadhérine et davantage la vimentine.

Dans différents articles **[61]** il est rapporté que l'acquisition d'un caractère invasif s'accompagne d'une modification du phénotype des cellules d'épithélial à mésenchymateux, comme ici l'acquisition de l'expression de la vimentine par des cellules d'origine épithéliale. Cette transition de phénotype permet aux cellules de s'affranchir de l'aspect cohésif des cellules épithéliales (E-cadhérine en cytoplasmique ou peu exprimée) et d'acquérir les capacités de motilité des cellules mésenchymateuses, pouvant ainsi envahir le tissu environnant, entrer dans les vaisseaux puis disséminer dans l'organisme.

Nos résultats confirment qu'une telle transition a bien lieu dans les carcinomes épidermoïdes digités canins et que sa survenue est corrélée au degré de différenciation des cellules : moins les cellules tumorales sont différenciées, moins elles expriment les marqueurs épithéliaux et plus elles expriment les marqueurs mésenchymateux. Ceci est conforté par l'expression plus importante de la vimentine dans les zones les plus infiltrantes des tumeurs, qui bien souvent sont peu différenciées.

L'observation de quelques cellules de phénotype mésenchymateux au sein des zones bien différenciées n'est pas un fait étonnant puisque les tumeurs sont composées de cellules pouvant présenter chacune des modifications génétiques qui leur sont propres. Si ces modifications ne sont pas incompatibles avec la survie cellulaire, elles vont s'accumuler et permettront l'évolution maligne des tumeurs. **[90,91]**

En ce qui concerne les emboles, nous avons observé qu'ils présentent un phénotype épithélial et non pas mésenchymateux. Il est reconnu que la TEM joue un rôle dans l'infiltration locale et l'envahissement vasculaire des tumeurs d'origine épithéliale, et les résultats de nos observations de l'expression de ces trois marqueurs au sein des emboles montrent qu'une fois entrées dans les vaisseaux les cellules embolisées subissent une nouvelle modification phénotypique, cette fois-ci d'un phénotype mésenchymateux à épithélial. Ce

phénotype épithélial permettrait aux cellules néoplasiques embolisées de former des agrégats cellulaires cohésifs décrits lors de l'analyse histologique.

L'objectif à long terme de cette étude est de rechercher des marqueurs aidant à l'établissement d'un pronostic. C'est pourquoi nous avons concentré nos analyses histologiques et immunohistochimiques uniquement sur les cas pour lesquels nous disposions d'un suivi. Malheureusement au cours de la réalisation de l'étude il s'est avéré que nous n'avons obtenu des renseignements que pour un nombre limité de cas, ce qui a pour conséquence la formation de groupes non homogènes. Nous avons alors tout de même effectué une analyse statistique de l'expression des trois marqueurs en fonction du devenir des animaux, tout en sachant que ces résultats seraient de faible intérêt. En effet notre étude ne révèle pas de corrélation entre le devenir des animaux et l'expression de ces marqueurs, sauf pour l'E-cadhérine. L'expression de cette dernière est corrélée à un mauvais pronostic. Toutefois la dispersion des cas ne permet pas d'en identifier la cause et encore moins de l'interpréter.

Toutefois il faut noter que nos lectures des immunomarquage de l'E-cadhérine sont sujettes à caution. Bien que divers protocoles aient été essayés pour mettre au point une méthode d'immunomarquage de l'E-cadhérine fiable et reproductive, le résultat de ce marquage semble aléatoire. En effet sur certaines lames le marquage n'était pas pris sur l'ensemble de la coupe. La peau saine présente sur les coupes a servi de témoin positif de la bonne réalisation du marquage, ainsi certaines lames montrant des zones de l'épiderme non marquées ont été considérées comme non valide et n'ont donc pas été analysées. Dans la mesure où les zones ne prenant pas le marquage pouvaient être très restreintes, il n'est pas certain que des lames au sein desquelles l'épiderme prenait bien le marquage ne présentaient pas des zones de marquages défectueux dans d'autres zones de la lame, notamment au sein de la tumeur. Par conséquent des doutes peuvent être émis quant-à l'estimation de l'immunoréactivité de ce marqueur. Toutefois des études portant sur l'expression de l'E-cadhérine ont déjà été menées chez le chien et de tels défauts dans les immunomarquages n'ont pas été décrits. **[94]** Il nous semble donc que ce problème n'est pas la conséquence d'un mauvais protocole d'immunomarquage mais qu'il s'agisse plutôt d'une interférence due à la méthode de préparation des échantillons tumoraux dont l'étape de décalcification.

