VETAGRO SUP CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2019 - Thèse n° 043

CARACTÉRISATION DE L'INFILTRAT IMMUNITAIRE AU SEIN DE L'HISTIOCYTOME CUTANÉ CANIN

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie) et soutenue publiquement le 4 octobre 2019 pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

SAPIN Pierrick





VETAGRO SUP CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2019 - Thèse n° 043

CARACTÉRISATION DE L'INFILTRAT IMMUNITAIRE AU SEIN DE L'HISTIOCYTOME CUTANÉ CANIN

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I (Médecine - Pharmacie) et soutenue publiquement le 4 octobre 2019 pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

SAPIN Pierrick





Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (01-06-2019)

ABITBOL ALVES-DE-OLIVEIRA ARCANGIOLI AYRAL BECKER BELLUCO BENAMOU-SMITH BENOIT BFRNY BONNET-GARIN BOULOCHER BOURDOISEAU BOURGOIN BRUYERE BUFF BURONFOSSE CACHON CADORÉ CALLAIT-CARDINAL CAROZZO CHABANNE CHALVET-MONFRAY DE BOYER DES ROCHES DELIGNETTE-MULLER DEMONT DJELOUADJI ESCRIOU FRIKHA GALIA GILOT-FROMONT GONTHIER GRANCHER GRE7FI HUGONNARD JANKOWIAK JOSSON-SCHRAMME JUNOT KODJO KRAFFT LAABERKI I AMBERT LE GRAND LEBLOND LEDOUX LEFEBVRE LEFRANC-POHL LEGROS LEPAGE LOUZIER MARCHAL MOISSONNIER MOUNIER PEPIN PIN PONCE PORTIER POUZOT-NEVORET PROUILLAC REMY RENE MARTELLET ROGER SABATIER SAWAYA SCHRAMME SERGENTET THIEBAULT THOMAS-CANCIAN TORTEREAU VIGUIER VIRIEUX-WATRELOT ZENNER

Marie Laurent Marie-Anne Florence Claire Sara Agnès Etienne Philippe Jeanne-Marie Caroline Gilles Gilles Pierre Samuel Thierry Thibaut lean-Luc Marie-Pierre Claude Luc Karine Alice Marie-Laure Pierre Zorée Catherine Mohamed-Ridha Wessam Emmanuelle Alain Denis Delphine Marine Bernard Anne Stéphane Angeli Fmilie Maria-Halima Véronique Dominique Agnès Dorothée Sébastien Anne-Cécile Vincent Olivier Vanessa Thierry Pierre Luc Michel Didier Frédérique Karine Céline Caroline Denise Magalie Thierry Philippe Serge Michael Delphine Jean-Jacques Aurélie Antonin Eric Dorothée

Lionel

DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-ELEVAGE-SPV DEPT-BASIC-SCIENCES DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-AC-LOISIR-SPORT DEPT-ELEVAGE-SPV

Professeur Maître de conférences Professeur Maître de conférences Maître de conférences Maître de conférences Maître de conférences Professeur Professeur Professeur Maître de conférences Professeur Maître de conférences Maître de conférences Maître de conférences Professeur Maître de conférences Professeur Maître de conférences Maître de conférences Professeur Professeur Maître de conférences Professeur Professeur Maître de conférences Maître de conférences Maître de conférences Maître de conférences Professeur Maître de conférences Professeur Maître de conférences Maître de conférences Maître de conférences Professeur Professeur Maître de conférences Maître de conférences Maître de conférences Maître de conférences Professeur Professeur Professeur Professeur Professeur Professeur Professeur Professeur Professeur Maître de conférences Maître de conférences Professeur Maître de conférences Professeur Professeur Maître de conférences Professeur Professeur Maître de conférences Maître de conférences Maître de conférences Professeur Maître de conférences Professeur

Remerciements au jury

A Monsieur le Professeur Jean-Yves BLAY

De l'Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de médecine de Lyon Sud

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse et pour sa grande disponibilité

Mes hommages respectueux

A Madame le Docteur Sara BELLUCO

Maitre de Conférences à VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon

Pour m'avoir proposé ce sujet passionnant, pour son soutien sans faille tout au long de la progression de ce travail et ses conseils avisés

Mes remerciements les plus chaleureux

A Monsieur le Professeur Thierry MARCHAL

Professeur à VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon

Pour avoir accepté de composer ce jury de thèse et de considérer mon travail

Mes sincères remerciements

Table des matières

Table des annexes	15
Table des figures	17
Table des tableaux	23
Table des abréviations	25
Introduction	27
Partie I : Rappels sur la notion d'histiocyte, étude bibliographique de la physiopathologie tumorale de l'histiocytome cutané canin	et 29
I. L'histiocyte, cellule centrale du système immunitaire	29
A. Historique et définition	29
B. Ontogénèse de la lignée histiocytaire	30
1. Une origine myéloïde commune	30
2. Voies de différenciation des histiocytes et des cellules dendritiques plasmacytoïdes	31
a. Différentiation des monocytes	32
b. Différentiation des macrophages	32
c. Différenciation des cellules dendritiques	32
i. Cellules dendritiques plasmacytoïdes	33
ii. Cellules de Langerhans	33
iii. Cellules dendritiques folliculaires et interdigitées	33
iv. Cellules dendritiques conventionnelles	34
C. Répartition des histiocytes au sein de l'organisme	34
D. Caractéristiques morphologiques et phénotypiques des histiocytes	36
1. Morphologie et ultrastructure	36
a. Monocytes	36
b. Macrophages	36
c. Cellules dendritiques	37
2. Enzymologie, histochimie et immunohistochimie	39
3. Immunophénotypage	39
a. Monocytes et macrophages	44
b. Cellules dendritiques	45
E. Caractéristiques fonctionnelles des histiocytes	45
1. Monocytes et macrophages	45
a. Reconnaissance des signaux cellulaires et activation des macrophages	47
b. Régulation de l'inflammation et orientation de la réponse immunitaire	47
c. Phagocytose des particules et agents pathogènes	48
d. Présentation de l'antigène et activation de la réponse immunitaire adaptative	50

2. Cellules dendritiques	50
a. Cellules sentinelles et captation de l'antigène	51
b. Modification, présentation de l'antigène et activation de la réponse immunitaire	
adaptative	52
c. Régulation de la réponse immunitaire	56
d. Immunité et tolérance	58
F. Classification des désordres histiocytaires au sein de l'espèce canine	58
II. Physiopathologie tumorale et interactions avec le système immunitaire	60
A. Modalités de la réponse immunitaire anti-tumorale	60
1. Immunosurveillance: déclenchement et orientation de la réponse anti-tumorale	61
2. Une immunité anti-tumorale principalement d'origine cellulaire	62
a. Rôles de l'immunité innée	62
b. Rôles de l'immunité adaptative	66
i. Immunité à médiation humorale	66
ii. Immunité à médiation cellulaire	66
B. Echappement des cellules tumorales face à la réponse immunitaire	69
C. Place de l'inflammation au sein des processus néoplasiques	70
1. Inflammation et initiation tumorale	71
2. Inflammation et promotion tumorale	72
a. Cellules inflammatoires à rôle pro-tumoral	72
b. Influence du microenvironnement et de la balance en cytokines	78
3. Inflammation et dissémination tumorale	80
III. L'histiocytome cutané canin	81
A. Historique et définition	81
B. Ethiopathogénie et étude clinique	82
1. Ethiopathogénie	82
2. Etude clinique	84
C. Epidémiologie	86
D. Examens complémentaires et diagnostic de certitude	86
1. Etude cytologique	87
2. Etude histologique	87
3. Etude immunophénotypique : diagnostic de certitude	92
E. Diagnostic différentiel	94
F. Prise en charge et traitement	97
G. Pronostic et récidive	97
Partie II : Caractérisation de l'infiltrat immunitaire au sein de l'histiocytome cutané canin	99

١.	Сс	ontexte scientifique et objectifs de l'étude	
II.	Μ	1atériel et méthode	100
A	•	Sélection des cas	100
В		Réalisation des marquages immunohistochimiques	101
	1.	. Protocole de réalisation des marquages immunohistochimiques	101
	2.	. Choix des anticorps employés	102
	3.	. Témoins positifs et négatifs	104
C		Critères d'évaluation histologique	105
	1.	. Evaluation des marqueurs histologiques	105
	2.	. Groupage des échantillons d'HCC	105
D	•	Critères d'évaluation des marquages immunohistochimiques	106
	1.	. Immunomarquage de l'Iba-1	106
	2.	. Immunomarquage de CD3 ε et Pax-5	107
	3.	. Immunomarquage de CD204	107
	4.	. Immunomarquage de DC-LAMP	109
	5.	. Immunomarquage de CD206	110
	6.	. Immunomarquage de FoxP3	111
E.		Méthode de lecture et analyse statistique	112
	1.	. Lecture des lames	112
	2.	. Traitement des données et analyse statistique	112
III.		Résultats	114
Α	•	Population étudiée : analyse épidémiologique	114
	1.	. Descriptif de la population	114
	2.	. Sexe	114
	3.	. Age	115
	4.	. Race	115
В		Analyse histologique	116
	1.	. Effectifs des groupes d'HCC	116
	2.	. Analyse des marqueurs histologiques	121
		a. Morphologie des cellules tumorales	121
		b. Comptage mitotique	123
		c. Ulcération	124
		d. Infiltrats intraépidermiques	125
		e. Foyers et plages de nécrose	126
C		Analyse des marquages immunohistochimiques	127
	1.	. Analyse des témoins positifs et négatifs	127

2.		Analyse des immunomarquages	. 128
	a.	Iba-1	. 128
	b.	CD3 ε	. 129
	C.	Pax-5	. 132
	d.	CD204	. 135
	e.	DC-LAMP	. 138
	f.	CD206	. 140
	g.	FoxP3	. 142
D.	Ar	alyse des corrélations	. 145
1.		Paramètres épidémiologiques et marquages immunohistochimiques	. 145
2.		Paramètres histologiques et marquages immunohistochimiques	. 145
3.		Corrélations entre immunomarquages	. 145
	a.	CD3 ε	. 145
	b.	Pax-5	. 146
	c.	CD204	. 146
	d.	DC-LAMP	. 146
	e.	CD206	. 146
	f.	FoxP3	. 147
E.	Со	nclusion sur les résultats	. 147
IV.	Со	mparaison avec les données de la littérature	. 148
Α.	Ра	ramètres épidémiologiques	. 148
В.	Gr	oupes d'HCC	. 149
C.	Ра	ramètres histologiques	. 150
1.		Morphologie des cellules tumorales	. 150
2.		Comptage mitotique	. 151
3.		Ulcération	. 152
4.		Infiltrats intraépidermiques	. 152
5.		Foyers et plages de nécrose	. 153
D.	M	arquages immunohistochimiques	. 155
1.		lba-1	. 155
2.		CD3 ε	. 155
3.		Pax-5	. 156
4.		CD204	. 157
5.		DC-LAMP	. 159
6.		CD206	. 160
7.		FoxP3	. 161

V. Etude critique	162
A. Analyse du matériel et de la méthode	162
1. Sélection des cas	162
2. Réalisation des marquages immunohistochimiques	163
a. Choix des anticorps primaires employés	163
b. Réalisation des contrôles positifs et négatifs	165
3. Critères d'évaluations histologiques	165
4. Critères d'évaluation des immunomarquages	166
5. Obtention et exploitation des résultats	167
B. Limites de l'étude	168
1. Matériel et méthode	168
2. Résultats et interprétation	169
VI. Recherches complémentaires et perspectives futures	170
Conclusion	173
Bibliographie	175
Annexes	191

Table des annexes

Annexe 1 : Tableau des principales tumeurs cutanées et désordres histiocytaires inclus dans le diagnostic différentiel clinique, cytologique et histologique de l'histiocytome cutané canin
Annexe 2 : Protocole de réalisation des immunomarquages et consommables associés 194
Annexe 3 : Tableaux de résultats des analyses de corrélations entre paramètres histologiques et immunomarquages
Annexe 4 : Tableaux de résultats des analyses de corrélations entre immunomarquages 201
Annexe 5 : Données épidémiologiques relatives aux cas d'HCC sélectionnés
Annexe 6 : Données associées à l'évaluation des paramètres histologiques : comptage mitotique, présence d'ulcération, d'infiltrats intraépidermiques et de zones de nécrose
Annexe 7 : Données associées à l'évaluation des immunomarquages Iba-1, CD3 ε, Pax-5, CD204, DC-LAMP, CD206 et FoxP3

Table des figures

Figure 1 : Schéma des différentes populations cellulaires de la lignée histiocytaire, ontogénèse simplifiée des cellules issues des cellules souches hématopoïétiques
Figure 2 : Schéma de l'ontogénèse des macrophages et des cellules dendritiques chez le chien, voies de différenciation et immunophénotypes associés
Figure 3 : A gauche : monocytes sanguins canins. A droite : observation de l'ultrastructure d'un monocyte canin au microscope électronique
Figure 4 : A gauche : macrophages canins. A droite : observation de l'ultrastructure d'un macrophage canin au microscope électronique
Figure 5 : A gauche : observation de cellules de Langerhans canines au sein de l'épithélium buccal, immunomarquage CD18. Notez les dendrites caractéristiques de ces cellules épidermiques, qui s'immiscent entre les kératinocytes adjacents, Gx400. A droite : observation de l'ultrastructure d'une cellule de Langerhans canine au microscope électronique
Figure 6 : A gauche : granules de Birbeck, cytoplasme de cellule de Langerhans humaine, microscopie électronique. Ces organites longilignes et renflés sont caractéristiques de ce type cellulaire. A droite : flèche noire : organites similaires aux granules de Birbeck, cytoplasme de cellule de Langerhans canine, microscopie électronique
Figure 7 : Schéma présentant les différentes voies de maturation des macrophages, stimuli et cytokines associés
Figure 8 : Schéma des principales cytokines sécrétées par les macrophages, cibles et fonctions 48
Figure 9 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la phagocytose par les macrophages 49
Figure 10 : Processus de maturation des cellules dendritiques. Le degré de maturité des cellules dendritiques les spécialise dans une fonction particulière, du captage de l'antigène à sa présentation
Figure 11 : Processus de présentation d'un antigène exogène via le CMH II
Figure 12 : Processus de présentation d'un antigène endogène via le CMH I 54

Figure 13 : Modalités de présentation de l'antigène aux lymphocytes T selon son origine : à gauche, antigène exogène présenté lié au CMH II, à droite antigène endogène présenté lié au CMH I 56
Figure 14 : Voies de polarisation des LT CD4 ⁺ et cytokines inductrices. Les facteurs de transcription activés pour chaque type de maturation sont spécifiés, ainsi que les cytokines sécrétées par les LT effecteurs et leur mode d'action principal au sein de la réponse immunitaire
Figure 15 : Cytotoxicité des LT CD8 ⁺ : voie des granzymes et des perforines
Figure 16 : Equilibre entre immunosurveillance et inflammation pro-tumorale au sein du microenvironnement tumoral
Figure 17 : Les TAM M2, des cellules inflammatoires à rôle pro-tumoral : promotion de la croissance tumorale, de l'angiogenèse et de la dissémination tumorale
Figure 18 : Rôle immunosuppresseur des LT TReg au sein du microenvironnement tumoral
Figure 19 : Inflammation et processus néoplasique : initiation et promotion tumorale par les cellules inflammatoires, place clé des cytokines
Figure 20 : Lésions cutanées multiples chez un chiot femelle Teckel de 8 mois atteint d'une histiocytose cutanée langerhansienne canine
Figure 21 : Lésion d'histiocytome cutané au niveau de l'épaule d'un chien croisé Bull Terrier de 6 ans et demi
Figure 22 : Lésion d'histiocytome cutané au niveau de la face d'un Bouledogue français de 4 ans. Notez la localisation préférentielle (face) et l'aspect ulcéré de la lésion
Figure 23 : Examen cytologique des cellules tumorales de l'histiocytome cutané canin
Figure 24 : Envahissement du derme par des plages d'histiocytes tumoraux. Notez la présence de cellules tumorales de la jonction dermoépidermique jusqu'au pannicule du derme profond ; coloration hématoxyline-éosine, Gx50
Figure 25 : Infiltrats intraépidermiques d'histiocytes tumoraux (flèche rouge). Notez la déformation de la membrane basale de l'épiderme par les cellules tumorales (flèche noire) ; coloration hématoxyline-éosine, Gx400
Figure 26 : Plage d'histiocytes tumoraux, avec présence de nombreuses figures de mitose (flèches noires) ; coloration hématoxyline-éosine, Gx40090

Figure 27 : Zone d'ulcération superficielle d'une lésion d'histiocytome cutané canin ; coloration hématoxyline-éosine, Gx200
Figure 28 : Evolution de l'infiltration lymphocytaire au sein de l'histiocytome cutané canin. A gauche, un nodule d'infiltration lymphocytaire (flèche noire) commence à se mettre en place au sein d'une plage de cellules tumorales ; coloration hématoxyline-éosine, Gx50. A droite, une lésion d'HCC en régression, toute la tumeur est infiltrée par des lymphocytes ; coloration hématoxyline- éosine, Gx100
Figure 29 : Foyer de nécrose riche en débris cellulaires inclu au sein d'une large plage de cellules tumorales ; coloration hématoxyline-éosine, Gx20092
Figure 30 : Régression spontanée (cercle rouge) de la lésion d'histiocytome cutané localisée au niveau de la face chez ce même Bouledogue français de 4 ans. Quatre semaines se sont écoulées entre la photo de la Figure 22 et la prise de celle-ci
Figure 31 : Localisation des zones d'évaluation péri-tumorale et intra-tumorale des marquages CD204, DC-LAMP, CD206 et FoxP3 ; coloration hématoxyline-éosine, Gx50
Figure 32 : Boxplot de la répartition des âges en mois des 32 chiens inclus dans l'étude 115
Figure 33 : Diagramme de répartition des races au sein de la population étudiée (n=32) 116
Figure 34 : Cas classifié groupe 1 : infiltrat lymphocytaire absent à minimal, localisé en périphérie de la masse tumorale ; coloration hématoxyline-éosine, Gx50
Figure 35 : Cas classifié groupe 2 : infiltrat lymphocytaire modéré, d'organisation nodulaire et localisé en périphérie de la masse tumorale (flèche noire) ; coloration hématoxyline-éosine, Gx50 118
Figure 36 : Cas classifié groupe 3 : infiltrat lymphocytaire marqué, organisé en nodules localisés en périphérie et au sein de la masse tumorale (flèches noires). Notez la présence des zones nécrotiques au centre des foyers lymphocytaires (flèche rouge) ; coloration hématoxyline-éosine, Gx50
Figure 37 : Cas classifié groupe 4 : infiltrat lymphocytaire massif, la densité des cellules lymphocytaires est supérieure à celle des cellules tumorales. L'infiltrat est diffusément nodulaire au sein de toute la masse tumorale ; coloration hématoxyline-éosine, Gx50
Figure 38 : Plage de cellules tumorales chez un cas d'HCC du groupe 1. Notez la présence des nombreuses figures de mitoses (flèches noires) ; coloration hématoxyline-éosine, Gx400

Figure 39 : Plage de cellules tumorales infiltrée par des lymphocytes chez un cas d'HCC du groupe 4. Les cellules tumorales, certaines plurinucléées (flèche noire), dégénèrent et apparaissent parfois avec un cytoplasme vacuolisé (flèche bleue). Leur noyau se condense (flèche rouge), des images de fragmentation nucléaire sont également observées (flèche orange) ; coloration hématoxyline-éosine, Gx1000
Figure 40 : Boxplot du comptage mitotique en fonction du groupe d'HCC considéré 123
Figure 41 : Zone d'ulcération superficielle de la masse tumorale ; coloration hématoxyline-éosine, Gx200
Figure 42 : A gauche : infiltration massive de cellules tumorales au sein de l'épiderme ; coloration hématoxyline-éosine, Gx400. A droite : confirmation immunohistochimique de la nature des cellules marquées, Iba-1 ⁺ , Gx400
Figure 43 : A gauche : larges plages de nécrose (flèche rouge) visualisables entre les cellules tumorales et les foyers de lymphocytes (flèche noire) ; coloration hématoxyline-éosine, Gx200. A droite : foyer de nécrose intratumoral ; coloration hématoxyline-éosine, Gx400
Figure 44 : Témoin positif de l'immunomarquage Iba-1 : cellule de Langerhans épidermique (flèche noire), présentant des extensions cytoplasmiques caractéristiques s'immisçant entre les kératinocytes adjacents, Gx1000
Figure 45 : a : Marquage granuleux membranaire à cytoplasmique des cellules tumorales, Gx1000. b : Le marquage Iba-1 est davantage retrouvé chez les cellules périphériques de la tumeur, Gx50. c : L'intensité du marquage Iba-1 est plus faible chez les cellules du centre de la tumeur, Gx50. d : Une bande de cellules fortement positives au marquage Iba-1 est observée sous l'épiderme de certains cas, Gx50
Figure 46 : Marquage cytoplasmique et granuleux CD3 ϵ des lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ , Gx1000 130
Figure 47 : a : Score CD3 ε 1, l'infiltrat de LT est quasiment absent et relégué aux marges et à la périphérie de la tumeur, Gx50. b : Score CD3 ε 2, l'infiltrat de LT est nodulaire et périphérique, Gx50. c : Score CD3 ε 3, des formations nodulaires de LT sont retrouvées en périphérie et au centre de la tumeur, Gx50. d : Score CD3 ε 4, l'infiltrat de LT envahit toute la masse tumorale de manière diffuse, Gx50

Figure 48 : Marquage Pax-5 nucléaire de forte intensité des lymphocytes B, Gx1000 133

Figure 49 : a : Score Pax-5 1, l'infiltrat de LB est quasiment absent et relégué aux marges et à la périphérie de la tumeur, Gx50. b : Score Pax-5 2, l'infiltrat de LB est nodulaire et périphérique, Gx50. c : Score Pax-5 3, des formations nodulaires de LB sont retrouvées en périphérie et au centre de la tumeur, Gx50. d : Score Pax-5 4, l'infiltrat de LB envahit toute la masse tumorale de manière diffuse, Gx50
Figure 50 : Marquage CD204 cytoplasmique et granuleux des macrophages tissulaires, Gx1000 136
Figure 51 : A gauche : marquage CD204 intra-tumoral des macrophages tissulaires, répartis de manière diffuse au sein de l'ensemble de la masse tumorale, Gx50. A droite : marquage CD204 péri-tumoral, présentant une densité importante de cellules marquées organisées en foyers en périphérie de la masse tumorale, Gx50
Figure 52 : Marquage DC-LAMP cytoplasmique et granuleux des cellules dendritiques conventionnelles (flèche noire) et de cellules rondes assimilables à des macrophages mentionnées précédemment (flèche rouge), Gx1000
Figure 53 : A gauche : marquage DC-LAMP intra-tumoral, les cellules positives sont réparties de manière diffuse au sein de l'ensemble de la masse tumorale, Gx200. A droite : marquage DC-LAMP péri-tumoral, la plus forte densité de cellules positives est retrouvée en périphérie de la tumeur, Gx100
Figure 54 : Marquage CD206 cytoplasmique des cellules tumorales, Gx1000
Figure 55 : a : Score CD206 1, absence de cellules tumorales positives sur l'ensemble de la tumeur, Gx50. b : Score CD206 2, les cellules tumorales sont positives en périphérie de la tumeur, Gx50. c : Score CD206 3, les cellules tumorales sont positives en périphérie et au centre de la tumeur. Les cellules positives éparses au marquage de forte intensité correspondent à des macrophages tissulaires, Gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, particulièrement en position sous-épidermique, Gx400
Figure 56 : Marquage FoxP3 nucléaire de forte intensité des lymphocytes T CD4 ⁺ TReg, Gx1000 143
Figure 57 : A gauche : marquage FoxP3 intra-tumoral, les lymphocytes T CD4 ⁺ TReg marqués sont répartis en foyers ou de manière diffuse au sein de l'ensemble de la masse tumorale, Gx200. A droite : marquage FoxP3 péri-tumoral, les lymphocytes T CD4 ⁺ TReg marqués sont retrouvés concomitants aux foyers lymphocytaires, Gx200

Table des tableaux

Tableau I : Localisation des principales populations de cellules histiocytaires chez le chien
Tableau II : Liste des principaux marqueurs enzymologiques, histochimiques et immunohistochimiques associés à la lignée histiocytaire chez le chien et conditions de réalisation 40
Tableau III : Principaux marqueurs cellulaires associés aux cellules de la lignée histiocytaire chez le chien
Tableau IV : Rôle des différentes cellules immunitaires à valence anti-tumorale et mécanismesd'action associés
Tableau V : Rôle des différentes cellules immunitaires du microenvironnement inflammatoirefavorisant l'initiation et le développement tumoral73
Tableau VI : Profil immunophénotypique des histiocytes tumoraux de l'HCC
Tableau VII : Profils immunophénotypiques des principales tumeurs cutanées canines inclusesdans le diagnostic différentiel de l'HCC
Tableau VIII : Principales caractéristiques des anticorps utilisés lors de la réalisation des immunomarquages, ciblant les protéines d'intérêt Iba-1, CD3 ε, Pax-5, DC-LAMP, CD204, CD206 et FoxP3 (d'après les fiches techniques des laboratoires mentionnés). Le protocole de démasquage antigénique pour chaque marquage est également rappelé
Tableau IX : Critères de classification des cas d'HCC en fonction du degré d'infiltration lymphocytaire et de la distribution spatiale de l'infiltrat
Tableau X : Critères de lecture des immunomarquages CD3 ε et Pax-5 au sein de l'HCC 107
Tableau XI : Critères de lecture de l'immunomarquage CD204 au sein de l'HCC 109
Tableau XII : Critères de lecture de l'immunomarquage DC-LAMP au sein de l'HCC
Tableau XIII : Critères de lecture de l'immunomarquage CD206 au sein de l'HCC 111
Tableau XIV : Critères de lecture de l'immunomarquage FoxP3 au sein de l'HCC

Tableau XV : Interprétation de la force des corrélations en fonction de la valeur et du signe du τ de Kendall113
Tableau XVI : Critères de classification des cas d'HCC et effectifs associés 120
Tableau XVII : Valeurs extrêmes, moyennes et médianes des comptages mitotiques en fonction des groupes d'HCC
Tableau XVIII : Répartition des infiltrats intraépidermiques de cellules tumorales au sein des 4 groupes d'HCC 125
Tableau XIX : Critères de lecture de l'immunomarquage CD3 ε au sein de l'HCC et effectifs associés
Tableau XX : Critères de lecture de l'immunomarquage Pax-5 au sein de l'HCC et effectifs associés 134
Tableau XXI : Critères de lecture de l'immunomarquage CD204 au sein de l'HCC et effectifs associés
Tableau XXII : Critères de lecture de l'immunomarquage DC-LAMP au sein de l'HCC et effectifs associés
Tableau XXIII : Réévaluation des critères de lecture de l'immunomarquage CD206 au sein de l'HCC et effectifs associés
Tableau XXIV : Critères de lecture de l'immunomarquage FoxP3 au sein de l'HCC et effectifs associés
Tableau XXV : Synthèse bibliographique de la répartition des cas d'HCC au sein des 4 groupesselon la classification de Cockerell et Slauson dans les études considérées
Tableau XXVI : Synthèse bibliographique de l'étude de l'infiltration des macrophages en fonction du groupe d'HCC considéré. La méthode d'évaluation des macrophages et les marqueurs ciblés sont précisés pour chaque étude

Table des abréviations

Aa : Acide-aminé
Ac : Anticorps
ADN : Acide désoxyribonucléique
Ag : Antigène
ARN : Acide ribonucléique
CAM : Molécule d'adhésion cellulaire
CD : Cluster de différenciation
CL : Cellule de Langerhans
CLA : Antigène cutané associé aux leucocytes
CMH I : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
COX : Cyclooxygénase
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CTLA-4 : Antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques
CSF-1 : Facteur 1 de stimulation de colonie
DAMP : Patron moléculaire associé aux dommages cellulaires
DC-LAMP : Protéine membranaire lysosomale associée aux cellules dendritiques
EGF : Facteur de croissance épidermique
FGF : Facteur de croissance fibroblastique
FLT3 : Récepteur à la tyrosine kinase 3
HCC : Histiocytome cutané canin
HCLC : Histiocytose cutanée langerhansienne canine
HE : Hématoxyline-éosine
Iba-1 : Molécule 1 adaptatrice de liaison au calcium ionisé
Ig : Immunoglobuline
IHC : Immunohistochimie
IFN : Interféron
IL : Interleukine
iNOS : Synthase inductible productrice d'oxyde nitrique
LB : Lymphocyte B
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T
MDSC : Cellule myéloïde suppressive
MMP : Métalloprotéase matricielle
NK : Natural killer
NKT : Natural killer T
NL : Nœud lymphatique
PAMP : Patron moléculaire associé aux pathogènes
PCR : Réaction en chaîne par polymérases
PDC : Cellule dendritique plasmacytoïde
PGE2 : Prostaglandine E2

PNE : Polynucléaire éosinophile

PNN : Polynucléaire neutrophile

ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène

RT-PCR : Transcription inverse par chaîne de polymérases

TAM : Macrophage associé aux tumeurs

TCR : Récepteur des cellules T

TLR : Récepteur de type Toll

TNF : Facteur de nécrose tumorale

TNFR : Récepteur au facteur de nécrose tumorale

TRAIL : Ligand apoptotique associé au facteur de nécrose tumorale

VEGF: Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Introduction

Regroupant tout d'abord un grand nombre de populations cellulaires, la notion d'histiocyte a largement évolué au cours des dernières décennies. Ceci résulte de l'approfondissement des connaissances scientifiques vis-à-vis de la caractérisation phénotypique des cellules histiocytaires, l'immunohistochimie et la cytométrie de flux ayant grandement permis de classifier de manière plus fine ces cellules à rôle central du système immunitaire. Les histiocytes sont localisés en des points clefs de la réponse immunitaire de l'organisme, au sein de l'immunité innée mais également acquise, initiateurs de la réponse immunitaire adaptative suite à la présentation de l'antigène aux cellules immunocompétentes.

Les mécanismes néoplasiques n'excluent pas les lignées histiocytaires, en effet les proliférations histiocytaires sont rapportées chez les animaux ainsi que chez l'Homme, avec une malignité et des pronostics variables (Favara et al. 1997; Meuten 2002). Les expressions cliniques sont également nombreuses ; chez le chien la forme la plus fréquemment observée correspond à une tumeur d'origine langerhansienne, se manifestant par un unique nodule cutané. Après une phase d'expansion tumorale rapide, ce processus est souvent autorésolutif, suite à l'infiltration de la tumeur par les cellules immunitaires de l'individu (Moore 2014).

La grande diversité des immunomarquages aujourd'hui disponibles et applicables aux tissus canins nous pousse à étudier de manière plus fine l'infiltrat immunitaire et son évolution au sein de la principale prolifération histiocytaire canine. Les résultats obtenus, mis en parallèle avec les connaissances actuelles en médecine humaine nous permettront de mieux caractériser cette réaction immunitaire aboutissant à la fin du processus tumoral.

Nous nous pencherons tout d'abord sur la notion d'histiocyte : cette section comportera des rappels sur l'ontogénèse des cellules histiocytaires, leurs caractéristiques morphologiques et phénotypiques, leurs localisations et leurs rôles. Elle aura pour but de mieux appréhender les désordres histiocytaires ainsi que la physiologie de certaines cellules histiocytaires antitumorales, telles que les macrophages. Puis nous aborderons les modalités de la réponse immunitaire engagée face aux processus tumoraux ainsi que les interactions existantes entre cellules immunitaires et cellules tumorales au sein du microenvironnement inflammatoire. Cette partie bibliographique se terminera par l'étude du désordre histiocytaire le plus commun chez le chien, l'histiocytome cutané. Nous tenterons d'en avoir une approche multivariée, que ce soit clinique, éthiopathogénique ou immunophénotypique.

Le second temps de ce travail correspondra à la mise en place de notre protocole expérimental, avec la sélection rétrospective de cas d'histiocytomes cutanés canin et la réalisation des immunomarquages adéquats. L'objectif sera de décrire et caractériser les populations de cellules immunitaires se trouvant associées au processus tumoral, tant lors de sa phase d'expansion que de régression. Le phénomène de régression associé à la présence de l'infiltrat immunitaire dans le cas de l'HCC pourrait constituer un modèle d'étude vis-à-vis

des thérapies anti-cancéreuses orientées vers une stimulation du système immunitaire de l'hôte (Marchal, Saint-André, et al. 1995). S'en suivra l'analyse des résultats obtenus, ainsi qu'une dernière partie de discussion, où nous tenterons d'appréhender les mécanismes de la régression tumorale.

Partie I : Rappels sur la notion d'histiocyte, étude bibliographique de la physiopathologie tumorale et de l'histiocytome cutané canin

I. L'histiocyte, cellule centrale du système immunitaire

A. Historique et définition

La cellule histiocytaire, ou histiocyte, est une notion regroupant différentes cellules immunitaires aux localisations et fonctions variées au sein de l'organisme. Cette notion a évolué depuis son origine et s'est largement affinée au cours du XXème siècle, d'abord à l'aide de critères morphologiques puis récemment grâce à des critères phénotypiques. Les avancées dans le domaine de l'immunohistochimie (IHC) ont permis un bond en avant en terme de définition et de classification des cellules histiocytaires, tant chez l'Homme que chez le chien.

L'apparition du terme « histiocyte » au sein de la communauté scientifique date de 1924, introduit par Aschoff lors de ses études sur le système réticulo-endothélial. Il désigne alors un groupe de cellules mésenchymateuses, capables de se mouvoir et de migrer dans les tissus conjonctifs, d'où leur dénomination initiale d'« histiogenic wandering cells ». L'histiocyte est alors inclu dans le « système réticulo-endothélial », groupe de cellules à l'action antipathogènes. Ce système évoluera ensuite pour inclure les cellules phagocytaires mononucléées, sous la dénomination de « système phagocytaire mononucléé » (Ludwig Aschoff 1924).

Suite à l'identification d'un nouveau type cellulaire dans les organes lymphoïdes murins en 1973 par Steinman et Cohn, les cellules dendritiques font leur apparition au sein de la classification des histiocytes (Steinman et al. 1973). Pourtant, une sous-population de cellules dendritiques avait déjà été mise en évidence et décrite un siècle plus tôt par Paul Langerhans en 1868 lors de ses études histologiques sur les nerfs chez l'Homme, donnant son nom aux cellules nouvellement découvertes (Jolles 2002).

Malgré leur diversité morphologique, fonctionnelle et phénotypique, l'évolution de la classification conduit alors à utiliser le terme d'histiocyte pour désigner les cellules de la lignée monocytaire et macrophagique, ainsi que les cellules dendritiques ; présentant une origine myéloïde commune (Valli 2007).



<u>Figure 1</u> : Schéma des différentes populations cellulaires de la lignée histiocytaire, ontogénèse simplifiée des cellules issues des cellules souches hématopoïétiques (Shortman et al. 2007; Delcour et al. 2013; Tizard 2018)

B. Ontogénèse de la lignée histiocytaire

1. Une origine myéloïde commune

Les cellules histiocytaires sont issues de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Ces cellules souches se différencient ensuite en précurseurs à l'origine de quatre lignées cellulaires hématopoïétiques principales : la lignée lymphoïde, myéloïde, érythroïde et mégacaryocytaire. Les précurseurs myéloïdes font partie des cellules originelles de la lignée histiocytaire, se différenciant par la suite en monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Néanmoins, une partie des cellules dendritiques dites « plasmacytoïdes » provient de précurseurs lymphoïde (Weiss et al. 2010). Les populations de précurseurs sont regroupées selon une classification liée aux glycoprotéines présentes à leur surface, regroupées sous le terme de «clusters de différentiation » (CD). La majorité des cellules histiocytaires dérive d'un précurseur myéloïde exprimant FLT3 et CD34. FLT3 (« FMS-Related Tyrosine Kinase 3 ») est exprimé chez tous les précurseurs à l'origine des cellules dendritiques, les précurseurs CD34⁺ pouvant donner d'autres cellules des lignées myéloïde et lymphoïde (Karsunky et al. 2003; Shortman et al. 2007). Ce précurseur myéloïde est capable de se différencier en cellules de la lignée monocytaire (promonoblaste, monoblaste puis promonocyte), elles-mêmes capables de se différencier en macrophages et cellules dendritiques. Ce sont les différentes cytokines

du microenvironnement proche qui déterminent la différenciation en cellules histiocytaires effectrices (van Furth et al. 1972; McSweeney et al. 1998; Affolter et al. 2002a; Nauta et al. 2006; Weiss et al. 2010; Tizard 2018).

2. Voies de différenciation des histiocytes et des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Comme vu précédemment, les cellules de la lignée histiocytaire sont issues d'un précurseur myéloïde commun exprimant CD34 et FLT3. Cette cellule est capable de se différencier en précurseur granulo-monocytaire, conduisant aux cellules de la lignée granulocytaire et en un précurseur des cellules dendritiques et macrophages. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC), classées comme cellules dendritiques, ne font pas partie du système histiocytaire en tant que telles. Leur ontogénèse sera néanmoins présentée brièvement, du fait de leurs similitudes en termes de morphologie et de fonction immunologique avec les cellules histiocytaires.



<u>Figure 2</u> : Schéma de l'ontogénèse des macrophages et des cellules dendritiques chez le chien, voies de différenciation et immunophénotypes associés (O'Keeffe et al. 2002; Colonna et al. 2004; Gopcsa et al. 2005; Masten et al. 2006; Shortman et al. 2007; Weiss et al. 2010; Tizard 2018)

a. Différentiation des monocytes

Les monocytes sont issus de précurseurs myéloïdes et de l'enchainement de différenciation cellulaire monoblaste, promonocyte et monocyte. Cette différenciation s'effectue sous l'influence de cytokines regroupées sous le terme CFS (« Colony-Stimulating Factor »), ainsi que celle des interleukines (IL) IL-1, IL-3, IL-6 et par l'expression augmentée du facteur de transcription PU.1. Les monocytes passent ensuite dans le torrent circulatoire. Dans un délai de 3 jours, ils entrent dans les tissus, ce passage vers un tissu spécifique détermine leur nouvelle fonction en tant que macrophage (van Furth et al. 1972; Shortman et al. 2007; Weiss et al. 2010).

b. Différentiation des macrophages

Issus initialement du passage tissulaire des monocytes sanguins, les macrophages tissulaires subissent une maturation propre et particulière liée au microenvironnement tissulaire. La cytokine M-CSF (« Macrophage Colonny-Stimulating Factor ») joue un rôle prépondérant dans la maturation des monocytes sanguins en macrophages. Cette maturation conduira à l'acquisition de fonctions spécifiques par les macrophages tissulaires (Weiss et al. 2010). A noter que certaines populations de macrophages tissulaires (cellules de Küpffer, macrophages spléniques et pulmonaires) présentent un auto entretien sans apport de monocytes sanguins au cours de la vie de l'individu, ce qui suggère d'autres mécanismes dans l'ontogénèse des macrophages (Yona et al. 2013).

c. Différenciation des cellules dendritiques

Les voies de différenciation des cellules dendritiques à partir des précurseurs myéloïdes et lymphoïdes sont multiples. De plus, plusieurs sous-populations cellulaires de cellules dendritiques sont formées lors de la maturation des cellules souches, présentant des localisations, fonctions, caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques différentes (Weiss et al. 2010; Tizard 2018).

Cinq voies de différenciation des cellules dendritiques ont été mises en évidence, la plupart des études concernant l'espèce humaine et murine. Néanmoins l'existence de précurseurs myéloïdes et lymphoïdes exprimant le CD34 et des différents types cellulaires dendritiques au sein de l'espèce canine nous laisse penser qu'une extrapolation de ces voies de différenciation est possible chez le chien (McSweeney et al. 1998; Affolter et al. 2002a).

La classification des sous-populations de cellules dendritiques s'effectue selon leur localisation et leur fonction immunologique. Une seconde classification existe également et se base davantage sur leur capacité de migration à travers l'organisme ainsi que sur l'influence des stimuli inflammatoires ou infectieux vis-à-vis de leur activation (Shortman et al. 2007).

i. Cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont les seules cellules dendritiques d'origine lymphoïde. Cette hypothèse est étayée par l'absence de transcription d'un gène codant pour un pré-récepteur alpha, delta-5 et Spi-B des LT ainsi que des réarrangements de gène codant pour les immunoglobulines (Ig) H non retrouvés chez les cellules dendritiques d'origine myéloïde (Colonna et al. 2004). La différenciation des PDC s'effectue à partir de précurseurs lymphoïdes CD34⁺/FLT3⁺ au sein de la moelle osseuse hématopoïétique, sous l'influence de l'IL-2R y en particulier. Les PDC migrent ensuite jusqu'aux nœuds lymphatiques, la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses.

ii. Cellules de Langerhans

Sous l'action des cytokines GM-CSF (« Granulocyte-Macrophage Colonny Stimulating Factor ») et TNF- α (« Tumor Necrosis Factor ») ainsi que des facteurs de cellules souches, les précurseurs myéloïdes CD34⁺/ FLT3⁺ se différencient en deux populations cellulaires. La première exprime l'antigène CLA (« Cutaneous Leucocyte-associated Antigene »). Cet antigène n'est pas exprimé par la seconde population dont dériveront les monocytes et macrophages.

Sous l'influence du TGF-β1 (« Tumor Growth Factor »), physiologiquement exprimé par les kératinocytes, les cellules CD34⁺/CLA⁺ se différencient en cellules dendritiques immatures épidermiques possédant les caractéristiques morphologiques et immunologiques des cellules de Langerhans (Larregina et al. 2001). La présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-4 et le GM-CSF dans le microenvironnement cellulaire cutané achève la maturation de ces cellules, en cellules de Langerhans (CL) matures capables d'enclencher une réaction immunitaire spécifique après captation de l'antigène et migration au sein des organes lymphoïdes (Szabolcs et al. 1997; Affolter et al. 2002a; Shortman et al. 2007; Weiss et al. 2010). Cette maturation se caractérise également par l'acquisition des granules de Birbeck, chez les espèces où ces organites ont été mis en évidence. Des inclusions cytoplasmiques similaires ont par ailleurs été mises en évidence chez le chien (Marchal et al. 1993). A noter que chez l'Homme, la régulation du pool de cellules de Langerhans d'une région cutanée est dépendante de son état inflammatoire : on distingue ainsi des cellules de Langerhans à longue durée de vie en l'absence d'inflammation, issues de précurseurs myéloïdes. Lors d'état inflammatoire, des cellules de Langerhans qualifiées de court-terme à durée de vie réduite sont retrouvées et dérivent alors directement de monocytes sanguins (Seré et al. 2012).

iii. Cellules dendritiques folliculaires et interdigitées

Bien que dérivant d'un précurseur myéloïde, les cellules dendritiques folliculaires sont retrouvées au sein des organes lymphoïdes secondaires, en particulier les nœuds lymphatiques. Elles dérivent d'un précurseur CD34⁺/CLA⁻, et se différencient sous l'influence

de facteurs de cellules souches (c-Kit en particulier) ainsi que de l'IL-3. Les cellules dendritiques interdigitées sont également retrouvées dans les tissus lymphoïdes secondaires et le thymus et dérivent de ce même précurseur CD34⁺/CLA⁻ (Szabolcs et al. 1995; Affolter et al. 2002a).

iv. Cellules dendritiques conventionnelles

La voie de différenciation des cellules dendritiques conventionnelles (également désignées par « interstitielles ») est double. Elles peuvent directement dériver d'un précurseur myéloïde CD34⁺/ FLT3⁺, ou bien d'un monocyte sanguin CD14⁺, voie également commune aux macrophages. L'influence du GM-CSF et du TNF- α permet d'achever leur maturation en cellule dendritique conventionnelle (Affolter et al. 2002b).

C. Répartition des histiocytes au sein de l'organisme

Les histiocytes occupent de nombreuses fonctions immunologiques qui dépendent de leurs localisations tissulaires diverses. Les monocytes sont circulants et se différencient en macrophages tissulaires après leur extravasation, leur phénotype dépendra de leur localisation. Les cellules de Langerhans se retrouvent dans les épithéliums malpighiens, à l'interface avec le milieu extérieur ; de même que les cellules dendritiques conventionnelles, positionnées au sein des épithéliums et des tissus conjonctifs des organes non-lymphoïdes. Une fois leur maturation enclenchée, on retrouve ces deux types cellulaires au sein des nœuds lymphatiques. Les cellules dendritiques folliculaires sont localisées dans les follicules lymphoïdes de la rate, des nœuds lymphatiques et des plaques de Peyer ; les cellules dendritiques interdigitées dans l'ensemble du tissu lymphoïde. Quant aux cellules dendritiques plasmacytoïdes, elles sont présentes dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires.

Le tableau ci-dessous récapitule la localisation des cellules de la lignée histiocytaire au sein de l'organisme chez le chien.
<u>Tableau I</u> : Localisation des principales populations de cellules histiocytaires chez le chien (Shortman et al. 2007; Weiss et al. 2010; Delves et al. 2017; Tizard 2018)

Localisation		Lignée monocytaire et	Cellules dendritiques
		macrophagique	
Epithéliums malpighiens			Cellules de Langerhans
	Foie	Cellules de Kupffer	
	Reins	Macrophages du	
		mésangium rénal	
Parenchymes	Poumons	Macrophages alvéolaires et	
et tissus		intravasculaires	
conjonctifs	Capsules	Macrophages synoviaux	Cellules dendritiques
	synoviales		conventionnelles
	Os	Ostéoclastes	
	Tissus	Macrophages	
	conjonctifs et		
	séreuses		
	Rate	Macrophages spléniques	Cellules dendritiques
Tissus	Thymus	Macrophages thymiques	interdigitées et
lymphoïdes	Nœuds	Macrophages	plasmacytoïdes
	lymphatiques		
			Cellules dendritiques
			conventionnelles et de
			Langerhans activées
			Cellules dendritiques
			folliculaires
Tissus	Encéphale	Cellules microgliales	
nerveux			
Fluides	Sang	Monocytes	Cellules dendritiques
circulants	Lymphe		immatures et
Moolle			plasmacytoïdes
Tissus lymphoïdes Tissus nerveux Fluides circulants Moelle osseuse	synoviales Synoviales Os Tissus conjonctifs et séreuses Rate Thymus Nœuds lymphatiques Encéphale Sang Lymphe	Ostéoclastes Macrophages Macrophages spléniques Macrophages thymiques Macrophages Macrophages Cellules microgliales Monocytes	Cellules dendritiques interdigitées et plasmacytoïdes Cellules dendritiques conventionnelles et de Langerhans activées Cellules dendritiques folliculaires Cellules dendritiques folliculaires

D. Caractéristiques morphologiques et phénotypiques des histiocytes

- 1. Morphologie et ultrastructure
 - a. Monocytes

Les monocytes sont des cellules nucléées rondes, mesurant en moyenne 15µm de diamètre. Elles possèdent un noyau de grande taille rond à réniforme. Leur cytoplasme est abondant, souvent vacuolisé et basophile. Il contient de nombreux organites, en particulier des lysosomes et un appareil de Golgi conséquent. Des extensions péri-cytoplasmiques sont également présentes. Chez le chien, les monocytes représentent environ 5% des leucocytes sanguins (Harvey 2001; Tizard 2018).