PERSPECTIVES

Nous pourrions envisager d'étendre les analyses histologiques et immunohistochimiques menées dans cette étude à l'ensemble des 166 cas à notre disposition. De même, les démarches auprès des vétérinaires traitant pour obtenir le suivi des animaux pourraient être poursuivies afin de récolter des renseignements pour un plus grand nombre de cas et des durées de suivi toutes supérieures à 24 mois. Ainsi les nouvelles analyses réalisées sur l'étude de l'expression de ces trois marqueurs par rapport au pronostic seraient plus fiables. En outre des analyses comparatives en fonction des différents devenir pathologiques seraient alors envisageables si nous disposions d'un plus grand nombre de cas dans chacun des groupes considérés (multicentrique, récidive, métastase) Ces analyses immunohistochimiques pourraient également être complétées par l'analyse d'autres marqueurs immunohistochimiques tels que la N-cadhérine ou la β-caténine, et par des analyses moléculaires, mais alors de nouveaux échantillons tumoraux, frais ou congelés, devront être récoltés.

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de récolter 166 cas de carcinome épidermoïde digité canin correspondant à 172 tumeurs (atteinte digitée multiple, récidive). Ceci a rendu possible la réalisation d'une analyse épidémiologique d'assez grande envergure (une centaine de cas) ce qui a abouti à l'actualisation des données préexistantes et à l'obtention de données représentatives de la population canine française. En particulier nous avons identifié la race beauceron et la localisation à des membres antérieurs comme étant des critères épidémiologiques complétant ceux déjà connus et rapportés dans la littérature scientifique. Par ailleurs la prédominance des atteintes des membres antérieurs suggère que les facteurs traumatiques jouent un rôle important dans la cancérogenèse de ce type de tumeur.

A l'examen histologique la majorité des tumeurs présentaient, au sein du même échantillon, différents degrés de différenciation avec une prédominance globale des zones bien différenciées, sans une apparente corrélation avec le pronostic. Pour confirmer statistiquement nos observations, il serait nécessaire de compléter nos données avec un suivi plus long et plus homogène des animaux.

L'analyse immunohistochimique a permis de mettre en évidence dans les parties moins différenciées et infiltrantes des tumeurs une diminution de l'expression cytoplasmique des cytokératines et membranaire de la E-cadhérine ainsi que l'acquisition de l'expression cytoplasmique de la vimentine. Cela révèle le changement de phénotype des cellules tumorales d'un type épithélial à un type mésenchymateux.

Pour des études ultérieures de la TEM chez le chien, d'autres analyses immunohistochimiques ainsi que des études moléculaires sont souhaitables mais elles pourront n'être faites que sur du matériel non décalcifié et congelé.

Le Professeur responsable
VetAgro Sup campus vétérinaire

Le Directeur général
VetAgro Sup

Par délégation
Pr F. Grain - DEVE
VetAgro Sup
Campus Vétérinaire

Le Président de la thèse
Pr. Jacqueline TRAILLET

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 07 DEC. 2011

Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur F.N GILLY

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

Annexes

ANNEXE 1 : Fiche de renseignements clinico-pathologiques.

Fiche de renseignement clinique

- - - - - - - - - - - - - -Identification de l'animal - - - - - - - - - - - - -

Nom :…… Date de naissance :……..
Race :…… Robe :…….....
Sexe : mâle - femelle Stérilisation : Oui – Non
Poids :……

L'animal est-il décédé ? Oui – Non
Si oui, quelle est la date du décès :……...
Cause de la mort ou motif de l'euthanasie :…….…….

- - - - - - - - - - - Description clinique de la lésion - - - - - - - -

Date d'apparition :……..……
Motif de consultation :……..…..……
Localisation précise (doigt, membre)……...……
Couleur de la griffe :……..……
Aspect de la lésion :……
……..……

Examens complémentaires réalisés

Radiographie : Oui – Non
Si oui, quel en était le résultat :…….……

Cytologie : Oui – Non
Si oui, quel en était le résultat :…….……

Bilan d'extension :

Lors de l'examen clinique, le nœud lymphatique satellite présentait-il des anomalies ?
Oui – Non
Si oui, lesquelles ?.....

Une cytologie du nœud lymphatique satellite fut-elle réalisée ? Oui – Non
Si oui, quel en était le résultat ? ……
……

Traitement :

Quel fut le traitement réalisé ?.....

- - - - - - - - - - - - - - -Récidive - - - - - - - - - - - - -

.

S'il y a eu récidive, veuillez remplir la suite

Date d'apparition :……
Aspect de la lésion :……
……..……

Examens complémentaires réalisés

Radiographie : Oui – Non
Si oui, quel en était le résultat :…….……

Cytologie : Oui – Non
Si oui, quel en était le résultat :…….……

Biopsie pour analyse histologique : Oui –Non
Si oui, quel en était le résultat :……..……

Bilan d'extension :

Lors de l'examen clinique, le nœud lymphatique satellite présentait-il des anomalies ?
Oui – Non
Si oui, lesquelles ?.....

Une cytologie du nœud lymphatique satellite fut-elle réalisée ? Oui – Non
Si oui, quel en était le résultat ? ……..
……

Traitement :

Quel fut le traitement réalisé ?.....

- - - - - - - - - - - - - - -Autres localisations- - - - - - - - - - - - -

Si des lésions de même nature sont apparues sur d'autres doigts, je vous prierai de bien vouloir remplir un autre exemplaire de ce questionnaire.

ANNEXE 2 : Protocole de coloration à l'hémalun-éosine sur coupes tissulaires de prélèvements fixés au formol à 10% et inclus en paraffine.

PRODUITS UTILISES

- Alcool absolu Normapur, 2,5L, VWR (20821321)
- Ottix Shapper, 2,5L, Microm (02070078)
- Ottix, 5L, Microm (02070059)
- Hémalun en solution selon Meyer, Merck (1.09249.2500)
- Eau lithinée : carbonate de lithium saturée dans H2O
- Phloxine B, Réactifs RAL (361 47-7), dilué à 1%
- HCL concentré, Merck (4024829) , dilué à 0,5%

MODE OPERATOIRE

- Déparaffiner les lames : 3 bains d'Ottix successifs de 10 min
  1 bain d'Ottix Shapper, 2 min
  1 bain d'Alcool, 1 min
  2 rinçages à l'eau de 30 s
- Déshydrater : 1 bain d'Alcool, 5 min
- Colorer : 1 bain dans l'hémalun, 3 min
  1 bain dans l'eau, 1 min
  1 passage dans l'HCL,
  1 bain dans l'eau, 1 min
  1 passage dans l'eau lithinée
  1 bain dans l'eau, 1 min
  1 bain dans la phloxine, 5 min
- Rincer : Faire plusieurs lavages successifs (5) dans de l'eau du robinet jusqu'à ce que l'eau reste incolore
- Déshydrater : 1 passage dans l'Alcool
  1 bain d'Ottix Shapper, 30 s
  3 bains successifs dans l'Ottix, 5 min
- Monter les lames

ANNEXE 3 : Protocole de réalisation des immunomarquages.

ANTICORPS

Cytokératines : Monoclonal Mouse Anti-human Cytokeratin, Clone AE1/AE3, Dako
Vimentine : Monoclonal Mouse Anti-human Vimentin, Clone V9, DakoCytomation
E-cadhérine : Monoclonal Mouse Anti-human E-cadherin, Clone NCH-38, Dako

PRODUITS UTILISES

- Alcool absolu Normapur, 2,5L, VWR (20821321)
- Ottix Shapper, 2,5L, Microm (02070078)
- Ottix, 5L, Microm (02070059)
- Hémalun en solution selon Meyer, Merck (1.09249.2500)
- PBS : 1L de PBS (Dulbecco's Phophate Buffered Saline 10x) dans 9L d'eau distillée, Biowest (X0515-500)
- Tampon Citrate pH6.0 concentration 10X : 50 mL de tampon citrate dans 2L d'eau distillée, Diapath (T0050)
- Tampon pH9 Ready to use, 500mL, Dako
- Eau oxygénée 30 volumes, en 250 mL, LPG
- Diluant d'anticops : Primary antibody dilutinf buffer, Biomeda
- Kit Ultra-Tek
- Substrat en kit Vecto novared.

PREPARATION DES SOLUTIONS

Eau oxygénée : mettre 4mL d'eau oxygénée pour 10mL d'eau distillée
Tampon citrate : 1 bouteille de 100mL dans 12L d'eau distillée.
PBS : 2 bouteilles de 500mL dans 9L d'eau distillée
Anticorps à diluer à l'aide du diluant d'anticorps selon la concentration requise (1/50 pour l'AE1/AE3 et pour l'anticorps anti-vimentine, 1/100 pour l'anticorps anti-E-cadhérine)

MODE OPERATOIRE

- Mettre à chauffer le bain marie à 90°C. Ajouter les récipients contenant du tampon (citrate ou pH9 selon l'anticorps utilisé)
- Déparaffiner les lames : 3 bains d'Ottix de 10 min successifs
  1 bain d'Ottix Shapper ,5 min
  1 bain d'Alcool, 1 min
  2 rinçages à l'eau de 30 s
- Mettre les lames 10 min dans le PBS
- Mettre les portoirs dans la solution tampon adaptée (Tampon Citrate pour l'anticorps AE1/AE3 et l'anticorps anti-vimentine, Tampon pH9 pour l'anticorps anti-E-cadhérine) pendant 40 min à 90°C
- Sortir les récipients contenant les tampons et les portoirs du bain marie et laisser refroidir pendant 20 min
- Mettre les lames dans le PBS pendant 10 min