<u>Figure 3</u> : A gauche : monocytes sanguins canins (Harvey 2001). A droite : observation de l'ultrastructure d'un monocyte canin au microscope électronique (Cheville 2009)

b. Macrophages

Les macrophages sont des cellules hautement dynamiques, possédant de nombreux pseudopodes à leur surface. La taille et la morphologie des macrophages sont assez variables et dépendent des tissus dans lesquels ils résident. On peut néanmoins généralement observer des cellules rondes, de grande taille, mesurant jusqu'à 20µm de diamètre. Leur noyau est rond, ovalaire à réniforme, à chromatine finement indentée. Leur cytoplasme est très

vacuolaire, riche en lysosomes et contient parfois des débris cellulaires phagocytés. L'appareil de Golgi est également très développé chez ces cellules. (Harvey 2001; Cheville 2009; Tizard 2018).



<u>Figure 4</u> : A gauche : macrophages canins (Ressel 2018). A droite : observation de l'ultrastructure d'un macrophage canin au microscope électronique (Cheville 2009)

c. Cellules dendritiques

La morphologie des cellules dendritiques dépend en grande partie de leur état d'activation et de leur localisation. On peut cependant noter une base morphologique commune particulière, liée à leur rôle de sentinelles du système immunitaire : c'est la présence d'extensions cytoplasmiques, les dendrites. Elles leur permettent d'accroitre leur capacité de captage des antigènes dans le milieu extracellulaire et d'augmenter la surface de contact avec les autres cellules immunitaires. On détaillera dans ce paragraphe-ci la morphologie des cellules de Langerhans, cellules au phénotype le plus proche de celui des cellules tumorales de l'histiocytome cutané canin.



<u>Figure 5</u>: A gauche : observation de cellules de Langerhans canines au sein de l'épithélium buccal, immunomarquage CD18. Notez les dendrites caractéristiques de ces cellules épidermiques, qui s'immiscent entre les kératinocytes adjacents, Gx400 (Marchal et al. 1993). A droite : observation de l'ultrastructure d'une cellule de Langerhans canine au microscope électronique (Marchal et al. 1993)

Les cellules de Langerhans possèdent un noyau souvent irrégulier, à chromatine marginée. On retrouve un appareil de Golgi développé ainsi que des vésicules cytoplasmiques, impliquées dans la fonction d'endocytose antigénique de ces cellules (Tan et al. 2010; Delves et al. 2017). Leur cytoplasme contient parfois des granules, décrites par Birbeck en 1961 chez les cellules de Langerhans humaines. Ces structures cytoplasmiques, en bâtonnets allongés à bouts arrondis d'environ 0.2µm de long sont caractéristiques de cette population cellulaire chez l'Homme. La formation de ces vésicules, qui jouent un rôle probable dans l'activité d'endocytose et de reconnaissance de l'antigène par les cellules de Langerhans, est rendue possible par l'activité d'une protéine, la langérine (une lectine de type C). Elle intervient dans la formation des vésicules en se liant au mannose et en permettant l'internalisation des granules. Il a été démontré que chez le chien, le gène codant pour la langérine comporte une mutation et entraîne la formation d'une protéine non fonctionnelle. Toutefois, des structures similaires aux granules de Birbeck ont été mises en évidence chez l'espèce canine (Marchal et al. 1993; Tizard 2018).



<u>Figure 6</u> : A gauche : granules de Birbeck, cytoplasme de cellule de Langerhans humaine, microscopie électronique. Ces organites longilignes et renflés sont caractéristiques de ce type cellulaire (Romani et al. 2010). A droite : flèche noire : organites similaires aux granules de Birbeck, cytoplasme de cellule de Langerhans canine, microscopie électronique (Marchal et al. 1993)

Les cellules de la lignée histiocytaire possèdent des caractéristiques morphologiques qui les rendent facilement reconnaissables lors d'analyses cytologiques. Néanmoins, leur identification est parfois plus difficile au sein des tissus. De plus, leur morphologie se trouve par exemple modifiée lors de phénomènes prolifératifs. Les techniques d'histochimie et d'immunohistochimie, qui se basent sur la détection de marqueurs spécifiques via des réactions anticorps-antigènes permettent alors d'affiner l'identification des populations cellulaires.

2. Enzymologie, histochimie et immunohistochimie

L'enzymologie, l'histochimie et l'immunohistochimie correspondent à l'ensemble des méthodes enzymatiques, chimiques et immunologiques – reposant sur l'utilisation d'anticorps spécifiques couplés à des marqueurs – réalisées sur les tissus et visant à caractériser un groupe ou un type cellulaire.

Le tableau du paragraphe suivant regroupe les différents marqueurs cellulaires associés à la lignée histiocytaire chez le chien.

3. Immunophénotypage

L'immunophénotypage des cellules canines s'est affiné au cours des dernières années, avec pour objectif la définition de groupes d'antigènes, les « clusters de différenciation » chez le chien, à l'instar des travaux effectué chez l'Homme. L'immunophénotypage repose sur l'utilisation d'anticorps spécifiques (analogues humains, murins ou autres) dirigés contre les antigènes cellulaires. Ces CD correspondent donc à des antigènes reconnus par un groupe d'anticorps principalement monoclonaux, auquel un nombre est attribué pour faciliter leur identification (Weiss et al. 2010). L'identification de ces antigènes permet ensuite de classifier les cellules, afin de mieux appréhender leur ontogénèse ou bien de les caractériser lors de processus prolifératif par exemple. Les premiers travaux sur les antigènes leucocytaires canins datent de 1994, avec la mise en place du CLAW (« Canine Leucocyte Antibody Workshop ») (Cobbold et al. 1994).

Les marqueurs enzymologiques et immunohistochimique actuels qui permettent le phénotypage des cellules de la lignée histiocytaire chez le chien sont résumés dans le tableau ci-dessous. A noter que certains marquages immunohistochimiques requièrent des conditions d'utilisation particulières, notamment le non-usage de formaldéhyde qui possède une action dénaturante à l'encontre des protéines et modifie leur structure. En conséquence, les réactions antigène-anticorps sont susceptibles d'être modifiées. Certains marquages ne sont donc disponibles que pour certains modes de conservation des tissus (frais, congelés ou formolés). Ces conditions sont également explicitées à l'aide de ce tableau, on désignera les tissus non fixés comme non formolés.

<u>Tableau II</u> : Liste des principaux marqueurs enzymologiques, histochimiques et immunohistochimiques associés à la lignée histiocytaire chez le chien et conditions de réalisation (Danilenko et al. 1992b; Cline 1994; Cobbold et al. 1994; McSweeney et al. 1998; Salaun et al. 2004; Fulmer et al. 2007; Weiss et al. 2010; Moore 2014; Kelley et al. 2014; Raskin et al. 2016; Barger et al. 2017)

Marqueur enzymologique	Cellules cibles	Conditions
et immunohistochimique		tissulaires de
		réalisation des
		marquages
CD1a, b, c	Histiocytes, NKT	Fixés ou non
CD4	Lymphocytes T helper, monocytes,	Non fixés
	macrophages, cellules dendritiques	
	activées	
CD8	Lymphocytes T	Non fixés
CD11a, b, c	CD11a : Cellules présentatrices d'Ag	CD11a, b, c : Non
(Hétérodimère LeuCAM	(CPA)	fixés
(« Cell Adhesion		
Molecule »), β -intégrines)	CD11b : Monocytes, macrophages,	CD11d : Fixés ou
	granulocytes	non
	CD11c : Monocytes, macrophages,	
	granulocytes, cellules dendritiques	

	CD11d : Macrophage et sous-	
	population de lymphocytes T, dans la	
	pulpe rouge de la rate en particulier	
CD14	Monocytes, macrophages,	Fixés ou non
	granulocytes	
CD18	Tous leucocytes	Fixés ou non
(Hétérodimère LeuCAM, β-		
intégrines)		
CD34	Cellules souches myéloïdes, cellules	Fixés ou non
	endothéliales	
CD44	Monocytes,	Fixés ou non
	granulocytes, lymphocytes	
CD45	Tous leucocytes	Fixés ou non
CD45RA	Lymphocytes B et T naïfs	Fixés ou non
CD49	Lymphocytes T, monocytes,	Non fixés
	granulocytes	
CD90 (Thy-1)	Lymphocytes T, cellules myéloïdes,	Fixés ou non
	cellules dendritiques interstitielles	
CD204	Monocytes, macrophages tissulaires,	Fixés ou non
	cellules microgliales	
CD208 (DC-LAMP:	Cellules dendritiques	Fixés ou non
« Dendritic Cell-Lysosomal	conventionnelles	
Associated Membrane		
Protein »)		
lba-1 (« lonized calcium	Monocytes, macrophages, cellules	Fixés ou non
Biding Adaptator molecule-	dendritiques, cellules microgliales	
1 »)		
CMH (complexe majeur	Cellules présentatrices d'Ag.	Non fixés
d'histocompatibiltié) II	lymphocytes B. lymphocytes T	
F-cadhérine	Cellules épithéliales, cellules de	Fixés ou non
	Langerhans	
Vimentine	Cellules mésenchymateuses	Fixés ou non
	,	
Trypsine	Histiocytes	Fixés ou non
Myélopéroxydase	Macrophages, monocytes.	Fixés ou non
, , ,	polynucléaires neutrophiles	
Protéine S-100	Cellules de Langerhans, mélanocytes.	Fixés ou non
	cellules myoépithéliales. cellules	-
	nerveuses	
		1

Les antigènes de la famille CD1 regroupent des glycoprotéines de surface, impliquées dans la présentation de l'antigène non protéique, lipidique et glycolipidique. Les CD11 et CD18 constituent une famille de protéines d'adhésion cellulaire, notamment aux protéines endothéliales. Les protéines du CD4 et CD8 autorisent la reconnaissance de l'antigène présenté respectivement par le CMH II et le CMH I, le CD3 permet ensuite la transduction du signal lors de la liaison antigène-récepteur LT. Les protéines du CD14 autorisent la transmission des signaux liés à l'inflammation et la production de cytokines par les monocytes et macrophages. Le CD34 est caractéristique des précurseurs myéloïdes de la lignée histiocytaire et intervient dans les interactions entre leucocytes et endothélium, tout comme le CD44. Les CD45 et CD45RA (une des isoformes de la protéine CD45) correspondent à une tyrosine phosphatase, nécessaire à l'activation des leucocytes. Enfin, les protéines du CD49 font parties des adhésines et le CD90 intervient dans la régulation du pool de cellules souches hématopoïétiques.

Le « scavenger receptor » CD204 permet aux monocytes et macrophages de se lier et d'internaliser les lipoprotéines de basse densité des membranes cellulaires. Ces récepteurs jouent un rôle central dans l'adhésion et la phagocytose des éléments étrangers. Le DC-LAMP, protéine associée aux membranes lysosomales est retrouvée chez les cellules dendritiques conventionnelles canines. La protéine Iba-1, associée au calcium, est impliquée dans les mécanismes de phagocytose et de mouvement cellulaire via son interaction avec les molécules d'actine du cytosquelette. Chez le chien , on la retrouve chez toutes les cellules de la lignée monocyto-macrophagique ainsi que chez les cellules dendritiques (Salaun et al. 2004; Kelley et al. 2014; Pierezan et al. 2014).

La vimentine est une protéine structurale des cellules mésenchymateuses ; la trypsine et la myélopéroxydase sont des enzymes lysosomales. La protéine S-100 présente de multiples fonction : homéostasie du calcium, communication intercellulaire ou encore dynamisme cellulaire. Elle est surtout utilisée en tant que marqueurs lors du suivi de certains processus néoplasiques. Pour finir, la E-cadhérine intervient dans l'adhésion intercellulaire des cellules épithéliales entre elles et avec les cellules de Langerhans (Weiss et al. 2010; Raskin et al. 2016).

Ce second tableau récapitule les marqueurs cellulaires présents chez les cellules histiocytaires canines en fonction de leur type. L'expression de ces marqueurs cellulaires dépend du degré de maturité des cellules. Il est plus ou moins important en fonction du sous-type cellulaire et de la localisation des cellules, notamment dans le cas des macrophages qui présentent des localisations tissulaires variées (Moore et al. 1996).

<u>Tableau III</u> : Principaux marqueurs cellulaires associés aux cellules de la lignée histiocytaire chez le chien (Fondevila et al. 1989; Cobbold et al. 1994; Marchal, Dezutter-Dambuyant, et al. 1995; Moore et al. 1996; Termeer et al. 2003; Salaun et al. 2004, 208; Fulmer et al. 2007; Mielcarek et al. 2007; Weiss et al. 2010; Kato et al. 2013; Pierezan et al. 2014; Moore 2014; Paździor-Czapula et al. 2015; Rios de la Rosa et al. 2017)

Marqueur	Cellules dendritiques		Macrophages
immunohistochimique	Cellules de	Cellules dendritiques	
	Langerhans	conventionnelles	
CD1a	+	+	Variable
CD1b	+	Variable	Variable
CD1c	+	+	-
CD4	-	-	-
CD8	-	-	-
CD11a	+	+	-
CD11b	Variable	+	+
CD11c	+	+	+
CD11d	-	-	+
CD18	+	+	+
CD14	-	-	+
CD34	-	-	-
CD44	+	+	+
CD45	+	+	+
CD45RA	-	-	-
CD49	+	+	+
CD90 (Thy-1)	-	+	-

CD204	-	-	+
CD208 (DC-LAMP)	-	+	-
lba-1	+	+	+
СМН ІІ	+	+	+
E-cadhérine	+	-	-
Vimentine	+	+	+
Trypsine	+	+	+
Myélopéroxydase	-	+	+
Protéine S-100	-	-	+
Autres marqueurs	CLA+	CLA-	CD68⁺, CD204⁺, CD206⁺

a. Monocytes et macrophages

L'immunophénotype des macrophages est très variable et dépend en grande partie de leur environnement tissulaire. Les conditions microenvironnementales déterminent la maturation des macrophages et donc l'expression d'antigènes spécifiques (Heinrich et al. 2017). Par exemple, l'expression des β 2-intégrines est différente chez les macrophages suivant les tissus considérés : les cellules de Kupffer et microgliales expriment largement les dimères CD11b et CD18. Les macrophages des tissus hématopoïétiques expriment eux le CD11d et le CD18. Malgré ces différences dans l'expression des antigènes de surface, les macrophages présentent un phénotype commun CD11b/c/d⁺, CD18⁺, CD14⁺, CD44⁺ et CD45⁺. Les macrophages expriment également les protéines du CMH II, caractéristiques des cellules présentatrices d'antigènes (Moore 2014; Tizard 2018). On retrouve chez les macrophages des enzymes induites dans les processus de lyse phagocytaire, utilisables en tant que marqueurs, que sont la lysozime, la myélopéroxydase et la trypsine. D'autres marqueurs spécifiques sont disponibles à l'identification des macrophages, tels que les « scavengers receptors », CD68 et CD204 (Ohnishi et al. 2011).

b. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques possèdent elles aussi un immunophénotype dépendant de leur localisation au sein de l'organisme. Les cellules de Langerhans, localisées au sein des épithéliums malpighiens, expriment une protéine d'adhésion transmembranaire, la E-cadhérine, spécifique aux cellules épithéliales. Cette protéine permet ainsi la conservation de la cohésion de l'épithélium.

On distingue donc des variations dans le profil immunophénotypique, néanmoins les cellules dendritiques canines présentent un profil CD1⁺, CD11a/c⁺, CD18⁺, CD44⁺, CD45⁺ et CMH II⁺ commun. Les β 2-intégrines CD11 sont des marqueurs largement utilisés afin de différencier les lignées de cellules dendritiques et de macrophages. Les cellules de Langerhans expriment la E-cadhérine, les cellules dendritiques interstitielles la protéine Thy-1 (CD90). L'expression de la myélopéroxydase n'est retrouvée que chez les cellules dendritiques interstitielles (Moore et al. 1996; Affolter et al. 2002b; Paździor-Czapula et al. 2015).

E. Caractéristiques fonctionnelles des histiocytes

1. Monocytes et macrophages

Les monocytes sanguins constituent les cellules immatures du système monocytemacrophage. Ils restent environ 3 jours dans le torrent circulatoire avant de rejoindre les tissus et de se différencier en macrophages. Plusieurs types d'activation et de maturation des macrophages sont décrits, et dépendent des stimuli reçus par ces derniers.



<u>Figure 7</u> : Schéma présentant les différentes voies de maturation des macrophages, stimuli et cytokines associés (Weiss et al. 2010)

Certains macrophages, qualifiés de M1 ou pro-inflammatoires, sont activés en présence du LPS (lipopolysaccharides) ou stimulés par l'IFN-y (interféron y). Ils constituent les macrophages aux fonctions anti-pathogènes communément admises. Ces cellules entretiennent le processus inflammatoire via la production de cytokines inflammatoires (IL-12 et 23), augmentent l'expression des protéines du CMH II à leur surface, gagnent en taille et en mobilité au sein des tissus. Ils possèdent une activité anti-pathogène accrue, en luttant par exemple contre les agents pathogènes à l'aide de la synthèse d'oxyde nitrique. Les PAMP (« Pathogen-Associated Molecular Patterns ») et le LPS reconnus déclenchent l'induction de la synthèse d'oxyde nitrique permettant aux macrophages de neutraliser les agents pathogènes bactériens, protozoaires, fongiques et helminthiques via des radicaux nitrés oxydés (NO₂ en particulier). Ces macrophages sécrètent également davantage de protéases, d'enzymes lysosomales, accroissent leur activité phagocytaire et participent au recrutement des cellules NK (Natural Killer) via l'action du TNF- α et de l'IL-12. Les NK sécrètent eux même de l'IFN-y, participant à l'induction des macrophages M1. Ces macrophages orientent la réponse immunitaire adaptative vers une réponse de type cellulaire (Th1) via la production d'IL-12, d'IL-23 et sécrètent davantage de cytokines pro-inflammatoires : IL-1, IL-6 et TNF- α (Cheville 2009; Gordon et al. 2010; Weiss et al. 2010; Delves et al. 2017; Tizard 2018). Ce sont des cellules clefs de la réponse immunitaire primaire.

Une voie de maturation alternative est décrite, aboutissant à la formation de macrophages dits M2, à activité anti-inflammatoire. Ces macrophages sont spécialisés dans la réparation tissulaire, la stimulation de l'angiogenèse (sécrétion de VEGF, « Vascular Endothelial Growth Factor») et induisent une réduction de l'inflammation (Cheville 2009). D'autres rôles propres aux macrophages M2, notamment pro-tumoraux, seront détaillés lors de l'étude de l'infiltrat immunitaire associé à l'HCC (histiocytome cutané canin) (Chanmee et al. 2014). Ces macrophages peuvent dériver de macrophages M1, qui une fois la phase aiguë de l'inflammation terminée et sous l'influence de cytokines dites Th2 (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) évoluent en macrophages M2. Le recrutement de ces cellules s'effectue également à partir de monocytes sanguins (Gordon et al. 2010). Ils participent à la réparation tissulaire en sécrétant des facteurs de croissance fibroblastiques et des inhibiteurs des protéases, en particulier SLP1, inhibiteur de la protéase sérine. Cette molécule inhibe la sécrétion d'élastases et de molécules oxydantes, favorise la sécrétion de TGF- β , qui à son tour inhibe la sécrétion de TNF- α pro-inflammatoire.

De plus, les macrophages possèdent d'autres rôles majeurs comme la régulation du fer au sein de l'organisme par recyclage des érythrocytes sanguins, ou encore l'élimination des tissus morts (Weiss et al. 2010). La durée de vie de ces cellules dans les tissus est variable et peut aller jusqu'à plusieurs années. Néanmoins, la durée de vie des cellules induites dans les processus inflammatoires semble être beaucoup plus courte que celles des cellules résidentes au sein des tissus (Cheville 2009; Weiss et al. 2010; Tizard 2018).

a. Reconnaissance des signaux cellulaires et activation des macrophages

Les macrophages M1 présentent de nombreux récepteurs à leur surface, engagés dans des rôles de reconnaissance et d'absorption des antigènes. On peut citer les « scavenger receptors » (CD68), les protéines du CD14 qui se lient au LPS, les récepteurs à cytokines et chimokines ainsi que les TLR (« Toll-Like Receptors ») sensibles aux PAMP. Ce sont des cellules sentinelles, capables de détecter les antigènes étrangers et d'induire le début de la réponse immunitaire. Ils reconnaissent également les dommages tissulaires via les DAMP (« Dammage-Associated Molecular Patterns »), exprimés par les tissus endommagés.

L'activation des macrophages M2 s'effectue principalement par le biais des facteurs produits par les cellules environnantes (immunitaires, tumorales) : IL-4, IL-10, IL-13 et TGF- β (Gordon et al. 2010).

b. Régulation de l'inflammation et orientation de la réponse immunitaire

En réponse à ces stimuli, les macrophages sécrètent de nombreuses cytokines proinflammatoires, les principales étant l'IL-1, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-12, l'IL-18, l'IL-23 et le TNF- α . L'expression de ces facteurs va dépendre de leur maturation phénotypique M1 ou M2. Ces médiateurs solubles vont induire la maturation d'autres cellules immunitaires (maturation des lymphocytes B par le biais de l'IL-6, la croissance des lymphocytes T par le TNF- α) et participer à la modification de la balance en cytokines du milieu. De plus, cette balance va déterminer l'orientation de la réponse immunitaire vers une réponse cellulaire dite Th1, humorale dite Th2 ou encore Th17 et TReg que nous détaillerons par la suite.



<u>Figure 8</u> : Schéma des principales cytokines sécrétées par les macrophages, cibles et fonctions (Cheville 2009; Weiss et al. 2010; Tizard 2018)

Les facteurs chimiotactiques CXCL8, CCL4 et CCL3 (CC chimiokines) sont également produits par les macrophages lors de dommages tissulaire ou de reconnaissance d'agents pathogènes. Ils aboutissent au recrutement des neutrophiles sur le site inflammatoire, en promouvant la diapédèse de ces derniers depuis le torrent circulatoire. Les monocytes sanguins présentent un chimiotactisme positif et migrent plus rapidement vers les tissus concernés, sous l'influence de facteurs chimiotactiques sécrétés par les macrophages activés et les polynucléaires neutrophiles (protéine CCL2) (Cheville 2009; Weiss et al. 2010; Tizard 2018).

c. Phagocytose des particules et agents pathogènes

La phagocytose est un mécanisme essentiel de la réponse immunitaire primaire, médié par les macrophages M1. Elle correspond à une internalisation d'agents pathogènes (bactériens, protozoaires, fongiques) ou de particules étrangères puis à leur destruction par les cellules phagocytaires, suite à la fusion des phagosomes avec des lysozomes contenant des agents

oxydants (NO₂, H₂O₂) et des lysozymes. Les macrophages sont capables de réaliser des phagocytoses successives et répétables, contrairement aux polynucléaires neutrophiles. Ils possèdent la capacité de sécréter des collagènases et des élastases directement dans le milieu extra-cellulaire, désorganisant et détruisant les tissus conjonctifs, rendant plus accessibles les éléments à phagocyter et facilitant la migration des autres cellules immunitaires (Tizard 2018). Les macrophages présentent une moindre sélectivité dans le matériel qu'ils phagocytent et sont moins réceptifs aux chimiokines par rapport aux autres cellules phagocytaires (Cheville 2009).