- Tracer au stylo Dako Pen des traits sur les lames pour limiter l'étalement du produit sur les lames de façon à ce que celui-ci se répartisse bien sur la coupe.
- Etaler les lames sur le porte lame et mettre 200µL d'eau oxygénée sur chaque lame, laisser pendant 10 min
- Oter l'eau oxygénée en le faisant couler et remettre les lames dans le PBS pendant 10 min
- Etales les lames sur le porte lame et mettre 200µL de sérum de blocage sur chaque lame pendant 30 min
- Oter le sérum de blocage en le faisant couler et reposer les lames sur le porte lame et mettre sur chaque lame 200µL de l'anticorps primaire, laisser pendant 1h. Pour les témoins négatifs laisser les lames dans le PBS pendant 1h.
- Oter l'anticorps primaire en le faisant couler et mettre les lames dans le PBS pendant 10 min
- Etaler les lames sur le porte lame et mettre 200µL d'anticorps secondaire sur chaque lame, laisser pendant 30 min
- Oter l'anticorps secondaire en le faisant couler et mettre les lames dans le PBS pendant 10 min
- Etaler les lames sur le porte lame et mettre 200µL de complex péroxydase sur chaque lame, laisser pendant 30 min
- Oter le complex en le faisant couler et mettre les lames dans le PBS pendant 10 min
- Préparer la solution novared (5 mL d'eau distillée, 3 gouttes du flacon 1, 2 gouttes du flacon 2, 2 gouttes du flacon 3 et 2 gouttes du flacon 4)
- Etaler les lames sur le porte lame, mettre 200µL de novared sur chaque lame, laisser 5 min
- Oter le novared en le faisant couler
- Faire deux lavages successifs de 2 min dans de l'eau du robinet
- Mettre le portoir dans l'hémalun pendant 1 min
- Faire plusieurs lavages successifs dans de l'eau du robinet jusqu'à ce que l'eau reste incolore
- Déshydrater : 1 passage dans l'Alcool
  1 bain d'Ottix Shaper, 30 s
  3 bains successifs dans l'Ottix, 5 min
- Monter les lames

ANNEXE 4 : Tableau récapitulatif des données de l'étude.

Cas	Différenciation	Mitoses	Cytokératines	E-cadhérine	Vimentine	Groupe	Durée de suivi (mois)	Commentaire
1	60	0,58	75	70	34**	Remission	19	
2	100	0,1	100	80	5	Remission	45	
3	50	1	33	20	25	Remission	36	
4	100	NR	66	NV	0	Remission	24	
5	95	0,5	62	72	9**	Remission	6	
6	99	2,54	66	70	0	Remission	22	
7	95	5	63	100*	0	Remission	25	
8	45	1,27	44	18	0	Remission	12	
9	100	1	66	95	2,5	Remission	34	décédé
10	100	0,5	66	80	2,5	Remission	11	
11	100	2,5	83	95	0	Remission	15	décédé
12	98	0,6	84	NV	5**	Remission	14	
13	72	5	33	NV	5	Remission	14	décédé
14	70	0	66	60*	1,5	Remission	13	
15	58	6	38	55*	2	Remission	13	
16	70	2	40	NV	0	Remission	13	
17	75	3,5	33	15*	6	Remission	12	
18	95	10	49	NV	0	Remission	11	
19	82	7	55	80	0	Remission	10	
20	88	0,5	82	65*	2,5**	Remission	10	
21	95	1	51	81	0	Remission	9	
22	68	2	44	50*	3**	Remission	9	
23	100	0	82	100	0	Remission	9	
24	80	1,83	50	66	6**	Remission	8	
25	90	4	45	64	NV	Remission	7	
26	95	1,5	62	59*	21	Remission	7	

27	90	1,25	63	91*	7	Multiple	11	1ère localisation
	90	0,2	64	90	10			2d localisation
28	100	1	66	100	0	Multiple	21	1ère localisation
	50	10	33	80	10**			2d localisation
29	70	1	85	82	22	Multiple	0,75	1ère localisation
	100	2	66	100	0			2d localisation
30	100	0,5	66	100	0	Multiple + Embole	14	1ère localisation
	98	2	80	98*	6**			2d localisation, embole
31	73	0,32	61	80	6	Multiple	29	2ème localisation
32	75	1,69	67	100*	0	Multiple	0,75	1ère localisation
33	80	1,8	59	82*	14**	Multiple	1	1ère localisation
	80	0,18	73	65	10**			2d localisation
34	0	6	33	98	60	Embole+Récidive	3	métastase ganglionnaire
35	100	1,07	77	91*	3,33**	Embole	2	
36	45	0	31	NV	7	Embole + Récidive	14	décédé***
37	70	NR	61	36	0	Embole+Récidive	13	décédé***, métastase ganglionnaire
38	100	2	100	100	0	Embole	7	
39	71	1,6	100	78*	1,25	Embole	4	
40	98	0	75	93	3**	Embole	3	
41	100	0,1	83	NV	0	Embole	1	
42	50	1,2	66	NV	1,25**	Récidive	8	
43	100	NR	83	0	0	Récidive	10	
44	44	0	41	26	8,125**	Récidive	10	décédé***
moyenne	80,8979592		62,6734694	72,8928571	5,40441176		12,73863636	
ecart-type	21,6527951		18,6674714	27,0836295	11,6739179		9,529999664	