<u>Figure 9</u> : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la phagocytose par les macrophages (Delves et al. 2017)

Les étapes de ce mécanisme sont les suivantes : les macrophages sont attirés sur le site inflammatoire par chimiotactisme positif pour les produits bactériens, certains composants du complément (C5a) et par les DAMP. Les polynucléaires neutrophiles produisent également des chimiokines attirant les macrophages, telles que les défensines ou les cathelicidines. La reconnaissance des agents pathogènes se fait par l'intermédiaire des PAMP, il en résulte une activation du macrophage et une initiation de la phagocytose, les pseudopodes du macrophage commencent à englober l'agent pathogène. Un phagosome se forme, qui fusionne ensuite avec les lysosomes afin d'aboutir à un phagolysosome. Les lysosomes y déchargent leur contenu enzymatique et oxydatif (peroxyde, peptides anti-microbiens, lysosimes, lactoferrine), qui conduit à une destruction et une digestion du microorganisme

phagocyté. Les produits de digestion sont ensuite relâchés dans le milieu extracellulaire (Delves et al. 2017; Tizard 2018).

Le processus de phagocytose est un moyen de défense de l'organisme vis-à-vis des agents pathogènes, pilier de l'immunité primaire, mais il permet également l'activation de la réponse secondaire dite spécifique ou adaptative, via la présentation d'antigènes aux cellules immunocompétentes.

d. Présentation de l'antigène et activation de la réponse immunitaire adaptative

Comme toute cellule nucléée, les macrophages expriment les protéines du CMH I autorisant la présentation d'antigènes endogènes. Les macrophages M1 expriment également à leur surface les protéines du CMH II, qui leur permet de présenter des antigènes exogènes aux lymphocytes T sensibilisés. Néanmoins cette activation est souvent limitée du fait de la dégradation endogène de l'antigène par les enzymes lysosomales. A noter que les macrophages M2 ne possèdent pas de fonction de présentation de l'antigène.

La présentation de l'antigène s'effectue après phagocytose et dégradation des complexes protéiques du micro-organisme, fixation aux glycoprotéines du CMH II et inclusion au sein d'une vésicule d'exocytose. Cette vésicule est ensuite transportée vers la membrane cellulaire et l'antigène est présenté aux lymphocytes T sensibilisés, permettant l'activation de la réponse immunitaire spécifique (Cheville 2009; Tizard 2018).

Les macrophages ne sont pas les uniques cellules qui interviennent dans la présentation de l'antigène, nous allons voir par la suite que les cellules dendritiques sont les CPA les plus efficaces du système immunitaire (Tizard 2018).

2. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules centrales de la réponse immunitaire. De par leur morphologie et leur localisation spécifique, elles jouent le rôle de cellules sentinelles en activant la réponse immunitaire innée lors de l'intrusion d'agents pathogènes. Elles sont dotées d'une capacité de présentation des antigènes exogènes extrêmement efficace leur permettant d'initier la réponse immunitaire adaptative. Enfin, elles modulent cette réponse en l'orientant vers une médiation principalement humorale ou cellulaire (Tizard 2018). Elles sont également impliquées dans la mise en place de la tolérance centrale au sein du thymus et dans le maintien de la tolérance périphérique (Cheville 2009).

Nous nous concentrerons ici sur les caractéristiques fonctionnelles de cellules dendritiques conventionnelles et des cellules de Langerhans, largement étudiées dans de nos travaux. Quant aux cellules dendritiques folliculaires et interdigitées, elles font office de relais et d'amplificateurs de la présentation antigénique au sein des tissus lymphoïdes. Les cellules

dendritiques folliculaires activent directement les LB, les cellules dendritiques interdigitées les LT. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont elles des productrices majeures d'interférons de type I, à visée anti-virale, et d'interférons de type III. Elles possèdent également des capacités de présentation antigénique et coordonnent la réponse immunitaire par le biais de cytokines (Maxie 2016; Tizard 2018).

La durée de vie des cellules dendritiques est très variable, elle semble être chez l'Homme régulée via des signaux émis par les agents pathogènes et les LT. Cette régulation passe par une modification de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 (Hou et al. 2004). Une étude menée sur des cellules de Langerhans murines montre un renouvellement de ces cellules épidermiques de 40% en 21 jours (Kamath et al. 2002).

a. Cellules sentinelles et captation de l'antigène

Les cellules dendritiques conventionnelles sont présentes au sein de nombreux tissus, mais plus particulièrement ceux à l'interface avec le milieu extérieur (épithéliums) et font office de sentinelles vis-à-vis des agents pathogènes. Les cellules de Langerhans, de par leur localisation épidermique, sont en première ligne face aux antigènes extérieurs et interviennent dans les réactions immunitaires cutanées telles que l'hypersensibilité retardée ou les dermatites allergiques de contact (Tizard 2018).

Les cellules dendritiques immatures possèdent des récepteurs variés (IL-R1, TNF- α , Fc, TLR) orientés vers leur fonction première : la captation d'antigènes. Leur kit enzymatique (production de radicaux libres et d'ions superoxides) leur permet de détruire les agents pathogènes avant d'en présenter les fragments antigéniques. La dégradation des antigènes est limitée chez les cellules dendritiques par rapport aux macrophages, les lysosomes ne fusionnant que très peu avec les phagosomes. Une fois l'antigène capté, la cellule dendritique est dite mature et commence à exprimer davantage le CMH II à sa surface ainsi que certaines molécules (IL-12, DC-SIGN, CD80, CD86). La réponse immunitaire spécifique est alors enclenchée (Weiss et al. 2010; Tizard 2018).



<u>Figure 10</u> : Processus de maturation des cellules dendritiques. Le degré de maturité des cellules dendritiques les spécialise dans une fonction particulière, du captage de l'antigène à sa présentation (Tizard 2018)

b. Modification, présentation de l'antigène et activation de la réponse immunitaire adaptative

Suite à la phagocytose ou la pinocytose des fragments antigéniques, ceux-ci se retrouvent dans le milieu intracellulaires et subissent plusieurs transformations afin d'être par la suite présentés puis reconnus par les LT.

La présentation des antigènes exogènes est régulée par les molécules du CMH II. C'est l'association de l'antigène avec des molécules de surface qui permet d'enclencher une réaction immunitaire spécifique.



Figure 11 : Processus de présentation d'un antigène exogène via le CMH II (Tizard 2018)

L'antigène va tout d'abord être fragmenté, les protéines clivées en fragments de différentes tailles par les enzymes lysosomales. Les chaînes de glycoprotéines constituantes du CMH II sont synthétisées au sein d'endosomes, puis liées à une chaîne invariante de peptides (Ii) afin de former un complexe protéique, la chaîne Ii occupant le site de liaison de l'antigène. Cette liaison permet ainsi d'éviter un transport prématuré du CMH II vers la surface membranaire avant sa liaison avec l'antigène. Par la suite, lors de la fusion des endosomes contenant les fragments protéiques antigéniques avec les molécules du CMH II, la chaîne peptidique Ii cède sa place à l'antigène (fragment peptidique de 12 à 24 acides aminés). Le complexe nouvellement formé migre ensuite vers la surface de la cellule, l'antigène est ainsi exposé au sein de ce complexe protéique du CMH II à la reconnaissance par les LT (Tizard 2018).

Les molécules du CMH II sont exprimées uniquement par les CPA, contrairement à celles du CMH I, exprimées par toutes les cellules nucléées de l'organisme. En effet, lors d'infection virale par exemple, le matériel génétique et enzymatique de la cellule hôte est utilisé afin de produire des protéines virales. Ces antigènes endogènes peuvent être reconnus par les LT et la cellule détruite, mais cette reconnaissance passe par l'association et l'expression à la surface des cellules des antigènes endogènes avec le CMH I.



Figure 12 : Processus de présentation d'un antigène endogène via le CMH I (Tizard 2018)

La voie de présentation des antigènes endogènes diffère de celle des antigènes exogènes. En effet, les peptides cellulaires sont constamment renouvelés et recyclés par la cellule, les protéines virales d'intérêt doivent donc être ciblées. Des chaînes d'ubiquitine jouent ce rôle en se fixant aux peptides viraux, marquant ainsi la protéine à dégrader. Les protéines polyubiquitinées sont clivées par les protéasomes en plusieurs fragments peptidiques de 8 à 15 acides aminés de long, avant d'être appariées à des transporteurs protéiques, jusqu'au sein des endosomes. Dans les endosomes s'en suit une étape d'association des peptides antigéniques et des molécules du CMH I, puis un transfert à la surface de la cellule. Les protéines membranaires CD1 exprimées par les CPA sont apparentées aux molécules du CMH I. Une cellule peut exprimer jusqu'à 106 peptides associés au CMH I à sa surface, et 200 peptides viraux sont nécessaires pour activer l'activité cytotoxique des LT (Paul 2013; Tizard 2018). A noter que la présentation d'antigènes non-peptidiques passe par les molécules de la famille CD1, analogues au CMH I (Owen et al. 2014).

La présentation de l'antigène s'effectue au sein des organes lymphoïdes, après une migration sous l'influence de molécules chimiotactives via le système lymphatique. La migration des cellules de Langerhans au sein des nœuds lymphatiques a été largement étudiée chez l'Homme et mise en évidence chez le chien par Marchal en 1994 (Marchal 1994). Des similitudes dans le mécanisme de migration existent, nous détaillerons ici des études portées sur l'Homme faute de données précises sur l'espèce canine.

Les CL long-terme, dérivant de précurseurs myéloïdes issus de la moelle osseuse restent à l'état immature en l'absence de captage d'un antigène. En revanche, lors d'inflammation, ce pool est renouvelé à l'aide de CL issues en partie de monocytes sanguins, le turn-over est

extrêmement rapide, ces CL restent peu de temps immatures et captent rapidement un antigène avant d'entamer une migration vers les organes lymphoïdes (Villablanca et al. 2008; Seré et al. 2012).

La migration des CL débute par une modification de la balance en cytokines du microenvironnement cellulaire. La sécrétion du TNF- α par les kératinocytes et de l'IL-1 par les CL elles-mêmes est indispensable à la dépression de la E-cadhérine, qui conduit à une perte de l'adhérence cellulaire des CL et autorise le début de leur migration. Des chimiokines telles que l'IL-16 et SLC (« Secondary Lymphoïd tissue Chemokine ») guident la migration des CL (Thilo Jakob, Mark C. Udey 1998; Cumberbatch et al. 2000; Stoitzner et al. 2002). Le passage entre les cellules de l'épiderme et du derme est facilité par les métalloprotéases sécrétées par les CL matures, lisant les protéoglycanes de la matrice extracellulaire (Van Lint et al. 2007). Le passage au sein des vaisseaux lymphatiques s'effectue via des lacunes présentes dans l'endothélium de ces derniers (Stoitzner et al. 2002). Elles entrent dans la zone paracorticale des nœuds lymphatiques, sous forme de cellules « voilées ». Ces cellules expriment davantage les complexes protéiques du CMH II ainsi que le CD40 à leur surface : elles deviennent des cellules dendritiques intégrées au paracortex et spécialisées dans la présentation d'antigène (Shortman et al. 1997).

Contrairement au reste des cellules présentatrices d'antigènes, les cellules dendritiques sont les seules cellules pouvant activer des lymphocytes T naïfs, au sein des organes lymphoïdes, n'ayant auparavant jamais rencontré aucun antigène. En effet, les cellules dendritiques matures sont capables d'assembler des complexes activant les LT, comprenant l'antigène lié aux molécules du CMH ainsi que des molécules costimulantes. La liaison aux LT naïfs via des molécules d'adhésion intracellulaires est permise par l'expression de la lectine de type C (DC-SIGN) par les cellules dendritiques matures.

La liaison aux LT s'effectue via les TCR (« T-Cell Receptor »), constitués de chaînes glycoprotéiques multiples. Quatre chaînes majeures sont retrouvées chez les Mammifères, dont une grande majorité d'association de chaînes α et β chez le chien (Holder et al. 2018). Les chaînes de liaison du TCR à l'antigène sont associées au complexe protéique CD3, effectuant la transduction du signal de reconnaissance de l'antigène. Deux autres protéines additionnelles sont présentes, CD4 et CD8, elles déterminent le type de CMH pouvant se lier au TCR. La présentation d'un peptide endogène lié au CMH I s'effectue aux LT CD8⁺ cytotoxiques, celle d'un peptide exogène lié au CMH II aux LT CD4⁺ helper.

Néanmoins, la liaison d'un antigène à son TCR n'est pas la seule condition qui permet la mise en place d'une réaction immunitaire spécifique. Des facteurs de co-stimulation comme des protéines membranaires ou certaines cytokines entrent également en jeu et vont moduler la réponse des LT. On peut citer l'association entre CD40 (CPA) et CD154 (LT), entrainant une production accrue de cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6, TNF- α . L'association de ces facteurs avec la reconnaissance de l'antigène présenté enclenche et oriente la réaction immunitaire spécifique (Delves et al. 2017; Tizard 2018).



<u>Figure 13</u> : Modalités de présentation de l'antigène aux lymphocytes T selon son origine : à gauche, antigène exogène présenté lié au CMH II, à droite antigène endogène présenté lié au CMH I (Tizard 2018)

On retrouve quasiment cent fois plus de complexes CMH II à la surface des cellules dendritiques matures qu'au niveau de la membrane des LB ou des macrophages, ainsi un faible nombre de cellules dendritiques permet d'activer un grand nombre de LT (Tizard 2018).

c. Régulation de la réponse immunitaire

Les cellules dendritiques jouent un rôle fondamental dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative, mais également dans sa modulation. Suite à la présentation de l'antigène aux LT, elles produisent un profil de cytokines qui oriente la réponse immunitaire par le biais de l'IL-12 en particulier. Produite par les CPA et les PNN (polynucléaires neutrophiles), cette cytokine joue un rôle central dans la polarisation de l'immunité, en visant les LT et les NK. La production de l'IL-12 oriente la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1, au contraire une réponse de type Th2 se développe lors de l'absence de la sécrétion d'autres interleukines (IL-2 et IL-4). C'est la nature des signaux reçus par les TLR des populations de cellules dendritiques (PAMP, DAMP) qui détermine la nature des réponses induites. La localisation spatiale des cellules dendritiques dans les différents tissus a également son rôle dans l'orientation de la réponse immunitaire (orientation Th2 préférentielle au sein de la muqueuse intestinale par exemple) (Paul 2013; Murphy et al. 2017; Tizard 2018).

Les différentes voies de maturation des LT CD4⁺ après présentation de l'antigène par une CPA sont rappelées à l'aide du schéma suivant. Il nous permettra par la suite de mieux expliciter les modalités de la réponse immunitaire au sein de l'HCC.



<u>Figure 14</u> : Voies de polarisation des LT CD4⁺ et cytokines inductrices. Les facteurs de transcription activés pour chaque type de maturation sont spécifiés, ainsi que les cytokines sécrétées par les LT effecteurs et leur mode d'action principal au sein de la réponse immunitaire (Delves et al. 2017; Tizard 2018)

Le développement des LT CD4⁺ s'effectue en fonction de la balance en cytokines du milieu. Ces cytokines activent différents facteurs de transcription (à savoir T-bet dans le cas d'une orientation Th1, GATA3 pour Th2, ROR-yT pour Th17 et FoxP3 pour TReg) chez les LT CD4⁺, modifiant leur phénotype et leur rôle au sein de l'immunité adaptative. Une orientation Th1 correspond à une immunité à médiation cellulaire (NK, macrophages, LT CD8⁺ cytotoxiques), pro-inflammatoire, dirigée contre les pathogènes intracellulaires et actrice de la réponse antitumorale. La voie Th2 est quant à elle orientée vers une réponse humorale, médiée majoritairement par les LB. Elle repose sur l'action des immunoglobulines et vise préférentiellement les agents pathogènes extracellulaires (helminthes par exemple). La voie Th17 est une voie particulièrement pro-inflammatoire, qui module également l'immunité humorale et potentialise la réponse des LB. Elle est dirigée contre les agents extracellulaires, les champignons en particulier. Cette voie de maturation peut conduire à des schémas d'inflammation chronique, ainsi qu'à des phénomènes auto-immuns (asthme, lupus, arthrite rhumatoïde). Les réponses Th17 et TReg forment un équilibre complexe, maintenant l'homéostasie au cours de l'inflammation et de la réponse immunitaire. Cette dernière voie est impliquée dans les mécanismes d'immunosuppression et d'inhibition des voies Th1 et Th2. La population de LT TReg est incluse dans les phénomènes de tolérance et d'immunosurveillance, veillant aux activations anarchiques des LT. C'est également cette population de LT CD4⁺ qui est à l'origine d'une immunomodulation favorisant le développement tumoral (Delves et al. 2017; Tizard 2018).

d. Immunité et tolérance

Les interactions entre les cellules dendritiques et les LT entraînent un schéma à deux issues possibles : la mise en place d'une réponse immunitaire ou bien l'installation d'un phénomène de tolérance. En l'absence d'inflammation, quelques cellules dendritiques matures migrent spontanément vers les organes lymphoïdes, et la reconnaissance d'antigènes normaux déclenche l'apoptose des LT : c'est le phénomène de tolérance. De plus, les cellules dendritiques en sécrétant de l'IL-10 induisent la formation de LT CD4⁺ TReg, qui contrôleront la réaction immunitaire notamment au sein des tissus, en inhibant la réponse des LT CD8⁺ et participant ainsi au maintien de l'homéostasie (Shklovskaya et al. 2011; Tizard 2018). Seneschal *et al.* ont par ailleurs mis en évidence qu'une partie de la population de cellules de Langerhans activait les LT mémoires et les LT Treg résidant au sein de l'épiderme. Cette activation s'est révélée moindre en présence de pathogènes (Seneschal et al. 2012).

Après ces rappels sur la physiologie et les caractéristiques phénotypiques des cellules histiocytaires, nous allons aborder les néoplasies liées à cette lignée, en particulier l'histiocytome cutané canin.

F. Classification des désordres histiocytaires au sein de l'espèce canine

Les désordres histiocytaires sont observés de manière fréquente au sein de l'espèce canine et toutes les cellules de la lignée histiocytaire (issues de précurseurs myéloïdes CD34⁺) semblent être impliquées. On regroupe généralement ces désordres sous le terme de « maladies histiocytaires » (Affolter et al. 2000). Les troubles de la physiologie des histiocytes non liés à l'aspect prolifératif (comme certains cas de syndrome hémophagocytaire) ou bien d'accumulation secondaire à un phénomène inflammatoire, infectieux ou néoplasique (leishmaniose par exemple) ne seront pas abordés ici.

Les proliférations histiocytaires peuvent être classées en 3 groupes en fonction de leur nature : les proliférations non néoplasiques, les proliférations néoplasiques bénignes et les proliférations néoplasiques malignes. On retrouve au sein de l'espèce canine 4 grands syndromes englobés par cette classification :

- Les histiocytoses réactionnelles cutanées et systémiques
- L'histiocytome cutané canin et l'histiocytose cutanée langerhansienne canine
- Le sarcome histiocytaire localisé
- Le sarcome histiocytaire généralisé ou disséminé

Les histiocytoses réactionnelles correspondent à une accumulation de cellules histiocytaires suite à une dérégulation du système immunitaire, ces proliférations sont non-néoplasiques. Elles affectent primairement la peau et le tissu sous-cutané, une invasion plus profonde (nœuds lymphatiques périphériques, organes thoraciques et abdominaux voire moelle osseuse) est possible dans le cas d'histiocytose systémique. Malgré le caractère non néoplasique de ces proliférations, le pronostic peut être sombre en cas d'envahissement systémique profond (Affolter et al. 2000; Coomer et al. 2008).

Certaines proliférations histiocytaires font suite à des processus néoplasiques, malin ou bénins. Les sarcomes histiocytaires sont largement rapportés chez le chien, qu'ils soient disséminés ou localisés et sont de nature maligne. Le profil immunophénotypique des cellules tumorales de ces deux syndromes étant le même, seules des considérations cliniques notamment à l'aide d'examens d'imagerie peuvent les différencier. Leur pronostic est le plus souvent sombre. Les proliférations néoplasiques bénignes sont représentées par l'histiocytose cutanée langerhansienne et l'histiocytome cutané, dont notre étude fait l'objet (Meuten 2002; Fulmer et al. 2007; Coomer et al. 2008; Dobson et al. 2011).

Dans la suite de cette étude, nous nous concentrerons sur la caractérisation plus fine de cet infiltrat immunitaire afin d'identifier plus clairement les acteurs et les mécanismes de la régression tumorale. Nous allons nous pencher sur la physiopathologie des processus tumoraux et leurs étroites relations avec le système immunitaire de l'hôte. Nous aborderons les relations complexes entre cellules tumorales et microenvironnement inflammatoire, possédant un rôle prépondérant dans le schéma « d'immunoediting » tumoral. Cette partie bibliographique nous permettra de mieux appréhender par la suite les interactions entre cellules tumorales et immunitaires au sein de l'histiocytome cutané canin.

II. Physiopathologie tumorale et interactions avec le système immunitaire

A. Modalités de la réponse immunitaire anti-tumorale

Le concept d'immunosurveillance du système immunitaire vis-à-vis des tumeurs a émergé durant les années 1950, sous l'impulsion des travaux de Burnet et Thomas. Il repose sur diverses observations, comme l'augmentation de la fréquence de certains cancers chez des individus sous traitement immunosuppresseur; ou encore l'existence d'une réponse immunitaire anti-tumorale lors de transplantation tumorale entre individus. Des expérimentations menées sur des lignées de souris mutées Rag-2, présentant un déficit en lymphocytes matures, montrent une explosion du taux de tumeurs spontanées à partir de 14 mois d'âge. Ces constatations avancent l'hypothèse de la présence d'antigènes tumoraux, et de leur reconnaissance par les LT induisant une réponse anti-tumorale : c'est le principe d'immunosurveillance (Shankaran et al. 2001; Dunn et al. 2004; Kim et al. 2007). Pourtant chez l'Homme, la grande majorité des individus qui développent des tumeurs spontanées possèdent un système immunitaire compétant. A contrario, les individus atteints d'infections immunosuppressives telles que le VIH (Virus de l'Immuno-déficience Humaine) développent un spectre de tumeurs différent. Ceci laisse supposer de la complexité des interactions entre système immunitaire et processus tumoraux, de la diversité des antigènes tumoraux existant et de la présence de phénomènes de tolérance (Tizard 2018).

La prévention du développement tumoral par le système immunitaire repose sur 3 volets. Tout d'abord, le système immunitaire prévient les tumeurs induites par des agents viraux, en élimant les infections virales. Ensuite, il élimine également les agents pathogènes (bactériens notamment) susceptibles de conduire à la mise en place de foyers inflammatoires chroniques, favorables à la tumorogénèse, comme nous le verrons par la suite. Enfin, le système immunitaire identifie et élimine spécifiquement les cellules tumorales, sur la base de la reconnaissance de l'expression d'antigènes tumoraux spécifiques ou de molécules induites par le stress cellulaire (Swann et al. 2007). La réponse anti-tumorale repose sur l'action conjointe de l'immunité innée et adaptative.

Néanmoins, la notion d'immunosurveillance ne constitue qu'une seule dimension des relations entre tumeur et système immunitaire. Des études récentes ont montré la capacité du système immunitaire à promouvoir des tumeurs primaires, avec une immunogénicité diminuée, capables d'échapper à la reconnaissance et à la destruction immunitaire. La notion d'immunosurveillance apparait parfois réductrice, on parle alors « d'immunoediting » pour désigner les interactions complexes entre cellules tumorales et système immunitaire. L'immunoediting est un processus dynamique qui comporte 3 phases : l'élimination, l'équilibre l'échappement. L'élimination représente la et phase classique d'immunosurveillance ; l'équilibre correspond une période de latence entre tumeur et système immunitaire où s'organise une immunosélection. Enfin, l'échappement constitue la phase ultime du développement tumoral, lorsque les mécanismes immunosubversifs influencés par les cellules tumorales mettent en déroute le système immunitaire de l'hôte. La mise en place d'un microenvironnement inflammatoire sur le long terme dessert également la tumeur et participe à cette phase d'échappement, tant qu'à l'initiation du développement tumoral (Dunn et al. 2004; Kim et al. 2007; Swann et al. 2007).

1. Immunosurveillance: déclenchement et orientation de la réponse anti-tumorale

Une partie de l'élimination des cellules tumorale ne dépend pas directement de la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire, il s'agit d'une surveillance non-immunogène médiée par des facteurs intrinsèques aux cellules tumorales (surveillance des erreurs génétiques notamment). L'autre partie de la surveillance anti-tumorale repose sur l'action immunitaire anti-tumorale. Elle débute par une reconnaissance des cellules tumorales, qui correspond à la mise en place de la phase d'élimination. Le processus d'élimination, médié principalement par une réponse d'origine cellulaire, inclut le concours des cellules de l'immunité innée et acquise.

Dans un premier temps, la croissance tumorale stimule les cellules de l'immunité innée, suite à la production de cytokines pro-inflammatoires (notamment l'IL-12 et l'IFN- γ) par les cellules tumorales et les cellules stromales environnantes. La destruction des cellules tumorales passe par leur identification préalable, via le récepteur NKG2D chez les NK, NKT (« Natural Killer T ») et les $\gamma\delta$ LT. L'expression du ligand NKG2D serait augmentée en cas de dommage génomique, permettant ainsi l'identification des cellules tumorales à la séquence ADN altérée, produisant des protéines de stress (Dunn et al. 2004; Zitvogel et al. 2008).

La reconnaissance des cellules tumorales est premièrement médiée par les cellules de l'immunité innée : NK, NKT, $\gamma\delta$ LT, macrophages et cellules dendritiques. Les NKT et les $\gamma\delta$ LT constituent des sous-types de LT, classés au sein de l'immunité innée. Après reconnaissance des cellules tumorales, leur action cytotoxique permet la lyse de ces dernières ; les antigènes tumoraux se retrouvent dans le milieu extracellulaire et l'immunité adaptative se met progressivement en place.

Cette mise en place passe par la reconnaissance des antigènes tumoraux, terme large englobant différents types d'antigènes. En effet, les antigènes associés aux cellules tumorales sont de nature variée, on en distingue 5 catégories :

- Les antigènes de différenciation, liés au stade de différenciation de la cellule tumorale.
 Ils comportent notamment des antigènes dits onco-fœtaux, exprimés physiologiquement par les cellules en début de développement, puis à nouveau lors de transformation néoplasique.
- Les antigènes mutés, formes anormales de protéines cellulaires.
- Les antigènes amplifiés, correspondant à des protéines normales surexprimées.
- Les antigènes viraux, codés par les génomes viraux tumoraux-inducteurs.

• Les antigènes « cancer/testis », exprimés par des tumeurs d'origine histologique différentes, et physiologiquement au sein des tissus placentaires et testiculaires. Leur fonction est encore inconnue.

Tous ces antigènes présentent des immunogénicités variables, et la vaste majorité des mutations n'entrainent pas la formation d'antigènes reconnaissables par les LT spécifiques via leur TCR lors de la mise en place d'une réponse adaptative (Dunn et al. 2004; Fratta et al. 2011; Tizard 2018).

Nous allons à présent faire un focus sur les différents acteurs et types cellulaires qui interviennent dans l'immunité anti-tumorale ainsi que les mécanismes de destruction tumorale associés.

2. Une immunité anti-tumorale principalement d'origine cellulaire

a. Rôles de l'immunité innée

La destruction des cellules tumorales passe par leur reconnaissance puis par la mise en place de mécanismes cytotoxiques. L'immunité anti-tumorale est principalement médiée par les cellules de l'immunité innée et adaptative. Le tableau ci-dessous regroupe les différentes cellules effectrices de l'immunité anti-tumorale, ainsi que leurs mécanismes d'action associés.

<u>Tableau IV</u> : Rôle des différentes cellules immunitaires à valence anti-tumorale et mécanismes d'action associés (Kim et al. 2007; Bui et al. 2007; Grivennikov et al. 2010; Tizard 2018)

Place au sein de l'immunité	Type cellulaire	Rôle anti-tumoral :
		mécanismes d'action
	Polynucléaires neutrophiles	Cytotoxicité directe (ROS,
		TRAIL, médiée par les Ac),
		régulation de l'activation
		des LT cytotoxiques
	Cellules dendritiques	Présentation des Ag
	conventionnelles	tumoraux, production de
		cytokines IL-12 et IFN-γ
	Macrophages (M1)	Présentation des Ag
Immunité innée		tumoraux, production de
		cytokines IL-1, IL-12, IFN-γ,
		TNF-α
	Natural Killer	Cytotoxicité directe,
		production de cytokines
		cytotoxiques
	Natural Killer T	Cytotoxicité directe,
		production de cytokines
		cytotoxiques
	γδ Lymphocytes T	Cytotoxicité directe,
		production de cytokines
		cytotoxiques
	Lymphocytes T CD8 ⁺	Cytotoxicité directe,
		production de cytokines
		cytotoxiques
	Lymphocytes T CD4+ Th17	Activation des LT
		cytotoxiques
	Lymphocytes T CD4 ⁺ Treg	Suppression de
Immunité adaptative		l'inflammation
	Lymphocytes T CD4 ⁺ Th1	Activation des LT
		cytotoxiques, production
		d'IFN-γ
	Lymphocytes B	Production d'Ac anti-
		tumoraux

Les cellules de l'immunité innée initient la réaction à l'encontre des cellules tumorales. L'action des CPA permet par la suite la mise en place de l'immunité adaptative anti-tumorale.

• Polynucléaires neutrophiles

Malgré leurs propriétés pro-tumorales lors de la mise en place d'une inflammation chronique, les PNN sont en premier lieu des acteurs de la phase d'élimination tumorale, possédant une action cytotoxique directe similaire à celle déployée envers les micro-organismes pathogènes. Cette cytotoxicité passe par la sécrétion de ROS, d'acide hypochloreux et d'autres composés oxydants, infligeant des dommages directs aux cellules tumorales. Ils possèdent une capacité d'induction de l'apoptose via la molécule TRAIL (« TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand »), se liant aux « récepteurs de mort » cellulaire, tels que CD95 et le TNFR (« Tumor Necrosis Factor Receptor »). Le mécanisme de cytotoxicité médié conjointement par les anticorps antitumoraux est le plus efficace. Les PNN jouent également un rôle dans l'activation des LT CD8⁺ cytotoxiques, dépriment le TGF- β et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α) (Uribe-Querol et al. 2015).

• Cellules dendritiques conventionnelles

Les cellules dendritiques conventionnelles (et de Langerhans) constituent la jonction entre immunité innée et adaptative, en captant les antigènes tumoraux libérés dans le milieu extracellulaire, puis migrant vers les nœuds lymphatiques drainant la région afin d'activer la prolifération clonale des lymphocytes, phénomène relayé et amplifié par les autres populations de cellules dendritiques présentes (folliculaires et interdigitées). Il a été démontré que la présentation des antigènes tumoraux par les cellules dendritiques variait selon le type de mort cellulaire tumorale (apoptose versus nécrose) et selon des facteurs intrinsèques aux cellules dendritiques ou bien extérieurs (cytokines) (Spel et al. 2013). Leur sécrétion de cytokines IL-12 et IFN- γ accroit également le recrutement des autres cellules anti-tumorales (Kim et al. 2007).

• Macrophages M1

Les macrophages constituent une des premières lignes de défense contre le développement tumoral. Leur recrutement s'effectue sous l'action des cytokines pro-inflammatoires (notamment l'IFN- γ) et de prostaglandines. Leur cytotoxicité passe par la production de dérivés nitrés et oxydés solubles, d'IL-1, 12 et de TNF- α . L'IL-1 est cytotoxique et limite le développement tumoral ; les macrophage possèdent également une action cytotoxique directe en induisant l'apoptose des cellules tumorales via leurs ligands aux récepteurs de mort, CD95 et TNFR (Ohno et al. 2002; Lewis et al. 2006; Tizard 2018).

Lors de l'évolution de la croissance tumorale et de la phase d'équilibre on qualifie de M1 les macrophages anti-tumoraux. Activés par les PAMP, les agonistes des TLR et l'IFN-γ produit majoritairement par les LT CD4⁺, ils entretiennent l'inflammation via la production de cytokines inflammatoires (en particulier IL-12 et 23), augmentent leur capacité de présentation de l'antigène par expression accrue des protéines du CMH I & II à leur surface. Ils possèdent une activité anti-pathogène intense, et stimulent une réponse adaptative de type cellulaire Th1 (Cheville 2009).

• NK et NKT

Les NKT sont des lymphocytes T, exprimant des marqueurs cellulaires propres aux NK et un TCR au rôle fonctionnel limité. Ils présentent des caractéristiques fonctionnelles proches des NK, tout en possédant la capacité de reconnaissance d'un complexe analogue au CMH I, le CD1d, intervenant dans la reconnaissance des antigènes lipidiques et glycolipidiques. Ces cellules ont été mises en évidence au sein de l'espèce canine (Yasuda et al. 2009).

Concernant les caractéristiques des NK, ces cellules sont considérées comme des cellules lymphoïdes du système inné. Elles possèdent une action cytotoxique, avec une sélection des cellules cibles bien moins spécifique que celle des LT et de leur TCR. La distinction des cellules anormales passe par deux mécanismes : l'absence d'expression de complexe CMH I à la surface de la cellule et la reconnaissance de protéines de stress cellulaire, produites par les cellules infectées par un agent bactérien, viral ou encore par les cellules tumorales. Cette sélection des cellules cibles est permise par de nombreux récepteurs membranaires, tels que les KIR (« Killer Inhibitory Recepteur »), les récepteurs Ly49 ou encore Fc se liant aux Ac. Les récepteurs NKG2D autorisent la reconnaissance des cellules au génome altéré produisant des protéines de stress cellulaire. L'activité des NK et NKT est accrue lors de la sécrétion d'IFN-γ, d'IL-2 et d'IL-12. A noter que les cellules NK mettent en place une boucle de stimulation autocrine par l'IFN-γ lorsqu'elles sont activées, l'IFN-γ possédant de plus des propriétés cytotoxiques, anti-prolifératives et anti-angiogéniques vis-à-vis des cellules tumorales (Kim et al. 2007; Tizard 2018).

La destruction des cellules tumorales par les NK s'effectue selon deux voies : à travers l'utilisation de perforines, granulysines et de lysine NK, ou par la voie incluant le ligand CD95L. Dans les deux cas, l'apoptose de la cellule cible est induite par fragmentation de son matériel génétique, suite à l'activation en cascade de protéases cytoplasmiques, les caspases (notamment la caspase 3). Les granules contenant ces enzymes cytotoxiques sont préformées chez les NK et retenues au sein du cytoplasme, contrairement aux LT cytotoxiques où elles sont produites en temps réel (Tizard 2018).

Les NK présentent également des interactions avec les cellules dendritiques, en activant leur maturation et leur migration vers les nœuds lymphatiques drainant le site tumoral (Zitvogel et al. 2006).

• γδ LT

Un autre sous-type de LT est également impliqué dans la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales : les $\gamma\delta$ LT. Ces LT participent à la fois à la réponse innée et adaptative. Leur TCR est composé de deux chaines peptidiques glycosylées, γ et δ , formant un site d'appariement de l'antigène, mais n'expriment pas les co-molécules CD4 et CD8 retrouvées habituellement chez les $\alpha\beta$ LT. La reconnaissance des antigènes peut s'effectuer sans présentation par les molécules du CMH, d'où une partie de leur classification au sein de l'immunité innée. On les retrouve principalement au sein des muqueuses et des épithéliums, et en plus faible quantité dans le sang chez l'Homme comme chez le chien (2.4% des LT circulants chez le chien). Leur action est cytotoxique, similaire à celle des LT CD8⁺, par

l'intermédiaire de la voie des perforines, granzymes et celle du CD95L (Ming K Heng et al. 2000; Borska et al. 2009; Tizard 2018).

L'action des cellules de l'immunité est rapidement couplée à celle des cellules de l'immunité adaptative, suite à la captation et à la présentation des antigènes tumoraux par les CPA.

b. Rôles de l'immunité adaptative

L'immunité adaptative anti-tumorale repose principalement sur une immunité à médiation cellulaire, menée par les LT CD8⁺ cytotoxiques. Les LT CD4⁺ assurent des rôles de régulation de l'inflammation et d'activation des LT CD8⁺, et orientent la réaction immunitaire vers une réaction de type cellulaire Th1 et Th17.

i. Immunité à médiation humorale

Les LB supportent l'immunité anti-tumorale de par leur rôle de présentation de l'Ag aux LT naïfs, même si leur efficacité est moindre que celle des cellules dendritiques. Ils augmentent l'activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales de manière indirecte, par la sécrétion de granzymes B et par le biais de la cytotoxicité médiée par les Ac et l'activation du complément. Leurs sécrétions de cytokines coordonnent et activent paradoxalement les LT CD8⁺. Une orientation Th2 des LT CD4⁺ au sein de certains types de tumeurs, tournée vers une stimulation de l'activité des LB, démontre leur rôle non-négligeable dans l'immunité anti-tumorale (Tsou et al. 2016; Sarvaria et al. 2017).

ii. Immunité à médiation cellulaire

• LT CD8⁺

La division des LT CD8⁺ s'effectue après un contact prolongé avec l'Ag présenté par les CPA aux LT naïfs, au sein des nœuds lymphatiques drainant la région tumorale. La cytotoxicité T est extrêmement sensible, le nombre de complexes CMH I nécessaire au déclenchement de la mort de la cellule cible est 100 fois inférieur à celui entrainant une sécrétion de cytokines. L'action cytotoxique des LT envers les cellules tumorales passe majoritairement par la voie des perforines et des granzymes, néanmoins la voie associée au ligand CD95L est retrouvée chez les LT CD8⁺. Les deux voies débouchent sur l'activation de caspase, aboutissant à la fragmentation de l'ADN et du cytosquelette cellulaire.



Figure 15 : Cytotoxicité des LT CD8⁺ : voie des granzymes et des perforines (Tizard 2018)

L'induction de l'apoptose par la voie des perforines comporte 3 phases : l'adhésion, l'induction de la mort cellulaire et l'apoptose. Le TCR lymphocytaire se lie au complexe CMH-antigène de la cellule tumorale, activant la migration des granules intra-cytoplasmiques du LT vers la synapse intercellulaire. Les granules cytoplasmiques contiennent des perforines et des granzymes (90%) ; molécules effectrices de la mort cellulaire. Les perforines sont des glycoprotéines qui vont s'inclure au sein de la membrane cellulaire de la cellule cible et permettre le passage des autres molécules létales à travers les pores ainsi formés. Les granzymes déclenchent l'apoptose via leur action directe sur l'activation des caspases et des desoxyribonucléases (Tizard 2018).

L'infiltration tumorale par les LT CD8⁺ est retrouvée dans l'étude de nombreux processus tumoraux et semble être corrélée avec un meilleur pronostic (Kim et al. 2007).

• LT CD4⁺

Le rôle anti-tumoral des LT CD4⁺ passe principalement par la production de molécules activant la reconnaissance et l'amorçage des TCR et des complexes CMH-antigène. L'action des LT CD8⁺ requière la présence absolue des LT CD4⁺. La production d'IFN- γ et d'IL-12 par les LT CD4⁺ Th1 active par ailleurs l'activité des macrophages et des PNN (Halliday et al. 1995; Corthay et al. 2005). Le rôle des LT CD4⁺ Treg est une fois de plus ambivalent, mais il semblerait que leur activité immunosuppressive puisse nuire au développement tumoral par inhibition du microenvironnement inflammatoire pro-tumoral (Erdman et al. 2005). Les LT CD4⁺ occupent donc un rôle discret mais nécessaire dans la maximisation de la réponse anti-tumorale de l'organisme (Hung et al. 1998; Grivennikov et al. 2010).

La mise est place de l'immunité anti-tumorale est progressive, elle est principalement cellulaire et passe par une coopération entre les cellules de l'immunité innée et adaptative. L'action cytotoxique des LT CD8⁺ constitue un des piliers de la réponse anti-tumorale, cette réponse est co-stimulée par d'autres cellules immunitaires et nécessite une présentation des antigènes tumoraux pour enclencher l'action des LT CD8⁺. De plus, l'action cytotoxique des NK, NKT et $\gamma\delta$ LT couplée à celle des macrophages et PNN permet une réponse précoce face au développement tumoral.



<u>Figure 16</u> : Equilibre entre immunosurveillance et inflammation pro-tumorale au sein du microenvironnement tumoral (Grivennikov et al. 2010)

Néanmoins, la présence d'un infiltrat lymphocytaire au sein des tumeurs ne garantit pas forcément une régression tumorale totale. En effet, cette élimination est rarement complète (efficacité du système immunitaire et immunogénicité des cellules tumorales variables) et à terme un environnement inflammatoire se met en place de manière chronique. Une phase d'équilibre débute alors entre le système immunitaire de l'organisme et les cellules tumorales, cette phase se traduit par des modifications des cellules immunitaires et tumorales. Durant cette période, les cellules tumorales continuent d'évoluer et d'accumuler des mutations modifiant leur génotype et phénotype, parfois dans un microenvironnement inflammatoire favorable. Leur immunogénicité peut s'en trouver altérée, par modification de la quantité

d'antigènes tumoraux disponibles par exemple. De l'autre côté, le système immunitaire exerce une pression de sélection sur les cellules tumorales, tout en contrôlant leur progression : c'est la phase d'équilibre. Cette phase est la plus longue des phases d'immunoediting et peut s'étaler sur des années voire des décennies. Pourtant, la diminution de l'immunogénicité des cellules tumorales et la sélection croissante des variants tumoraux peut conduire à l'existence de cellules tumorales capables de survivre chez un individu immunocompétent, ainsi que leur passage à la malignité. Leur multiplication, associée à des mécanismes immunosubversifs conduisant à l'absence de contrôle par le système immunitaire constitue le passage à la phase d'échappement (Kim et al. 2007; Swann et al. 2007; Tizard 2018).

B. Echappement des cellules tumorales face à la réponse immunitaire

L'émergence et la sélection de variantes tumorales aux phénotypes peu immunogènes couplées au développement de mécanismes immunosubversifs mènent à la perte de contrôle totale du système immunitaire sur la progression tumorale ; induisant le début de la phase d'échappement (Kim et al. 2007).

Des facteurs microenvironnementaux associés au développement tumoral lors de la phase d'échappement ont été mis évidence. Ces mécanismes immunosubversifs se basent principalement sur la modulation de l'activité des cellules immunitaires proches par des médiateurs immunosuppressifs solubles, exprimés en premier lieu par les cellules tumorales. On retrouve parmi eux l'IL-4, 6, 10, la PGE2 (prostaglandine E2), le TFG- β ou encore le VGEF. Ces facteurs ciblent les cellules immunitaires présentes au niveau local et régional, induisant une immunosuppression. L'immunosuppression est également entretenue par des cellules pro-tumorales, au phénotype ayant évolué au fur et à mesure de la chronicité de l'inflammation, tels que les macrophages M2, les MDSC (« Myeloïd-Derived Supressor Cells ») ou encore les LT TReg. Leurs actions immunodépressives seront détaillées dans les parties suivantes.

Principale composante anti-tumorale, la fonction des LT cytotoxiques est altérée par les facteurs environnementaux : l'hypoxie, le manque de nutriments, l'absence de sécrétion de molécules co-stimulantes par les LT helpers et la présence de cytokines suppressives limite leur action ainsi que le recrutement des LT. Le contact entre LT cytotoxiques et cellules tumorales est nécessaire à l'initiation des mécanismes d'apoptose, ce contact est limité par des modifications de la vascularisation et de la matrice extracellulaire par les cellules tumorales et pro-tumorales, bloquant ainsi leur migration et leur action. La production d'antigènes solubles par les cellules tumorales sature les TCR et déprime ainsi l'action des LT cytotoxiques. De plus, l'expression du ligand à CD95, habituellement propre aux LT cytotoxiques et NK, est retrouvée chez certaines cellules tumorales, leur conférant la capacité d'induire l'apoptose des cellules cytotoxiques. L'utilisation des protéines de l'hôte requises

pour la croissance tumorale constitue également un facteur limitant l'efficacité de la réponse tumorale (Dunn et al. 2004; Kim et al. 2007; Swann et al. 2007; Tizard 2018).

La progression des cellules tumorale, leur embolisation et le développement de métastases à distance du site primaire est alors rarement inévitable lorsque ces mécanismes pro-tumoraux sont mis en place et le système immunitaire de l'hôte fortement déprimé.

L'échappement des cellules tumorales à l'immunité anti-tumorale engagée par l'organisme constitue la dernière phase de l'immunoediting. Le microenvironnement inflammatoire, instauré par les cellules immunitaires et initialement défavorable au développement tumoral semble évoluer et être utilisé par les cellules tumorales à leur avantage, notamment lors de la mise en place des mécanismes immunosubversifs. Nous allons voir l'importance des relations entre microenvironnement inflammatoire et cellules tumorales, tant lors du développement et de l'échappement tumoral que dans son initiation.

C. Place de l'inflammation au sein des processus néoplasiques

Le possible lien entre transformation néoplasique et inflammation a pour la première fois été évoqué par Rudolf Virchow en 1863, suite à l'observation d'un infiltrat « lymphoréticulaire » au sein de certaines tumeurs. Il émit premièrement l'hypothèse selon laquelle les processus néoplasiques se développeraient préférentiellement au niveau des sites d'inflammation chronique. Mais il fit également ces observations au sein de tumeurs dont les processus infectieux ou irritatifs n'étaient pas des facteurs favorisants. Il supposa alors l'existence d'une relation réciproque entre néoplasie et inflammation, les tumeurs induisant la mise en place d'un environnement inflammatoire, pouvant à son tour favoriser le développement tumoral (Balkwill et al. 2001; Brigati et al. 2002; Rakoff-Nahoum 2006).