NV = non valide
NR = non renseigné
*: présence de cellules à marquage cytoplasmique
**: présence de cellules intensivement positives
***: euthanasie en raison du carcinome épidermoïde

Références bibliographiques

[1] Wheater P.R., Yong B., Heath J.W. traduit de l'anglais par P. Validire, P. Validire-charpy (2001)
Histologie fonctionnelle. 4th Ed.
De Boeck Université, , Bruxelles, 413 p

[2] Suter M.M., Crameri F.M., Olivry T., Mueller E., Von Tscharner C., Jensen P.J. (1997)
Keratinocyte biology and pathology
Vet. Dermatol. 8, 67-100

[3] Mialot M. (1993)
Histologie de la peau normale
Encyclopédie vétérinaire – Dermatologie, Elsevier, Paris, 8p

[4] Monteiro-Riviere N.A. (1998)
Integument,
In Dellmann H.D., Eurell J., Textbook of veterinary histology, 5th Ed. Williams &Wilkins, Baltimore, 303-332

[5] Olivry T., Müller R.S., Walder E.J., Atlee B.A. (1993)
Anatomie et physiologie microscopiques de la peau
Encyclopédie vétérinaire – Dermatologie, Elsevier, Paris, 13p

[6] Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E. (2001)
Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 6th Ed.
WB Saunders company, Philadelphia, 1528p

[7] Lloyd D.H., Garthwaite G. (1982)
Epidermal structure and surface topography of canine skin
Res. Vet. Sci., 33: 99-104

[8] Kwochka K.W. (1993)
Overview of normal keratinization and cutaneous scaling disorders of dogs
In: Griffin C.E., Kwochka K.W., MacDonald J.M.: Current veterinary dermatology. The science and art of therapy, Mosby Year Book, St Louis, 176-190

[9] Hold D. (2004)
Physiopathologie de la kératinisation
In : Saura J-H., Grosshans E., Laugier P., Lachapelle J-M., Dermatologie et infections sexuellement transmissibles, 3ème Ed., Masson, Paris, 199-206

[10] Kimyai-Asadi A., Ming H.J., Freedberg I.M. (2003)
Epidermal cell kinetics, epidermal differentiation, and keratinization
In: Freedberg I.M., Eisen A.Z., Wolff K., Austen K.F., Goldsmith L.A., Katz S.S., Fitzpatrick's dermatology in general medicine, Vol 1, 6th Ed., MacGraw-Hill, New York, 89-98

[11] Frappier B.L. (1998)
Epithelium
In: Eurell J.A.: Textbook of veterinary histology, 5th Ed., Williams & Wilkins, Baltimore: 19-31

[12] Sandjeu Y., Haftek M. (2009)
Desmosealin and other components of the epidermal extracellular matrix;
J. Physiol. Pharmacol., 60, suppl 4: 23-30

[13] Bragulla H.H., Homberger D.G. (2009)
Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia
J. Anat., 214, 516-559.

[14] Zhang H., Labouessse M. (2010)
The making of hemidesmosome structures *in vivo*
Dev. Dyn., 239 (5): 1465-1476

[15] Hartsock A., Nelson W.J. (2008)
Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton
Biochim. Biophys. Acta, 1778, 660-669

[16] Mechthild H. (2007)
Plakophilins: multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion?
Biochim. Biophys. Acta, 1773: 69-77

[17] Niessen C.M. (2007)
Tight junctions/Adherens junctions: Basic structure and function
J. Invest. Dermatol., 127 (1), 2525-2532

[18] Chu D.H., Haake A.R., Holbrook K., Loomis C.A. (2003)
The structure and development of skin
In: Freedberg I.M., Eisen A.Z., Wolff K., Austen K.F., Goldsmith L.A., Katz S.S.: Fitzpatrick's Dermatology in general medicine, Vol I, 6th Ed., MacGraw-Hill, New York, 58-88

[19] Magnol J-P, Marchal T., Delisle F., Devauchelle P., Fournel C. (2001)
Cancérologie clinique du chien.
Pairault-Cassegrain 2001, Niort, 426p

[20] Gross T.L., Ihrke P.J., E Walder.J., Affolter V.K. (2005)
Skin diseases of the dog and cat. Clinical and histopathologic diagnosis 2d Ed.
Blackwell publishing, Oxford, 932p

[21] Withrow S.J., Vail D.M. (2007)
Withrow & MacEven's Small Animal Clinical Oncology, 4th Ed
Saunders Elsevier, St Louis, 846p

[22] Weiss E., Frese K. (1974)
Tumors of the skin
Bull. World Health Organ., 50 (1-2): 79-100

[23] Marino D.J., Matthiesen D.T., Stefanacci J.D., Moroff S.D. (1995)
Evaluation of dogs with digit masses: 117 cases (1981-1991)
J. Am. Vet. Med. Assoc., 207 (6): 726-728

[24] Wobeser B.K., Kidney B.A., Powers B.E., Withrow S.J., Mayer M.N., Spinato M.T., Allen A.L. (2007)
Diagnoses and clinical outcomes associated with surgically amputated anine digits submitted to multiple veterinary diagnostic laboratories
Vet. Pathol., 44: 355-361

[25] O'Brien M.G., Berg J., Engler S.J. (1992)
Treatment by digital amputation of subungual squamous cell carcinoma in dogs: 21 cases (1987-1988)
J. Am. Vet. Med. Assoc., 201 (5): 759-761

[26] Henry C.J. et al (2005)
Canine digital tumors: a veterinary cooperative oncology group retrospective study of 64 dogs
J. Vet. Intern. Med., 19: 720-724

[27] Goldschmidt M.H., Shofer F.S. (1992)
Skin tumors of the dog and cat
Pergamon Press, New York, 316p

[28] Goldschmidt M.H., Hendrick M.I. (2002)
Tumors of the skin and soft tissues
In: Meuten D.J.: Tumors in domestics animals 4th Ed., Blackwell publishing company, Iowa, 45-119p

[29] Madewell B.R., Pool R.R., Theilen G.H., Brewer W.G. (1982)
Multiple subungual squamous cell carcinomas in five dogs.
J Am Vest Med Assoc., 180 (7): 731-735

[30] Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E. (2001)
Muller and Kirk's small animal dermatology, 6th Ed
WB Saunders Co, Philadelphia, 1528 p

[31] Er J.C., Sutton R.H. (1989)
A survey of skin neoplasms in dogs from the Brisbane region
Aust. Vet. J., 66 (7): 225-227

[32] Gourley I.M., Madewell B.R., Barr B., Ettinger S.J. (1982)
Burns car malignancy in a dog
J. Am. Vet. Med. Assoc., 180 (9): 1095-1097

[33] Alam M., Caldwell J.B., Eliezri Y.D. (2003)
Human papillomavirus-associated digital squamous cell carcinoma: literature review and report of 21 new cases.
J. Am. Acad. Dermatol., 48: 385-393

[34] Teifke J.P., Löhr C.V., Shirasawa H. (1998)
Detection of canine oral papillomavirus DNA in canine oral squamous cell carcinomas and p53 overexpressing skin papillomas of the dog using the polymerase chain reaction and non-radioactive *in situ* hybridization
Vet. Microbiol., 30 : 119-130

[35] O'Rourke M. (1985)
Multiple digital squamous cell carcinoma in 2 dogs.
Mod. Vet. Pract.; 66: 644-645

[36] Liu S.K., Hahn R.B. (1968)
Squamous cell carcinoma of the digit of the dog.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 153: 411-424

[37] Guerin S.R., Jones B.R., Alley M.R., Broome C. (1998)
Multiple digital tumours in a Rottweiler.
J. Small Anim Pract., 39, 200-202

[38] Meleo K.A. (1997)
Tumors of the skin and associated structures
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract., 27 (1): 73-94

[39] Paradis M., Scott D.W., Breton L. (1989)
Squamous cell carcinoma of the nail bed in three related giant schnauzers.
Vet. Rec. 125 (12): 322,324

[40] Himsel C.A., Richardson R.C., Craig J.A. (1981)
Cisplatin chemotherapy for metastatic squamous cell carcinoma in 2 dogs
J. *Am. Vet. Med. Assoc.*, 17: 1026-1034

[41] Fournel-Fleury C., Magnol J-P, Guelfi J-F (1994)
Color atlas of cancer cytology of the dog and cat.
Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, Paris

[42] Garma-Aviña A. (1994)
The cytology of squamous cell carcinomas in domestic animals
J. Vet. Diagn. Invest., 6: 238-246.

[43] Withrow S.J., MacEwen E.G. (2001)
Small animal clinical oncology, 3rd Ed.
WB Saunders Company, Philadelphie, 718p

[44] Kealy J.K., McAllister H. (2005)
Diagnostic radiology and ultrasonography of the dog and cat
Elsevier Inc., New York, 512p

[45] Cowell R.L., Tyler R.D., Meinkoth J.H., DeNicola D.B. (2008)
Diagnostic cytology and hematology of the dog ant cat, 3rd Ed.
Mosby Elsevier, St Louis, 338p

[46] Tilley L.P., Smith F.W.K. (2008)
Blackwell's five minute veterinary consult: canine and feline, 4th Ed.
Blackwell publishing professional, Ames, 1578p

[47] Thrall D.E. (2007)
Textbook of veterinary diagnostic radiology, 5th Ed.
Saunders Elsevier, St Louis, 832p

[48] Schwarz L.A., Tidwell A.S. (1999)
Alternative imaging of the lung
Clin. Tech. Small Anim. Pract., 14 (4): 187-206