Au cours des deux dernières décennies, le lien réciproque entre cancer et inflammation a clairement été établi, via l'étude approfondie du microenvironnement inflammatoire des tissus tumoraux. Seulement 10% des néoplasies sont associées à des mutations germinales, la grande majorité est liée à des mutations somatiques, sous influence de facteurs environnementaux. Nombre de ces facteurs sont associés à des formes d'inflammation chronique : chez l'homme jusqu'à 20% des cancers sont liés à des infections chroniques et 30% aux polluants et irritants inhalés notamment lors de la consommation de tabac (Aggarwal et al. 2009). Inversement, l'utilisation d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens chez l'Homme est préconisée dans un grand nombre de schémas thérapeutiques contre le cancer, que ce soit dans une optique préventive ou curative (Khuder et al. 2005). Chez le chien, l'utilisation d'anti-COX (cyclooxygénase) 2 dans le cadre du carcinome transitionnelle de la vessie est préconisée. Le niveau d'expression de la COX-2, révélateur de l'intensité de l'inflammation associée peut également jouer le rôle de facteur pronostic dans le cas de certains cancers (Doré 2011). L'inflammation joue donc un rôle prépondérant dans l'oncogenèse, tant dans sa phase
initiatique que proliférative : une prolifération cellulaire seule n'engendre pas de cancer, mais c'est son association avec un microenvironnement favorisant la croissance tumorale et l'angiogenèse, riche en cellules inflammatoires et en facteurs de croissance, qui le permet (Coussens et al. 2002).

1. Inflammation et initiation tumorale

Un processus inflammatoire localisé, de long cours, secondaire à une infection ou une irritation chronique prédispose au développement d'un processus néoplasique. Cet état inflammatoire met en place un microenvironnement cellulaire favorisant l'initiation de lésions génomiques, en augmentant leur fréquence d'apparition. La lutte contre les agents infectieux et étrangers passe par la production de radicaux libres par les macrophages M1 et les PNN: dérivés oxydés (ROS et ROI), ions superoxydes et oxyde nitrique sont produits en grande quantité. Toutes ces molécules à fort pouvoir oxydant découlent d'enzymes cellulaires telles que la myélopéroxidase, activées par les signaux inflammatoires. Elles possèdent une action destructrice envers les agents pathogènes, mais leur fort pouvoir oxydatif endommage également les paires de base de l'ADN des cellules saines des tissus environnants, conduisant à une augmentation des mutations génétiques et du risque de tumorisation (Grivennikov et al. 2010). Des mutations probablement d'origine oxydative au niveau du gène codant pour le facteur de transcription p53 (régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, réparation de l'ADN), ont été retrouvées chez les cellules tumorales du cancer colorectal mais aussi chez les cellules épithéliales environnantes : ceci suggère que l'inflammation chronique est bien à l'origine de changements génomiques. La mutation du gène p53 est ainsi retrouvée dans quasiment 50% des cancers chez l'Homme, la perte de ce facteur de transcription conduit la cellule tumorale à une absence de réparation de ses lésions génomiques ou de déclenchement de son apoptose (Kraus et al. 2009). Les gènes tumoraux suppresseurs Tgfbr2 et Bax sont deux gènes se trouvant sur des séquences microsatellites du génome, souvent inactivées à la suite de mutations liées à l'altération des enzymes de réparation de l'ADN dans un contexte inflammatoire. Des modifications des mécanismes épigénétiques (altérations de l'ADNméthyltransférase dans le cas de cancers colorectaux) concourent également aux processus de transformation néoplasique des cellules environnantes lors d'inflammation chronique (Colotta et al. 2009).

Il est maintenant admis que les facteurs environnementaux physiques, chimiques, biologiques induisant une inflammation chronique et de possibles modifications génomiques ou épigénétique jouent un rôle dans le développement des processus néoplasiques : on parle de facteurs carcinogènes (Withrow et al. 2013). De nombreuses causes et facteurs de risque tumoraux sont associés à une forme d'inflammation chronique (Grivennikov et al. 2010).

2. Inflammation et promotion tumorale

Comme énoncé précédemment, la modification du génome ou de l'épigénétique d'une cellule seule n'engendre pas le développement d'un processus néoplasique. Ce développement est permis par des modifications de la physiologie cellulaire, mais également par un microenvironnement proche favorable. La production de cytokines par les cellules inflammatoires constitue le volet majeur de la favorisation de la croissance tumorale. Le microenvironnement cellulaire inflammatoire peut être initialement présent, puis induire et entretenir un processus néoplasique ; soit être secondairement induit par la tumeur, cette inflammation intrinsèque participant à son tour à la promotion tumorale (Grivennikov et al. 2010).

a. Cellules inflammatoires à rôle pro-tumoral

L'inflammation favorise aussi bien le développement tumoral que son inhibition, cette balance variant au cours des phases du développement tumoral. Bien que les cellules inflammatoires soient des composantes du système immunitaire et visent à lutter contre les agents pathogènes et les cellules anormales (dont les processus tumoraux) ; leur sécrétion de cytokines activant la croissance, la prolifération cellulaire et l'angiogenèse – acteurs de la réparation tissulaire dans des conditions physiologiques – dessert le développement de la tumeur. Les cellules de l'immunité innée, une fois stimulées, vont activer celles de l'immunité adaptative. L'orientation de la réponse immunitaire adaptative vers un type de réponse particulier (Th1, Th2, Th17 ou TReg) pourra également favoriser le processus tumoral : une orientation humorale Th2 des cellules présentera par exemple une activité anti-tumorale globale moindre. L'infiltrat inflammatoire est dense, complexe et met en place un microenvironnement cellulaire susceptible de favoriser la développement et la croissance tumorale (Grivennikov et al. 2010; Tizard 2018).

Le tableau ci-dessous fait écho au tableau de la partie précédente et présente les différentes cellules immunitaires de l'environnement inflammatoire tumoral, ainsi que les mécanismes liés à leur rôle pro-tumoral.

<u>Tableau V</u> : Rôle des différentes cellules immunitaires du microenvironnement inflammatoire favorisant l'initiation et le développement tumoral (Balkwill et al. 2001; Grivennikov et al. 2010; Gabrilovich 2017; Hatziioannou et al. 2017)

Place au sein de l'immunité	Type cellulaire	Rôle pro-tumoral :		
		mécanismes d'action		
	Polynucléaires neutrophiles	Production de cytokines		
		pro-tumorales, protéases et		
		ROS		
	Mastocytes	Production de cytokines		
Immunité innée		pro-tumorales		
	Macrophages (M2)	Production de cytokines		
		pro-tumorales		
	MDSC	Immunosuppression,		
		production de ROS et NO,		
		activation des LT Treg		
Immunité adaptative	Lymphocytes B	Production de cytokines		
		pro-tumorales, éducation		
		des macrophages,		
		immunosuppression		
	Lymphocytes T CD4 ⁺ Th1	Production de cytokines		
		pro-tumorales		
	Lymphocytes T CD4 ⁺ Th2	Production de cytokines		
		pro-tumorales, éducation		
		des macrophages, activation		
		des LB		
	Lymphocytes T CD4 ⁺ Th17	Production de cytokines		
		pro-tumorales		
	Lymphocytes T CD4 ⁺ TReg	Production de cytokines		
		pro-tumorales,		
		immunosuppression		

Le recrutement des cellules inflammatoires – principalement les macrophages, PNN, cellules dendritiques et mastocytes – s'effectue en premier lieu par la sécrétion de cytokines chimiotactiques, les chimiokines, par les cellules immunitaires tissulaires résidentes. Ces chimiokines attirent sur le site inflammatoire des cellules de l'immunité innée, puis les cellules de l'immunité adaptative (LB et LT) dans un second temps. La plupart des cellules tumorales vont sécréter des facteurs chimiotactiques similaires, chimiokines des groupes α (CXC) et β (CC). Les chimiokines CXC, telle que l'IL-8, sont de puissantes molécules attractrices de PNN. Au contraire, les chimiokines CC sont davantage dirigées vers les lymphocytes, monocytes et cellules dendritiques. Ces molécules chimiotactiques présentent également des effets prolifératifs et stimulateurs de croissance cellulaire. A noter que les cellules tumorales présentent elles-mêmes des récepteurs aux chimiokines sécrétées, ce qui participe à l'auto

entretien des signaux prolifératifs de la tumeur. Les paramètres du microenvironnement cellulaire tels que l'hypoxie influent sur le recrutement des cellules inflammatoires, comme dans le cas des macrophages associés aux tumeurs (TAM) (Balkwill et al. 2001; Rakoff-Nahoum 2006; Grivennikov et al. 2010).

• Macrophages M2

Les cellules inflammatoires les plus représentées dans le microenvironnement cellulaire tumoral sont les macrophages tissulaires tumoraux, qualifiés de TAM. Ils dérivent de précurseurs monocytaires sanguins, puis se différencient en macrophages tissulaires après extravasation vers les tissus. Ce sont les composants majoritaires du stroma tumoral. C'est au contact de la tumeur qu'ils vont présenter une orientation particulière de leur phénotype, conduisant à des rôles variés au sein de la réponse inflammatoire. Chaque macrophage polarisé déploie un profil de cytokines propre, ainsi que des enzymes et des récepteurs cellulaires spécifiques (Lewis et al. 2006; Chanmee et al. 2014). Comme vu précédemment, les macrophages sont classés en deux phénotypes après maturation : d'un côté les macrophages M1, dits « pro-inflammatoires ». Ces macrophages sont particulièrement impliqués dans les mécanismes de défense anti-tumorale (Cheville 2009).

De l'autre côté, on retrouve les macrophages M2, qualifiés de « pro-tumoraux », aux activités anti-inflammatoires et immunomodulatrices. L'orientation phénotypique des TAM est reliée au stade de développement tumoral. Orientés M1 en début de croissance tumorale, ils activent l'immunité anti-tumorale et sécrètent des facteurs anti-angiogéniques. Les marqueurs cellulaires de l'hypoxie sécrétés par les cellules tumorales et stromales vont entrainer un turn-over des TAM, les orientant vers un phénotype M2, avec sécrétions de facteurs angiogéniques, tels que le VEGF-A (Chanmee et al. 2014).

Les macrophages M2 sont divisibles en sous-classes, respectivement M2a, M2b, M2c et M2d, dont l'orientation dépend de la balance en cytokines du microenvironnement cellulaire : M2a sont activés par l'IL-4 et 13, M2b par les complexes immuns et les TLR, M2c par l'IL-10 et le TGF- β , M2d par des facteurs spécifiques aux cellules tumorales. Les sécrétions de CSF-1 (« Colony Stimulating Factor-1 ») par les cellules tumorales maintiennent une stimulation des macrophages M2 au cours du développement tumoral (Chanmee et al. 2014; Noy et al. 2014).



<u>Figure 17</u> : Les TAM M2, des cellules inflammatoires à rôle pro-tumoral : promotion de la croissance tumorale, de l'angiogenèse et de la dissémination tumorale (Noy et al. 2014)

Tous les macrophages M2 possèdent une activité pro-tumorale, qui se fonde sur deux volets : une diminution de l'immunité de l'organisme vis-à-vis des cellules tumorales d'une part et une stimulation de l'angiogenèse, de la croissance et la dissémination tumorale d'autre part. Les capacités de présentation de l'antigène sont quasi-inexistantes chez les macrophages M2, leur sécrétion d'IL-10 et de TGF- β contribue à une suppression de la réponse des LT CD8⁺ cytotoxiques. L'angiogenèse est stimulée par la production de FGF (« Fibroblast Growth Factor »), d'adrénoméduline et de thymidine phosphorylase. La migration des cellules tumorales et notamment leur entrée au sein de la circulation sanguine ou lymphatique passe par la production de l'EGF (« Epidermal Growth Factor ») sécrété par les macrophages M2 (Chanmee et al. 2014).

Chez l'Homme, un fort taux d'infiltration tumoral par les TAM constitue un marqueur pronostic défavorable chez certains cancers, comme dans le cas du carcinome mammaire ou rénal (Leek et al. 1996; Hamada et al. 2002).

• Cellules myéloïdes suppressives (MDSC)

Les MDSC sont un groupe de cellules immatures dérivant de précurseurs myéloïdes, retrouvées au sein de l'environnement tumoral proche. On connait depuis plusieurs années le rôle immunosuppresseur de certaines cellules myéloïdes, regroupées sous le terme de MDSC depuis une dizaine d'années. Les MDSC sont divisées en deux groupes, l'un rassemblant

les cellules à morphologie et phénotype proche des monocytes (M-MDSC) et l'autre celles polynucléaires (PMN-MDSC). Leurs différences morphologiques proches des et immunophénotypiques avec les cellules dérivant physiologiquement de la lignée myéloïde (PNN et monocytes principalement) sont très faibles, peu de marqueurs connus permettent à ce jour de les différencier. Les M-MDSC sont très proches des macrophages malgré de faibles différences phénotypiques, on considère qu'ils se différencient ensuite en une partie des TAM à activité immunosuppressive. Les PMN-MDSC représentent environ 80% des MDSC dans les cas de cancer chez l'Homme. Ces cellules ne sont pas présentes chez les individus en bonne santé, et apparaissent lors des situations de stress, d'inflammation chronique ou encore de processus tumoraux. Leur présence a été établie chez le chien. Leur accumulation est un phénomène complexe, combinaison de deux types de signaux distincts : l'un de prolifération des cellules myéloïdes immatures, le second de différenciation pathologique de ces cellules. Le premier signal est majoritairement conduit par des facteurs de croissance tumoraux et active les facteurs de transcription STAT3, IRF8 ou C/EBPB. Le second est médié par des molécules produites par les cellules inflammatoires du stroma tumoral : COX-2, PGE2 et cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α). L'attraction des MDSC sur le site inflammatoire s'effectue par l'intermédiaires des chimiokines CCL2 et CCL5, ainsi que par les protéines du complément comme C5a (Markiewski et al. 2008; Gabrilovich et al. 2012; Hatziioannou et al. 2017; Gabrilovich 2017).

La caractéristique fonctionnelle principale de ces cellules repose sur leur aptitude à moduler voire à supprimer la réponse immunitaire. Ces mécanismes concourent au développement tumoral : stimulation de sa croissance, de l'angiogenèse, de la transition épithéliomésenchymateuse et de la dissémination métastatique. Le mécanisme principal d'action des MDSC repose sur la sécrétion de ROS et d'oxyde nitrique, ainsi qu'à la privation des lymphocytes en acides aminés essentiels. Il en résulte une inhibition du développement et de l'action des LT CD8⁺ cytotoxiques et des NK, de l'induction de leur apoptose et une activation des LT Treg à rôle pro-tumoral (Gabrilovich 2017; Hatziioannou et al. 2017).

• Polynucléaires neutrophiles et mastocytes

A propos des PNN, le rôle pro-tumoral de ces cellules de l'immunité innée se base surtout sur la production de molécules oxydantes (ROS, ROI, NO) et de radicaux libres, à l'origine d'un stress oxydatif et de perturbations génomiques et épigénétiques. L'action pro-tumorale des mastocytes repose principalement sur la production de cytokines pro-tumorales, influençant positivement la croissance tumorale (Grivennikov et al. 2010).

• Cellules de l'immunité adaptative : LB et populations de LT

Les cellules de l'immunité adaptative concourent elles-aussi aux mécanismes pro-tumoraux, en particulier les LT CD4⁺. Les LT CD8⁺ possèdent une activité cytotoxique orientée contre les cellules tumorales, mais les cytokines et facteurs de croissance produits par les LT CD8⁺ supportent la croissance tumorale. Les LB produisent de l'IL-10 et 35 qui favorisent la croissance tumorale, et un rôle de « reprogrammation » des macrophages a été mis en évidence chez ces cellules : les LB se fixent sur la partie Fc des récepteurs aux IgG des macrophages et induisent leur orientation vers un phénotype M2 pro-tumoral par l'action d'une kinase BKT (Seiller et al. 2017).

La majeure partie de l'infiltrat immunitaire tumoral est composée de TAM et de LT CD4⁺. Les deux grandes orientations des LT CD4⁺ sont les voies de stimulation de l'immunité cellulaire (Th1) ou humorale (Th2). L'activité anti-tumorale étant principalement médiée par les cellules cytotoxiques (LT CD8+ et NK) de la voie Th1, cette voie peut se trouver déprimée par les cellules tumorales au profit de la voie Th2, peu active contre le développement tumoral. Chez l'Homme, un fort rapport CD4⁺/CD8⁺ et Th2/Th1 est corrélé avec un mauvais pronostic dans le cas des carcinomes mammaires. Le recrutement des LT TReg sur le site tumoral passe le biais de chimiokines tumorales telles que CCL2, CCL5, CCL28 et CXCL12. Les cytokines TGF- β et IL-10 activent la maturation des LT TReg, le TNF- α leur prolifération. Ces cellules constituent avec les TAM les principales cellules pro-tumorales : elles possèdent des fonctions immunomodulatrices vis-à-vis des autres LT CD4⁺ et CD8⁺, des NK et des cellules dendritiques, induisant une tolérance du système immunitaire envers le développement tumoral (Kohrt et al. 2005; Grivennikov et al. 2010).

Les LT TReg ciblent les cellules de la réponse immunitaire anti-tumorale. Leurs différents mécanismes immunosuppresseurs sont illustrés à l'aide du schéma suivant.



<u>Figure 18</u> : Rôle immunosuppresseur des LT TReg au sein du microenvironnement tumoral (Hatziioannou et al. 2017)

L'inhibition de la prolifération des LT CD4⁺ passe l'induction de la COX et la production de prostaglandine PGE2. La sécrétion de CTLA-4 (« Cytotoxic T-Lymphocyte associated Antigen 4 ») par les LT TReg cible spécifiquement l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ : elle est déprimée, tout comme la production d'IFN- γ , cytokine inductrice de la voie des LT CD8⁺ (Th1). L'activité pro-inflammatoire des cellules dendritiques est également inhibée, par l'action du TGF- β et de l'IL-10. L'action des perforines et des granzymes B induit l'apoptose des NK, ainsi qu'une suppression de leur cytotoxicité par liaison membranaire du TGF- β . L'immunosuppression par apoptose des cellules immunitaires constitue, dans des conditions physiologiques, un mécanisme de contrôle et de tolérance. La favorisation de ces mécanismes lors de processus néoplasique par les cellules tumorales concoure à leur échappement vis-à-vis de la réponse immunitaire (Grivennikov et al. 2010; Hatziioannou et al. 2017).

b. Influence du microenvironnement et de la balance en cytokines

Le profil d'expression des cytokines du microenvironnement tumoral constitue la composante majeure orientant les mécanismes des processus néoplasiques, au-delà de la composition de la population de cellules inflammatoires.

L'influence des cellules inflammatoires sur la croissance tumorale repose sur la sécrétion de cytokines, en particulier de TNF- α , de l'IL-1, 6 et 23. Ces cytokines entrainent l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et STAT3 chez les cellules tumorales, ciblant des gènes induits dans des mécanismes de réduction de l'apoptose et d'activation de la prolifération cellulaire. Leurs rôles sont nombreux et largement étudiés sur des modèles murins : leur activation augmente la survie des cellules tumorales, leur croissance, leur prolifération, l'angiogenèse tumorale et à terme leur dissémination au sein de l'organisme. L'inactivation du NF- κ B chez des clones de cellules épithéliales intestinales par inhibition de la I κ B kinase β chez des souris a substantiellement réduit le nombre de cancer colorectaux developpés (Greten et al. 2004). L'activation de ces facteurs de transcription entraine la mise en place d'une boucle d'autoentretien de la stimulation tumorale, leur activation stimule la sécrétion de chimiokines et l'attraction d'autres cellules inflammatoires sur le site tumoral.



<u>Figure 19</u> : Inflammation et processus néoplasique : initiation et promotion tumorale par les cellules inflammatoires, place clé des cytokines (Grivennikov et al. 2010; Tizard 2018)

Le TNF- α est le principal médiateur majeur de l'inflammation, et constitue une des cytokines pilier de la croissance tumorale malgré sa double action: il induit l'apoptose des cellules anormales (d'où il tire sa dénomination) et stimule la régénération tissulaire. Physiologiquement, cette action proliférative cible les cellules impliquées dans l'angiogenèse ainsi que les fibroblastes. Or une partie des cellules tumorales échappe aux mécanismes d'apoptose et voit en parallèle sa croissance stimulée par cette cytokine. Ainsi, la production chronique de ce médiateur, en particulier par les macrophages M2, permet le développement d'un stroma et d'une vascularisation favorisant la croissance et la dissémination des cellules néoplasiques. Ce médiateur est également impliqué dans la production de la protéine P1, possédant un effet chimiotactique positif sur les monocytes et les lymphocytes. Le TNF- α est souvent associé aux IL-1, 6 et au M-CSF, induisant une boucle de stimulation autocrine et de sécrétion par les macrophages M2 du microenvironnement tumoral (Balkwill et al. 2001; Wang et al. 2008; Grivennikov et al. 2010). L'IL-6, sécrétée par les macrophages, les cellules épithéliales et les fibroblastes promeut elle aussi la croissance tumorale et l'angiogenèse.

Au sein des processus néoplasiques, on retrouve majoritairement une orientation de la réponse immunitaire de type Th2 ou Treg, orientation influencée par les sécrétions en

cytokine des cellules tumorales. Cette orientation de la réponse se traduit en retour par la sécrétion d'un profil de cytokines pro-tumorales par les LT Treg : il en résulte une immunosuppression locale, ainsi qu'une forte stimulation de la croissance tumorale et de l'angiogenèse. La perte de l'expression de l'IL-10 par les LT Treg marque le passage d'un état anti-inflammatoire à pro-inflammatoire (Khazaie et al. 2011; Tizard 2018).

3. Inflammation et dissémination tumorale

La découverte de cellules tumorales à distance du site néoplasique initial constitue le critère absolu de malignité tumorale. La production d'emboles, leur dissémination par voie sanguine ou lymphatique et l'initiation de la croissance sur un second site constituent des étapes cruciales du processus métastatique (Grivennikov et al. 2010).

L'angiogenèse est une étape clef de la dissémination métastatique, la vascularisation de la tumeur étant nécessaire à sa croissance, les vaisseaux faisant également office de voies de dissémination. Les TAM, les PNN et les mastocytes contribuent à l'angiogenèse par le biais de la sécrétion de cytokines, facteurs de croissance et de molécules autorisant la mobilité des cellules tumorales. On retrouve parmi ces facteurs des molécules telles que le VEGF-A, des métalloprotéases matricielles, des cathepsines et des protéases à sérine. Ces protéases clivent les jonctions serrées entre les cellules tumorales, jonctions permises par des protéines d'adhésions transmembranaires telles que la E-cadhérine (Joyce et al. 2009). La perte de l'adhésion cellulaire autorise alors le début de la mobilité des cellules tumorales : on parle de transition épithélio-mésenchymateuse. Ce point du processus métastatique est considéré comme crucial et fait l'objet de nombreuses recherches afin de limiter cette étape de dissémination tumorale. Dans certains types tumoraux, l'expression de la E-cadhérine par les cellules tumorales semble être dépréciée, les cellules perdent alors leur cohésion et entame leur dissémination (Strumane et al. 2004).

De plus, la dégradation des protéines matricielles ne repose pas uniquement sur une action enzymatique, une modification de leur turn-over par les cellules tumorales a également été démontrée. La perméabilité des vaisseaux sanguins et lymphatiques, qui autorise l'embolisation des cellules tumorales est secondaire à l'action de ces protéases. L'orientation des cellules tumorales vers la circulation s'effectue en partie via une boucle de stimulation paracrine impliquant les TAM. Les TAM sécrètent les facteurs CSF-1 et l'EGF, régulant la migration tumorale. La direction de migration est sous l'influence de facteurs chimiotactiques, elle s'effectue selon des gradients de chimiokines α (CXC) et β (CC) (Bonecchi et al. 2009; Joyce et al. 2009; Grivennikov et al. 2010).