[49] Nemanic S., London C.A., Wisner E.R. (2006)
Comparison of thoracic radiographs and single breath-hold helical CT for detection of pulmonary nodules in dogs with metastatic neoplasia
J. *Vet. Inter. Med.*, 20: 508-515

[50] Nelson R.W., Couto C.G. (2009)
Small animal internal medicine, 4th Ed.
Mosby Elsevier, St Louis, 1466p

[51] Laseelles B.D.X., Parry A.T., Stidworthy M.F., Dobson J.M., White R.A.S. (2000)
Squamous cell carcinoma of the nasal planum in 17 dogs
Vet. Rec., 147, 473-476

[52] Byers J.C., Fleishman R.W. (1984)
Canine digital neoplasia
Canine practice, 11 (3): 25-33

[53] Schmidt B.R., Glickman N.W., DeNicolas D.B., de Gortari A.E., Knapp D.W. (2001)
Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 218 (11): 1783-1786

[54] Harari P.M. (2004)
Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology
Endocr. Relat. Cancer , 11: 689-708

[55] Jones H.E., Gee J.M.W., Taylor K.M., Barrow D., Williams H.D., Rubini M., Nocholson R.I. (2005)
Development of strategies for the use of anti-growth factor treatments
Endocr. Relat. Cancer , 12: 173-185

[56] Micalizzi D.S., Farabaugh S.M., Ford H.L. (2010)
Epithelial-mesenchymal transition in cancer : Parallels between normal development and tumor progression
J; Mammary Gland Biol Neoplasia , 15: 117-134

[57] Shook D., Keller R. (2003)
Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development
Mech Dev, 120: 1351-1383

[58] Hay E.D. (2005)
The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it
Dev. Dyn, 233: 706-720

[59] Kalluri R. (2009)
EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells
J. Clin. Invest, 119: 1417-1419

[60] Nakamura M., Tokura Y. (2011)
Epithelial-mesenchymal transition in the skin
J Dermatol Sci., 61: 7-13

[61] Kang Y., Massagué J. (2004)
Epithelial-mesenchymal transitions: Twist in development and ùmetastasis
Cell, 118, 277-279

[62] Zeisberg M., Neilson E.G. (2009)
Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions
J. Clin. Invest, 119: 1429-1437

[63] Kalluri R., Weinberg R.A. (2009)
The basics of epithelial-mesenchymal transition
J. Clin. Invest., 119: 1420-1428

[64] Baum B., Settleman J., Quinlan M.P. (2008)
Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease
Cell and Developmental Biology, 19: 294-308

[65] Wheelock M.J., Shintani Y., Maeda M., Fukumoto Y., Johnson K.R. (2008)
Cadherin switching
J Cell Sci, 121: 727-735

[66] Christofori G. (2006)
New signals from the invasive front
Nature, 441: 444-450

[67] Acloque G., Thiery J-P., Nieto M.A. (2008)
The physiology and pathology of the EMT
EMBO reports, 9 (4): 322-326

[68] Panorchan P., Thompson M.S., Davis K.J., Tseng Y., Konstantopoulos K., Wirts D. (2006)
Single-molecule analysis of cadhérine-mediated cell-cell adhesion
J. Cell Sci, 119: 66-74

[69] Iwatsuki M., Mimori, K. Yokobori T., Ishi H., Beppu T., Nakamori S., Baba H., Mori M. (2010)
Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance
Cancer Sci., 101 (2): 293-299

[70] Moreno-Bueno G., Cubillo E., Sarrio D. et al (2006)
Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug ant E47 factors in Epithelial-Mesenchymal Transition
Cancer Res., 66: 9543-9546

[71] Comijn J., Berx G., Vermassen P., Verschueren K., van Grunsven L, Bruyneel E., Mareel M., Huylebroeck D., van Roy F. (2001)
The two-handed E-box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion
Moll. Cell, 7 (6): 1267-1278

[72] Bolos V., Peinado H., Perez-Moreno M.A., Fraga M.F., Esteller M., Cano A. (2003)
The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions; a comparison with Snail and E47 repressors
J. Cell Sci, 116: 499-511

[73] Hajra K.M., Chen D.Y-S., Fearon E.R. (2002)
The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer
Cancer Res., 62: 1613-1318

[74] Thiery J-P. (2003)
Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies
Curr. Opinion in Cell Biol., 15: 740-746

[75] Savagner P. (2010)
The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon
Ann Oncol , 21, suppl. 7: vii89-vii92, doi: 10.1093/annonc/mdq 292

[76] Blanco M.J., Moreno-Bueno G., Sarrio D., Locascio A., Cano A., Palacios J., Nieto M.A. (2002)
Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas
Oncogene, 21: 3241-3246

[77] Christofori G. (2010)
Snail1 links transcriptional contol with epigenetic regulation
EMBO J. , 29 (11): 1787-1789

[78] Peinado H., Iglesias-de la Cruz MdC, Olmeda D., Csiszar K., Fong K.S.K., Vega S., Nieto M.A., Cano A., Portillo F. (2005)
A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in Snail regulation and tumor progression
EMBO J., 24 : 3446-3458

[79] Hou Z., Peng H., K. Ayyanathan., Yan K-P., Langer E.M., Longmore G.D., Rauscher III F.J. (2008)
The LIM protein AJUBA recruits protein arginin methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression
Mol. Cell Biol., 28 (10): 3198-3207

[80] Yang J., Mani S.A., Donaher J.L., Rarnaswormi S., Itzykson R.A., Gitelman I., Richardson A., Weinberg R.A. (2004)
Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Play an Essential Role in Tumor Metastasis
Cell, 117: 927-939

[81] Seher T.C., Narasimha M., Vogelsang E., Leptin M. (2007)
Analysis and reconstitution of the genetic cascade controlling early mesoderm morphogenesis in the Drosophila embryo
Mech Dev, 124 : 167-179

[82] Vandewalle C., Comijn J., De Craene B., Vermassen P., Bruyneel E., Andersen H., Tulchinsky E., Van Roy F., Berx G. (2005)
SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions
Nucl. Acids Res., 33 (20): 6566-6678

[83] Hayden M.S., Ghosh S. (2004)
Signalling to NF-κB
Genes Dev., 18: 2191-2224

[84] Moustakas A., Heldin C-H. (2007)
Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression
Cancer Sci., 98 (10): 1512-1520

[85] Masssagué J., Seoane J., Watton D. (2005)
Smad transcription factors
Genes Dev., 19: 2783-2810

[86] Shi Y., Massagué J. (2003)
Mechanisms of TGF-β signalling from cell membrane to the nucleus
Cell, 11: 685-700

[87] Moustakas A., Souchenytskyi S., Heldin C-H. (2001)
Smad regulation in TGF-β signal transduction
J. Cell Sci., 114: 4359-4369

[88] Moustakas A., Helsin C-H. (2005)
Non-Smad TGF-β signal
J. Cell Sci., 118: 3573-3584

[89] Willert K., Jones K.A. (2006)
Wnt signaling: is the party in the nucleus?
Genes Dev., 20: 1394-1404

[90] Stricker T.P., Kumar V. (2010)
Neoplasia
In: Kumar V., Abbas A. K., Fausto N., Aster J.S.: Robbins and Cotran, Pathologic basis of disease, 8th Ed., Saunders Elsevier, Philadelphie: 259-330

[91] Hanahan D., Weinberg R.A. (2000)
The hallmarks of cancer
Cell, 100: 57-70

[92] Thompson K.G., Pool R.R (2002)
Tumors of the bones
In: Meuten D.J.: Tumors in domestics animals 4th Ed., Blackwell publishing company, Iowa, 245-319

[93] Geiger T.R., Peeper D.S. (2009)
Metastasis mechanisms.
Bioch. Biophys. Acta, 1796: 293-308

[94] Nowak M., Madej J.A., Dziegiel P. (2007)
Expression of E-cadherin, β-catenin and Ki-67 antigen and their reciprocal relationship in mammary adenocarcinomas in bitches
Folia Histochemica et Cytobiologica, 45, (3): 233-238

NOM PRENOM : **BRISEBARD ELISE**

TITRE : ETUDE PRELIMINAIRE SUR L'EXPRESSION DES CYTOKERATINES, DE L'E-CADHERINE ET DE LA VIMENTINE AU SEIN DES CARCINOMES EPIDERMOIDES DIGITES EN ESPECE CANINE

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, *21 décembre 2011*

RESUME :

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus cellulaire mis en jeu dans la cancérogenèse des tumeurs d'origine épithéliale, facilitant l'évolution d'une tumeur bénigne en une tumeur maligne.

Après quelques rappels sur l'épiderme et les carcinomes épidermoïdes digités canins, un état des lieux des connaissances actuelles sur la transition épithélio-mésenchymateuse est présenté dans une première partie bibliographique.

La seconde partie de cette thèse est le compte-rendu d'une étude expérimentale ayant pour but d'actualiser les données épidémiologiques du carcinome épidermoïde digité canin et de caractériser l'histologie de ces tumeurs ainsi que leur expression de trois marqueurs immunohistochimiques (cytokératines, E-cadhérine, vimentine).

MOTS CLES :

- Chien
- Histochimie
- Epithélioma spinocellulaire
- Cancérogenèse

JURY :

Président :	Madame le Professeur Jacqueline TROUILLAS
1er Assesseur :	Madame le Docteur Vétérinaire Sara BELLUCO
2ème Assesseur :	Madame le Docteur Vétérinaire Frédérique PONCE

DATE DE SOUTENANCE : 21 DECEMBRE 2011

ADRESSE DE L'AUTEUR :

Le Bief Montagnon…….
25690 LONGEMAISON…….