Une fois la circulation intégrée, la survie des cellules tumorales dépend encore des facteurs inflammatoires du microenvironnement tumoral : TNF- α , IL-6 et EGF jouent un rôle certain dans le maintien des emboles tumorales. Le tropisme tissulaire de certaines tumeurs est avéré en médecine humaine et vétérinaire, néanmoins les bases de ces mécanismes sont peu connues. Il est supposé qu'encore une fois, le microenvironnement du site de métastatique impacte la fixation des cellules cancéreuses (Joyce et al. 2009).

L'inflammation joue donc un rôle prépondérant dans la physiopathologie tumorale, que ce soit par son rôle d'initiation, de promotion et d'entretien de la tumeur. Les mécanismes de développement des processus néoplasiques reposent en grande partie sur les interactions avec le microenvironnement inflammatoire proche, régis par les cellules de l'infiltrat immunitaire. Ceci nous montre l'importance et le caractère évolutif de ce microenvironnement : ce dernier peut être à l'origine de la formation de cellules néoplasiques, mais également à plus long terme favoriser la malignité et l'échappement visà-vis de la réponse immunitaire, par des mécanismes d'immunosélection, d'immunodépression et d'immunosubversion. Les cellules immunitaires et les médiateurs solubles en jeu possèdent des rôles ambivalents, leurs interactions et régulations fines amènent à l'élimination de la tumeur, sa mise en dormance ou encore son inexorable développement. Ces considérations nous permettront de mieux appréhender les interactions existantes entre cellules immunitaires et tumorales au sein de l'histiocytome cutané canin.

Avant d'entamer une partie expérimentale, nous allons à présent expliciter de manière approfondie la physiopathologie de l'HCC, à travers une étude épidémiologique, clinique, éthiopathogénie, histologique et phénotypique de ce désordre histiocytaire canin le plus fréquemment rencontré par les vétérinaires praticiens.

III. L'histiocytome cutané canin

A. Historique et définition

Le terme d'histiocytome a été pour la première fois évoqué en 1948 par Mulligan, et correspond aux tumeurs dont l'infiltrat tumoral est associé à des cellules possédant les caractéristiques morphologiques des histiocytes (Goldschmidt et al. 1992). Néanmoins, à cette époque-ci, la faible utilisation des immunomarquages ne permettait pas de différencier autre que morphologiquement les cellules appartenant à la lignée histiocytaire.

Initialement, l'histiocytome cutané canin n'était pas considéré comme dérivant des cellules de Langerhans étant donné l'absence de granules de Birbeck. Néanmoins, les études morphologiques, ultra structurales et immunophénotypiques menées dans les années 90 ont permis de préciser l'origine langerhansienne des proliférations histiocytaires cutanées canines (Marchal, Dezutter-Dambuyant, et al. 1995). De plus l'absence de granules de Birbeck n'est pas totale chez le chien, des inclusions similaires dans le cytoplasme des cellules de Langerhans ont été mises en évidence (Marchal et al., 1993).

L'histiocytome cutané canin résulte donc d'une prolifération clonale de cellules à la morphologie et au phénotype proche de celui des cellules de Langerhans, mise en évidence par un test de clonalité lié au chromosome X (Delcour et al. 2013). A la lumière de la classification des désordres histiocytaires réalisée chez l'Homme par Favara *et al*. en 1997 et agrée par l'OMS, on peut classer l'HCC parmi les désordres histiocytaires primaires, liés à un

dysfonctionnement intrinsèque des histiocytes, et non pas à leur accumulation tissulaire secondaire à un stimulus extrinsèque (Favara et al. 1997; Affolter et al. 2000). Récemment, l'équipe de Chatterjee *et al.* a réussi à mettre au point un marqueur cellulaire, la MAP (« Mitogen Activated Protein »), utilisé en médecine humaine afin de différencier prolifération histiocytaire et histiocytose primaire vraie (Chatterjee et al. 2018).

B. Ethiopathogénie et étude clinique

1. Ethiopathogénie

L'étiologie précise de l'histiocytome cutané canin a suscité de nombreuses recherches et théories au cours du siècle dernier. Son caractère auto-involutif et l'atteinte prépondérante des jeunes chiens ont longtemps laissé supposer une origine virale, sans exclure une origine infectieuse, bactérienne ou fongique. Le caractère transmissible de cette tumeur a également fait l'objet de spéculations, à l'instar d'une prolifération histiocytaire transmissible connue, la tumeur vénérienne transmissible canine (sarcome de Sticker). Dans cette affection, la transmission s'effectue par transposition des cellules néoplasiques d'un individu à un autre (Ganguly et al. 2016). Taylor réalisa en 1969 une étude rétrospective sur 520 cas d'histiocytomes cutanés canins et tenta de mettre en évidence une éventuelle transmissibilité intra et inter-espèce en réalisant des inoculations sous-cutanées, dermiques, intraoculaires et intracrâniennes de cellules tumorales d'HCC à de jeunes chiens, fœtus canins et hamsters immunodéprimés. Cette hypothèse de transmissibilité s'est révélée négative, tout comme la recherche d'un éventuel agent infectieux viral, bactérien ou fongique (Taylor et al. 1969).

Les histiocytomes sont des processus tumoraux à point de départ dermique, cantonnés du derme profond jusqu'à la jonction dermoépidermique et pouvant parfois présenter des infiltrats intraépidermiques (Maxie 2016). Il semblerait donc que l'origine même des cellules tumorales ne soit pas les cellules de Langerhans, épidermiques, mais plutôt des précurseurs dermiques immatures exprimant le CD14 comme supposé dans les recherches de Larregina et *al.* en 2001 sur des cellules humaines. Ces précurseurs myéloïdes proviendraient de la moelle osseuse, rejoindraient le derme profond et superficiel puis les couches supérieures de l'épiderme sus-jacent après différenciation en cellules de Langerhans, différenciation des cytokines du microenvironnement qui oriente la maturation de ces précurseurs en cellules de Langerhans (Larregina et al. 2001; Moore 2014). Ces mêmes mécanismes sont probablement transposables au chien et expliqueraient en partie le mode de repeuplement de l'épiderme en cellules de Langerhans fonctionnelles.

Ces néoplasies cutanées sont bénignes et seul un faible pourcentage de métastases limitées au nœud lymphatique drainant la région de présence de l'HCC a été rapporté. Ces métastases rendent principalement difficile la distinction diagnostic avec les sarcomes histiocytaires. La perte de l'expression de la protéine d'adhésion transmembranaire, la E-cadhérine, semblerait être la condition nécessaire à la migration des cellules tumorales vers le nœud lymphatique locorégional, mécanisme de migration physiologiquement retrouvé chez les cellules de Langerhans saines lors de l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. L'expression de la E-cadhérine semble également suivre un gradient décroissant en fonction de la profondeur cutanée, de la jonction dermoépidermique vers le derme profond (Baines et al. 2008). Les métastases sont davantage fréquentes (43% dans l'étude de Moore et al., 2016) lors d'histiocytose cutanée multiple, néoplasie langerhansienne dont la forme clinique rappelle celle de l'HCC, mais en de multiples localisations (Moore et al. 1996; Faller et al. 2016).

Ces histiocytomes multiples affectent systématiquement les tissus cutanés et sont regroupés sous le terme d'histiocytose cutanée langerhansienne canine (HCLC), et peuvent parfois présenter une atteinte plus profonde voire systémique. Ces tumeurs multiples représentent moins de 1% des cas rapportés, le Shar Pei semble y être prédisposé (Goldschmidt et al. 1992). Notre étude inclue uniquement des HCC et l'histiocytose cutanée langerhansienne n'y sera pas développée, néanmoins il faut savoir que c'est cette forme d'histiocytose qui semble avoir la plus forte prévalence chez l'Homme (Simko et al. 2014).



<u>Figure 20</u> : Lésions cutanées multiples chez un chiot femelle Teckel de 8 mois atteint d'une histiocytose cutanée langerhansienne canine (Nagata et al. 2000)

L'HCC reste dans la grande majorité des cas une néoplasie cutanée bénigne et auto-résolutive. Après une phase d'expansion, caractérisée histologiquement par de nombreuses figures de mitose retrouvées chez les cellules tumorales, la masse tumorale est progressivement infiltrée de manière centripète par des lymphocytes et des macrophages, se regroupant focalement en amas puis diffusément dans l'ensemble de la tumeur au cours de la régression tumorale (Cockerell et al. 1979). L'infiltration lymphocytaire en fin de régression tumorale est parfois si dense que le pathologiste peut orienter son diagnostic vers un lymphome T nonépithéliotrope, du fait du faible nombre de cellules tumorales restantes au sein de l'infiltrat immunitaire. L'immunophénotypage des cellules tumorales reste un recours de choix pour établir le diagnostic (Moore 2014; Maxie 2016).

L'infiltrat inflammatoire est principalement constitué de lymphocytes CD8⁺ ou CD4⁺, ainsi que de cellules immunitaires exprimant des marqueurs cellulaires caractéristiques de la lignée histiocytaire, des macrophages principalement. La caractérisation plus fine de la population immunitaire présente et son évolution durant les différentes phases tumorales constitue le but de cette étude et sera approfondie par la suite.

Les mécanismes menant à une régression tumorale sont nombreux, complémentaires et restent à clarifier. Une décroissance de l'expression de la E-cadhérine au sein de l'HCC lors de sa régression a été mise en évidence, ainsi que l'augmentation de l'expression membranaire du complexe CMH II par les cellules tumorales. La maturation du phénotype cellulaire semble donc être corrélée avec le stade de régression de la tumeur. Il apparait par ailleurs que cette acquisition par les cellules tumorales d'un phénotype de cellules dendritiques matures aptes à enclencher la réponse immunitaire spécifique pourrait constituer un mécanisme majeur de la régression tumorale (Kipar et al. 1998; Pires et al. 2009; Pires, Rodrigues, et al. 2013). L'orientation de la réponse immunitaire adaptative vers une réponse Th1, médiée par les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺, avec une augmentation des cytokines associées (IL-2, IFN- γ , TNF- α) et de l'ARNm de la iNOS (« inducible Nitric Oxid Synthase ») est retrouvée au sein des HCC en régression. Le recrutement accru de ces cellules anti-tumorales telles que les LT CD8⁺ et les macrophages conduirait à une régression tumorale efficace (Kaim et al. 2006). L'expression des métalloprotéases matricielles (MMP) et de leurs inhibiteurs tissulaires a été évaluée selon le stade de régression tumorale dans différentes études et leur influence mise en avant. Les stades tumoraux les plus avancés montrent une augmentation de l'expression des MMP (en particulier de MMP-9), rattachable aux modifications des cytokines environnementales. Les MMP jouent un rôle dans l'augmentation du recrutement des lymphocytes en participant à la dégradation des protéines matricielles extracellulaires et des membranes basales (Puff et al. 2013; Fayyad et al. 2018). L'évaluation de la prolifération cellulaire via le Ki67 ainsi que de l'apoptose via la méthode TUNEL n'a pas permis d'établir de résultats clairs quant à la régression de l'HCC. Plutôt qu'une augmentation significative de l'apoptose ou une diminution franche de la prolifération cellulaire au sein de la tumeur, un déséquilibre entre ces deux paramètres semble aboutir à une régression tumorale (Dobson et al. 2011; Pires, Alves, et al. 2013; Maxie 2016; Raskin et al. 2016).

2. Etude clinique

L'histiocytome cutané canin est caractérisé macroscopiquement par une unique lésion cutanée focale, ronde, en forme de dôme, bouton ou plaque, extrêmement bien délimitée, non adhérente aux plans profonds. Sa croissance est exophytique, généralement accompagnée d'une alopécie partielle ou totale, ainsi que d'une zone d'ulcération centrale. L'abrasion de la lésion est fréquente. L'apparition des lésions est rapide (1 à 4 semaines), tout comme leur croissance, pouvant donner lieu à des tumeurs allant jusqu'à 4 cm de diamètre (Miller et al. 2013). Néanmoins, la majorité des lésions mesurent entre 1 et 2 cm de diamètre (Dobson et al. 2011; Maxie 2016; Raskin et al. 2016).



<u>Figure 21</u> : Lésion d'histiocytome cutané au niveau de l'épaule d'un chien croisé Bull Terrier de 6 ans et demi (Service de dermatologie de VetAgroSup, Campus Vétérinaire de Lyon)

Ce processus tumoral affecte plus fréquemment certaines zones cutanées, à savoir la face, les pavillons auriculaires, le cou, les membres et la queue. Néanmoins des localisations sur l'ensemble du corps sont rapportées (Goldschmidt et al. 1992; Morrison 2002; Maxie 2016).



<u>Figure 22</u> : Lésion d'histiocytome cutané au niveau de la face d'un Bouledogue français de 4 ans. Notez la localisation préférentielle (face) et l'aspect ulcéré de la lésion (Service de dermatologie de VetAgroSup, Campus Vétérinaire de Lyon)

C. Epidémiologie

Majoritairement rencontrée chez les chiens de moins de 3 ans mais décrite chez les chiens de tout âge, l'HCC est une tumeur cutanée commune, représentant 8.4 à 17.9% des tumeurs cutanées canines selon la littérature (Taylor et al. 1969; Dobson et al. 2011; Withrow et al. 2013; Maxie 2016). L'incidence de l'HCC après 3 ans chute de manière brutale (Moore 2014).

Les cas d'HCC sont davantage rapportés chez les mâles entiers dans l'étude de Goldschmidt *et al.* (33,4% des cas, n=3497, (Goldschmidt et al. 1992)). Néanmoins il n'y a pas de consensus actuel quant à l'influence du sexe sur l'apparition de cette pathologie chez le chien.

En revanche les chiens de race pure sont clairement prédisposés, on note un prévalence accrue chez les chiens de type brachycéphale tels que le Boxer ; le Pinscher, le Cocker Spaniel, le Teckel, le Bull Terrier, le Scottish Terrier et le berger Shetland sont également prédisposés (Goldschmidt et al. 1992; Ogilvie et al. 1997; Dobson et al. 2011).

D. Examens complémentaires et diagnostic de certitude

Devant une tumeur cutanée, les possibilités diagnostiques sont nombreuses et nécessitent la réalisation d'examens complémentaires – au chevet de l'individu (cytologie) ou en laboratoire d'anatomopathologie vétérinaire (histologie) – afin de poser un diagnostic adéquat.

1. Etude cytologique

La présentation cutanée de l'HCC en fait une tumeur facilement accessible afin de réaliser un examen cytologique.

A l'examen cytologique, l'HCC est une tumeur à cellules rondes et pléomorphes. L'anisocytose et l'anisocaryose ne sont pas caractéristiques de ce type tumoral, les contours cellulaires sont distinctement marqués. Leur cytoplasme est pâle et abondant, légèrement éosinophilique. Le noyau des cellules tumorales est réniforme, rond voire ovalaire, tend à être vésiculaire. Il présente un diamètre égal à 1.5-2 fois celui des globules rouges. Le nucléole est rarement discernable, la chromatine parfois indentée (Glick et al. 1976; Maxie 2016; Raskin et al. 2016). L'aspect des cellules tumorales présente des variations en fonction du stade d'infiltration de la tumeur, des signes de dégénérescence cellulaire (vacuolisation du cytoplasme, cellules géantes plurinucléées, atypies nucléaires, images de pycnose et de caryorrhexis) sont observés lorsque l'infiltrat lymphocytaire est conséquent (Cockerell et al. 1979).



<u>Figure 23</u> : Examen cytologique des cellules tumorales de l'histiocytome cutané canin (Raskin et al. 2016)

2. Etude histologique

A l'examen histologique, les cellules tumorales sont concentrées en une large plage allant du derme profond, quasi-panniculaire, jusqu'à la jonction dermoépidermique, où elles s'organisent progressivement en rangs.



<u>Figure 24</u> : Envahissement du derme par des plages d'histiocytes tumoraux. Notez la présence de cellules tumorales de la jonction dermoépidermique jusqu'au pannicule du derme profond ; coloration hématoxyline-éosine, Gx50

Les infiltrats intraépidermiques sont présents dans 19% à plus de 75% des cas selon les études (Moore et al. 1996; Moore 2014; Paździor-Czapula et al. 2015; Maxie 2016).



<u>Figure 25</u> : Infiltrats intraépidermiques d'histiocytes tumoraux (flèche rouge). Notez la déformation de la membrane basale de l'épiderme par les cellules tumorales (flèche noire) ; coloration hématoxyline-éosine, Gx400

Les capillaires sanguins dermiques sont entourés, déplacés, mais non détruits par les cellules tumorales. L'index de prolifération tumorale est important, particulièrement durant de la phase d'expansion tumorale (Maxie 2016).



<u>Figure 26</u> : Plage d'histiocytes tumoraux, avec présence de nombreuses figures de mitose (flèches noires) ; coloration hématoxyline-éosine, Gx400

Des zones d'ulcération superficielles et de nécrose, riches en débris cellulaires, polynucléaires neutrophiles, macrophages et lymphocytes sont très fréquemment observées.



<u>Figure 27</u> : Zone d'ulcération superficielle d'une lésion d'histiocytome cutané canin ; coloration hématoxyline-éosine, Gx200

La mise en place de l'infiltrat inflammatoire est progressive, tout d'abord péri-tumorale, puis intra-tumorale, sa progression est centripète. Les zones de nécrose tumorale accompagnent la progression de l'infiltrat (Cockerell et al. 1979; Moore 2014).



<u>Figure 28</u> : Evolution de l'infiltration lymphocytaire au sein de l'histiocytome cutané canin. A gauche, un nodule d'infiltration lymphocytaire (flèche noire) commence à se mettre en place au sein d'une plage de cellules tumorales ; coloration hématoxyline-éosine, Gx50. A droite, une lésion d'HCC en régression, toute la tumeur est infiltrée par des lymphocytes ; coloration hématoxyline-éosine, Gx100

Les zones de nécrose sont réparties de manière multifocale au sein de la tumeur, elles sont caractérisées par des figures de condensation et fragmentation nucléaire chez les histiocytes tumoraux. Une bande d'œdème peut également être retrouvée entre l'épiderme et la masse tumorale. De rares infiltrations éosinophiliques de la tumeur sont parfois rapportées (Goldschmidt et al. 1992).



<u>Figure 29</u> : Foyer de nécrose riche en débris cellulaires inclu au sein d'une large plage de cellules tumorales ; coloration hématoxyline-éosine, Gx200

Comme vu précédemment, en cas d'infiltration lymphocytaire importante des confusions diagnostiques peuvent être réalisées avec des formes de lymphomes, non-épithéliotrope notamment (Moore 2014; Maxie 2016). L'étude immunophénotypique est alors indispensable à l'établissement du diagnostic de certitude.

3. Etude immunophénotypique : diagnostic de certitude

Le profil phénotypique des cellules tumorales de l'HCC s'est largement affiné au cours des dernières années. L'immunophénotypage réalisable au niveau de l'HCC varie en fonction du mode de conservation des tissus; le plus complet étant obtenu à partir d'échantillons congelés de tissus (Moore 2014).

Les cellules tumorales expriment des protéines membranaires spécifiques aux cellules dendritiques et aux leucocytes telles que CD1a, CD11a/CD18, CD11c/CD18, CD44, CD45 et le CMH II caractéristique des cellules présentatrices d'antigène. L'expression du CD54 et CD11b/CD18 est variable, mais elles n'expriment pas le Thy-1 et le CD45A (Moore et al. 1996; Fulmer et al. 2007; Looringh van Beeck et al. 2008).

Quant à l'expression de la E-cadhérine par les cellules tumorales, elle est discutée selon les travaux. Tout d'abord, les anticorps utilisés et dirigés contre cette protéine membranaire sont de nature très variable au sein des études. Ensuite, une variabilité de son expression par les cellules de l'HCC est rapportée et cette expression est parfois difficilement distinguable de celles des cellules environnantes, telles que les kératinocytes (Baines et al. 2008; Pires et al.

2009). De plus, la E-cadhérine peut être utilisée en tant que marqueur des cellules de Langerhans, mais pas en tant que marqueur spécifique, certaines lignées de cellules rondes cutanées l'exprimant également (J. A. Ramos-Vara et al. 2011). Néanmoins, l'utilisation du marqueur CD90 et de la E-cadhérine peut être utile afin de déterminer l'origine cellulaire de certaines proliférations de cellules dendritiques (CD90⁺) ou de cellules de Langerhans (E-cadhérine⁺) si la nature histiocytaire est déjà établie (Moore 2014). Au travers de ces études, il a été démontré que le phénotype des cellules tumorales de l'HCC est similaire à celui des cellules de Langerhans canines, en particulier pour l'expression des β 2-intégrines et des CD1, marqueurs les plus cruciaux dans l'identification des macrophages et des cellules dendritiques canines (Moore et al. 1996).

Les tableaux suivant résument le profil immunophénotypique actuellement connu des cellules tumorales de l'HCC. Pour rappel, les différents marqueurs associés à la lignée histiocytaire chez le chien sont détaillés au sein du premier point de la première partie. On notera que les cellules de l'HCC expriment une grande partie des protéines inclues dans la présentation des antigènes exogènes non protéiques (CD1). Les protéines d'adhésion endothéliales de la famille CD11 et CD18 sont également exprimées, ainsi que les adhésines du CD49. L'expression de la E-cadhérine est variable. On retrouve une partie des enzymes lysosomales chez ces cellules, ainsi que les molécules du CMH II, propres aux CPA.

<u>Tableau VI</u> : Profil immunophénotypique des histiocytes tumoraux de l'HCC (Marchal, Dezutter-Dambuyant, et al. 1995; Moore et al. 1996; Fulmer et al. 2007; Coomer et al. 2008; Weiss et al. 2010; Moore 2014; Pierezan et al. 2014; Paździor-Czapula et al. 2015)

Marqueur immunohistochimique	Cellule tumorale de l'HCC
CD1a	+
CD1b	+
CD1c	+
CD4	-
CD8	_
CD11a	+
CD11b	Variable
CD11c	+
CD11d	-

CD18	+
CD14	-
CD34	-
CD44	+
CD45	+
CD45RA	-
CD49	+
CD90 (Thy-1)	-
CD208 (DC-LAMP)	-
Iba-1	+
СМН ІІ	+
E-cadhérine	Variable, expression renforcée en périphérie de l'épiderme
Vimentine	+
Trypsine	+
Myélopéroxydase	-
Protéine S-100	-

E. Diagnostic différentiel

• Cytologique et histologique

Le diagnostic de l'HCC est généralement correctement réalisé à la vue de sa clinique, de son épidémiologie particulière et de l'analyse histologique souvent associée.

Dans un premier temps, le diagnostic différentiel de l'HCC doit inclure celui de tous les nodules et plaques cutanés : abcès, kyste, granulome, dermatose de surcharge, néoplasie. Cette liste n'est évidemment pas exhaustive et doit être précisée à minima par une analyse cytologique ou histologique du nodule.

Le diagnostic différentiel cytologique et histologique de l'HCC doit inclure celui des tumeurs à cellules rondes (lymphomes cutanés, mastocytomes, plasmocytomes et tumeurs vénériennes transmissibles canines), ainsi que les désordres histiocytaires à expression cutanée autres (HCLC, sarcome histiocytaire, histiocytose réactionnelle cutanée et systémique). Les mélanomes amélanotiques, le carcinome des cellules de Merkel et certains types de sarcome des tissus mous (fibrohistiocytome malin notamment) doivent être également ajoutés au diagnostic différentiel (Withrow et al. 2013; Raskin et al. 2016).

Le tableau disponible en annexe (Annexe 1) récapitule les différentes tumeurs cutanées à inclure dans le diagnostic différentiel clinique, cytologique et histologique de l'HCC.

• Immunohistophénotypage

Comme vu précédemment, l'utilisation combinée de l'immunohistochimie et du phénotypage des marqueurs cellulaire des cellules tumorales constitue le diagnostic de certitude de l'HCC.

Les profils immunophénotypiques partiels et pertinents des affections à inclure dans le diagnostic différentiel de l'HCC sont compilés dans le tableau ci-dessous.

<u>Tableau VII</u> : Profils immunophénotypiques des principales tumeurs cutanées canines incluses dans le diagnostic différentiel de l'HCC (Thoolen et al. 1992; Affolter et al. 2000; Fernandez et al. 2005; Medleau et al. 2006; Park et al. 2006; Ramos-Vara et al. 2007; Coomer et al. 2008; Do et al. 2009; Joiner et al. 2010; Miller et al. 2013; Raskin et al. 2016; Boostrom et al. 2017; Barger et al. 2017)

Pathologie	Profil immunophénotypique associé
Lymphome cutané non-épithéliotrope	 Fréquent, à cellules T CD4⁺ ou CD8⁺: CD3⁺, CD8⁺ Extrêmement rare, à cellules B : CD79a⁺
Lymphone cutané épidermotrope (mycosis fungoides, syndrôme de Sézary, réticulose pagétoïde)	• A cellules T : CD8 ⁺ , CD3 ⁺
Mastocytome	 CD117⁺, chymase⁺, tryptase⁺
Plasmocytome	• CD20 ⁺ , MUM1/IRF-4 ⁺
Tumeur vénérienne transmissible canine (sarcome de Sticker)	 Origine histiocytaire suspectée, CD3/CD79a⁻ Lysozyme⁺, vimentine⁺, alpha1⁻ antitrypsine⁺, ACM1⁺ (« macrophage-specific immunostain »)
Mélanome amélanotique	 Vimentine⁺, Protéine S100⁺, Neuron⁻, Specific Enolase⁺, Melan⁺
Carcinome des cellules de Merkel (carcinome neuroendocrinien)	 Cytokeratine⁺, chromagranine A⁺, synaptophysine⁺
Histiocytose réactionnelle cutanée	 Marqueurs de la lignée histiocytaire, cellules dendritiques interstitielles activées : CD1⁺, CD4⁺, CD11c⁺, CD18⁺, CD90⁺, CMH II⁺
Histiocytose réactionnelle systémique	 Marqueurs de la lignée histiocytaire, cellules dendritiques interstitielles activées : CD1⁺, CD4⁺, CD11c⁺, CD18⁺, CD90⁺, CMH II⁺
Histiocytose cutanée langerhansienne canine	 Marqueurs de la lignée histiocytaire, cellules de Langerhans : CD1⁺, CD11c⁺, CD18⁺, CMH II⁺
Complexe sarcome histiocytaire	 Marqueurs de la lignée histiocytaire, cellules dendritiques interstitielles : CD1⁺, CD11c⁺, CD18⁺, CMH II⁺

F. Prise en charge et traitement

Ces tumeurs cutanées bénignes régressent spontanément dans un intervalle de moins de 3 mois selon la littérature (Raskin et al. 2016). En cas de persistance tumorale, de localisation atypique et gênante de la lésion ou en cas d'ulcérations majeure associée à une surinfection bactérienne, un retrait chirurgical est conseillé. De plus, un retrait précoce de la lésion permet de confirmer son caractère bénin après analyse histopathologique (Goldschmidt et al. 1992). D'autres alternatives à la chirurgie sont décrites, comme la cryothérapie (Coomer et al. 2008).



<u>Figure 30</u> : Régression spontanée (cercle rouge) de la lésion d'histiocytome cutané localisée au niveau de la face chez ce même Bouledogue français de 4 ans. Quatre semaines se sont écoulées entre la photo de la Figure 22 et la prise de celle-ci (Service de dermatologie de VetAgroSup, Campus Vétérinaire de Lyon)

G. Pronostic et récidive

Le pronostic concernant l'HCC est très bon, du fait du caractère auto-résolutif de la lésion dans une très grande majorité de cas. De plus, l'exérèse monobloc réalisée est souvent curative, les cas de récidive au site de chirurgie étant extrêmement rares (Taylor et al. 1969; Goldschmidt et al. 1992).

Dans de très rares cas, des métastases infiltrant le nœud lymphatique (NL) locorégional sont rapportées. Il est suggéré que la prévalence de ces métastases est sous-estimée dans ce type

d'affection, par faute d'une exploration suffisante. En effet, la prise en charge de l'HCC s'arrête souvent à l'exérèse seule de la tumeur, le NL locorégional étant rarement ponctionné par les praticiens devant l'absence d'adénopathie. Néanmoins, le pronostic reste bon même en cas d'infiltration du NL locorégional, et une régression des cellules tumorales métastatiques sur un mode similaire à celui régissant la régression de la tumeur cutané est mis en avant (Moore 2014; Faller et al. 2016).

De plus, le caractère métastatique de ces cellules disséminées est contestable : aucune dissémination profonde au-delà du NL locorégional n'a jamais été décrite et dans l'hypothèse de l'acquisition par les cellules tumorales d'un phénotype de cellules dendritiques matures, ceci pourrait correspondre davantage à une migration physiologique de ces dernières plutôt qu'à une dissémination métastatique vraie (Moore 2014; Faller et al. 2016).

En conclusion, l'histiocytome cutané canin est donc une néoplasie cutanée fréquente chez le jeune chien et résultant d'une prolifération monoclonale de précurseurs dermiques des cellules de Langerhans, principales cellules présentatrices d'antigène de l'épiderme. Le pronostic est généralement excellent avec ou sans exérèse de la tumeur car ce type tumoral présente une régression spontanée, généralement dans un intervalle de moins de 3 mois suivant son apparition. Ce caractère auto-résolutif de la tumeur fait en partie suite à son infiltration par des cellules immunitaires, en particulier les LT CD8⁺ à forte activité cytotoxique.

Après l'étude de l'origine des cellules tumorales de l'HCC, son étude clinique et les mises en lumière des interactions entre cellules immunitaires et cellules tumorales au sein du microenvironnement inflammatoire tumoral ; nous allons aborder l'aspect expérimental de ce travail.

Partie II : Caractérisation de l'infiltrat immunitaire au sein de l'histiocytome cutané canin

I. Contexte scientifique et objectifs de l'étude

L'HCC représente la tumeur histiocytaire la plus fréquente chez le jeune chien. Les études immunophénotypiques et ultrastructurelles montrent que les cellules tumorales dérivent de précurseurs dermiques des cellules de Langerhans. De nature bénigne malgré sa croissance rapide, cette tumeur métastase rarement jusqu'au nœud lymphatique locorégional et régresse spontanément (Affolter et al. 2000; Dobson et al. 2011).

L'infiltration croissante de la masse tumorale par un contingent de cellules immunitaires majoritairement lymphocytaires au cours des différents stades tumoraux est associée à la régression tumorale (Taylor et al. 1969; Cockerell et al. 1979). L'activité cytotoxique des LT CD8⁺ et l'activation conjointe des LB, associées à l'augmentation de l'activité des MMP et de l'expression du CMH II chez les cellules tumorales sont des mécanismes au rôle reconnu dans la régression de l'HCC. Une réponse adaptative de type Th1 semble régir l'action antitumorale, accompagnée d'une maturation des cellules tumorales (Kipar et al. 1998; Kaim et al. 2006; Pires et al. 2009; Puff et al. 2013). Néanmoins, la présence et l'action d'autres cellules immunitaires (immunité innée notamment) ont rarement été explorées. De plus, la mise en place d'une réponse spécifique passe nécessairement par la présentation de l'antigène par les cellules compétentes : cellules dendritiques principalement, macrophages et LB dans une moindre mesure. Les cellules dendritiques, dont les cellules de Langerhans, constituent les CPA les plus efficaces du système immunitaire. Leur action permet l'activation des LT, nécessaire à la mise en place d'une réponse cytotoxique. Les cellules dendritiques jouent un rôle démontré dans la régulation de la réponse anti-tumorale. L'implication de ces cellules voire des cellules tumorales elles-mêmes dans la réponse anti-tumorale peut donc constituer une voie d'exploration judicieuse (Kim et al. 2007; Cheville 2009; Weiss et al. 2010; Seneschal et al. 2012; Tizard 2018).

La régression tumorale est un équilibre fragile entre croissance et destruction tumorale. Les cellules de l'infiltrat immunitaire présentent un rôle anti-tumoral certain. En revanche, certaines cellules immunitaires présentent des rôles et des variations phénotypiques en faveur du développement tumoral, leur présence n'a encore été que peu objectivée au sein de l'HCC, notamment lors de la phase de croissance rapide de l'HCC.

Le rôle parfois ambivalent des macrophages au sein du microenvironnement tumoral illustre cet équilibre entre régression et stimulation tumorale. Ces cellules sont principalement connues pour leur rôle antibactérien et anti-tumoral, via la production cytokines proinflammatoires, pro-apoptotiques, de dérivés oxydants (ROS) et la réalisation de la phagocytose. Ces macrophages anti-tumoraux sont qualifiés de M1. Néanmoins, certaines populations de macrophages peuvent présenter des interactions différentes avec les autres cellules immunitaires et les cellules tumorales : les macrophages M2 modulent la réaction anti-tumorale, activent l'angiogenèse et promeuvent la croissance tumorale. Ces activations différentes font suite aux stimuli du microenvironnement inflammatoire et conduisent à des variations phénotypiques des macrophages, ainsi qu'à la modification de leur rôle au sein de l'infiltrat immunitaire tumoral (Mantovani et al. 2002; Lewis et al. 2006; Sica et al. 2008).

La présence des LT TReg au sein des tumeurs solides chez l'Homme et le chien constitue un facteur pronostic négatif avéré, et fait preuve de l'importance du rôle immunomodulateur voire pro-tumoral de ces cellules immunitaires. La mise en place d'un microenvironnement anti-inflammatoire pro-tumoral par les LT TReg pourrait avoir un impact significatif lors de la phase d'extension de l'HCC (Sakai et al. 2018; Withers et al. 2019).

Les variations phénotypiques des cellules immunitaires et leur rôle au sein de l'immunité antitumoral peuvent être extrêmement variés comme vu dans la partie précédente de cette étude. Néanmoins, dans le cas de l'HCC, la présence de cet infiltrat inflammatoire aboutit quasi-systématiquement à la régression de la tumeur dans une courte période (Raskin et al. 2016).

L'objectif de ce travail sera donc de caractériser les populations de cellules immunitaires présentes au sein de la tumeur durant les différents stades de régression de l'HCC, afin de mieux appréhender les mécanismes de la régression tumorale. Ceci passera par leur identification, mais également l'étude de leur cinétique d'apparition au sein de l'infiltrat. Nous nous concentrerons sur les acteurs déjà connus de l'immunité anti-tumorale (LT CD3 ε^+ , LB Pax-5⁺) ainsi que sur les macrophages CD204⁺/CD206⁺, les cellules dendritiques DC-LAMP⁺ et les LT TReg FoxP3⁺, à la présence rarement étudiée au sein de l'HCC. La mise en évidence de la présence simultanée de certaines de ces cellules immunitaires, laissant supposer l'existence de mécanismes synergiques anti-tumoraux sera également mise en avant.

II. Matériel et méthode

A. Sélection des cas

Les échantillons de tissus ont été sélectionnés de manière rétrospective au sein des cas archivés du service d'anatomo-histopathologie de VetAgro Sup, via l'utilisation du logiciel de référencement de cas HML.

Le choix des cas repose sur le diagnostic d'HCC émis par les pathologistes du service, en se basant sur des critères épidémiologiques, cliniques et histologiques après réalisation de coupes et colorations à l'hématoxyline-éosine (HE) des tissus. Ces critères diagnostiques sont rappelés dans la partie bibliographique de l'étude de l'HCC. Les lames HE des échantillons considérés ont ensuite été récupérées dans les archives, puis réévaluées (lecture histologique au microscope optique) avant d'être incluses dans l'étude. Les cas présentant un doute diagnostique à ce stade ont été écartés.

Seuls les cas conservés depuis moins de 5 ans ont été sélectionnés ; ceux présentant des altérations (structures modifiées de manière importante) ou des coupes incomplètes de la masse tumorale ont été exclus.

Une analyse épidémiologique des cas de l'étude (âge, sexe et race) a également été menée.

B. Réalisation des marquages immunohistochimiques

1. Protocole de réalisation des marquages immunohistochimiques

Pour chaque bloc paraffiné, 9 coupes de 3μ m d'épaisseur chacune ont été effectuées au microtome. Une coupe a été colorée à l'HE, les 8 autres coupes ont été marquées pour mettre en évidence les antigènes suivant : Iba-1 pour confirmer l'origine histiocytaire de la tumeur, CD3 ε , Pax-5, et FoxP3 pour respectivement mettre en évidence les lymphocytes T, B et TReg, DC-LAMP pour les cellules dendritiques conventionnelles, enfin CD204 et CD206 pour les macrophages (CD204 pour les macrophages M1 et M2, CD206 plus spécifique des macrophages M2). La dernière coupe a fait office de témoin négatif.

Tous les marquages ont été réalisés à l'aide d'un automate (Autostainer, Lab Vison 360S, ThermoFisher Scientific). Les caractéristiques des solutions d'anticorps primaires sont rappelées dans la partie suivante au sein du Tableau VIII.

Les coupes obtenues au microtome ont été déparaffinées avant d'être réhydratées dans l'alcool puis dans l'eau distillée à l'aide d'un module de pré-traitement (PT Module, LabVision, ThermoFisher Scientific). S'en est suivi une étape de démasquage antigénique, permettant de limiter le bruit de fond et d'augmenter la spécificité du marquage. Pour le marquage DC-LAMP, le démasquage a été effectué dans un bain de solution tampon Tris-EDTA (pH9, Dako target retrieval solution, Dako, Carpinteria, CA) à 95°C durant 40 minutes. Pour les autres marquages (Iba-1, CD3 ε , Pax-5, CD204, CD206 et FoxP3), cette étape a été constituée d'un unique bain dans une solution tampon citratée (pH6, Thermoscientific Dewax and HIER Buffer L, Thermofischer, Runcorn, UK) à 95°C durant 40 minutes. Ces étapes furent suivies d'un refroidissement à 20°C pendant 20 minutes. Après le blocage de la peroxydase endogène, l'incubation avec la solution d'anticorps primaires diluée à l'aide du diluant Emerald (Cellmarque, Sigma Alrich Compagny, Rocklin, California, USA) a été réalisée pendant 1 heure à 20°C pour tous les marquages.

Après incubation avec les solutions d'anticorps primaire, les marquages ont été révélés suivant la méthode avidine-biotine-peroxydase. L'amplification a été effectuée à l'aide du

dernier composant du kit UltraTEK HRP prêt à l'emploi (Scy Tek Labotories, Logan, Utah, USA), mis en contact 30 minutes à 20°C avec l'échantillon marqué. La révélation du marquage s'est faite à l'aide du substrat Vector NovaRED HRP durant 5 minutes (Vector, Burlingame, California, USA).

Pour finir, les échantillons ont été colorés à l'hématoxyline-éosine (5 minutes), afin de visualiser les structures histologiques en plus du marquage. Les coupes ont ensuite été de nouveau déshydratées puis montées entre lame et lamelle à l'aide d'une résine synthétique.

Le protocole complet de réalisation des marquages immunohistochimiques et des réactifs employés est disponible en annexe (Annexe 2).

2. Choix des anticorps employés

Les caractéristiques des anticorps primaires employés ainsi que les aspects liés à la technique expérimentale des marquages sont compilés dans le Tableau VIII suivant :

Tableau VIII : Principales caractéristiques des anticorps utilisés lors de la réalisation des immunomarquages, ciblant les protéines d'intérêt Iba-1, CD3 ε, Pax-5, DC-LAMP, CD204, CD206 et FoxP3 (d'après les fiches techniques des laboratoires mentionnés). Le protocole de démasquage antigénique pour chaque marquage est également rappelé.

Antigène ciblé et anticorps	Dilution	Fournisseur	Immunogène	Démasquage préalable
primaires associés	réalisée			
Iba-1 Ab5076, anticorps polyclonaux caprins, Ig G	1:500	Abcam, Tokyo, Japon	Peptide synthétique correspondant aux acides- aminés (aa) 135-147 de la partie C- terminale de la protéine Iba-1 humaine	 40 minutes, pH6 (solution tampon citratée), 95°C 20 minutes de refroidissement à 20°C
CD3 ε CD3-12, anticorps monoclonaux murins, Ig G1	1:100	Bio Rad, Hercules, Californie, USA	Peptide synthétique dérivant de l'épitope cytoplasmique du CD3	 40 minutes, pH6 (solution tampon citratée), 95°C 20 minutes de refroidissement à 20°C
Pax-5 Clone 24/Pax-5, anticorps monoclonaux murins, Ig G1	1:1	BD Transduction laboratories, Lexington, Kentucky, USA	Aa 151-306 de la protéine Pax-5 humaine	 40 minutes, pH6 (solution tampon citratée), 95°C 20 minutes de refroidissement à 20°C
DC-LAMP CD208, clone 1010E1, 01, anticorps murins, Ig G2a	1:200	Dendritics, Lyon, France	Recombinant murin de la protéine DC- LAMP	 40 minutes, pH9 (solution tampon Tris- EDTA), 95°C 20 minutes de refroidissement à 20°C

CD204 MSR-1, clone SRA-E5, anticorps monoclonaux murins, Ig G1	1:50	Abnova, Taipei, Taiwan	Recombinant murin de la protéine MSR- 1	•	40 minutes, pH6 (solution tampon citratée), 95°C 20 minutes de refroidissement à 20°C
CD206 ab 64693, anticorps polyclonaux de lapin, Ig G	1 : 200	Abcam, Tokyo, Japon	Peptide synthétique dérivant de la partie C- terminale du récepteur au mannose humain	•	40 minutes, pH6 (solution tampon citratée), 95°C 20 minutes de refroidissement à 20°C
FoxP3 FJK-16s, anticorps monoclonaux murins, Ig G2a	1:200	Ebioscience, San Diego, Californie, USA	Recombinant murin de la protéine FoxP3	•	40 minutes, pH6 (solution tampon citratée), 95°C 20 minutes de refroidissement à 20°C
Témoin négatif Emerald diluent antibody	N/A	Cellmarque, Sigma Aldrich Company, Rocklin, Californie, USA	N/A	•	40 minutes, pH6 (solution tampon citratée) ou pH9 (solution tampon Tris- EDTA), 95°C 20 minutes de refroidissement à 20°C

3. Témoins positifs et négatifs

Des témoins négatifs de réaction permettant l'évaluation de la technique ont été réalisés à chaque session de marquage de l'automate, en remplaçant la solution d'anticorps primaire par la solution de dilution des anticorps (Emerald diluent antibody, Cellmarque, Sigma Aldrich Compagny, Rocklin, USA).

Les témoins positifs correspondaient aux tissus sains en périphérie des masses tumorales ; les cellules recherchées (LT, LB, cellules dendritiques et macrophages) étant physiologiquement présentes dans les tissus cutanés et sous-cutanés.

C. Critères d'évaluation histologique

1. Evaluation des marqueurs histologiques

L'évaluation histologique des HCC s'est effectuée sur les lames colorées à l'HE. L'évolution cytologique des cellules tumorales en fonction des différents groupes a été évaluée, afin de définir une tendance pour chaque stade de régression.

Un comptage mitotique a été réalisé, il correspond au nombre de figures de mitoses observées sur une surface de 2.37mm² (Meuten et al. 2016).

La présence d'ulcération a été dénombrée, tout comme la présence d'un unique ou de plusieurs infiltrats intraépidermiques par les cellules tumorales.

L'existence de foyers de nécrose au sein de la masse tumorale (périphériques ou centraux) a également été enregistrée, elle est considérée positive pour tout foyer ou plage de nécrose de surface supérieure à 20% d'un champ de 0.159mm².

2. Groupage des échantillons d'HCC

Le groupage des cas a été effectué à l'aide de la classification décrite par Cockerell et Slauson en 1979. Elle se base sur l'évaluation de l'infiltration lymphoïde au sein de l'HCC :

- Les tumeurs du groupe 1 présentent un infiltrat minimal et diffus de lymphocytes en périphérie de la masse tumorale, localisé entre les cellules néoplasiques et les tissus sains (derme principalement).
- Le groupe 2 correspond aux infiltrats profonds, périphériques (tendance à progression centripète), organisés de manière nodulaire en multiples foyers contenant en leur centre des débris éosinophiliques correspondant à des zones de nécrose.
- Chez les cas classifiés 3, l'infiltrat lymphocytaire est davantage marqué, les foyers lymphocytaires occupent la périphérie et le centre de la tumeur.
- Dans le groupe 4, la densité de lymphocytes est supérieure à celle des cellules tumorales. Les foyers de cellules immunitaires sont conséquents et infiltrent de manière diffuse l'ensemble de la masse tumorale.

En évaluant la lame colorée à l'HE, les cas de l'étude ont été divisés dans les quatre groupes.

Les critères de classification des échantillons sont rappelés dans le Tableau IX suivant :

<u>Tableau IX</u> : Critères de classification des cas d'HCC en fonction du degré d'infiltration lymphocytaire et de la distribution spatiale de l'infiltrat (Cockerell et al. 1979)

Groupe	Degré d'infiltration lymphocytaire	Distribution de l'infiltrat
1	Absent à minimal	Diffus et périphérique à la masse tumorale
2	Modéré	Nodulaire et périphérique
3	Marqué	Nodulaire, central et périphérique
	Massif, densité	Nodulaire et diffus infiltrant
4	lymphocytaire supérieure à celle des cellules tumorales	la totalité de la masse tumorale

D. Critères d'évaluation des marquages immunohistochimiques

Une cellule marquée a été considérée comme positive au marquage lorsque que la coloration brune secondaire à la réaction enzymatique de révélation était retrouvée sur la cellule selon la localisation de l'antigène recherché (membranaire, cytoplasmique ou nucléaire). Cette coloration devait être absente de cette même cellule chez le témoin négatif.

1. Immunomarquage de l'Iba-1

La nature des cellules marquées a été évaluée qualitativement.

La positivité de ce marquage chez les cellules tumorales permet de confirmer le diagnostic d'HCC (Pierezan et al. 2014). Les cas présentant une absence de cellules tumorales positives pour ce marquage ont été exclus des effectifs statistiques.
2. Immunomarquage de CD3 ε et Pax-5

La nature des cellules marquées et leur localisation tissulaire ont été évaluées qualitativement.

Les infiltrats de cellules CD3 ϵ^+ et Pax-5⁺ ont été évalués selon le même système de notation qualitatif que Cockerell *et al.*, reposant sur l'évaluation de la densité cellulaire et la distribution spatiale des cellules positives, allant de 1 à 4. Cette notation a été réalisée sur l'ensemble de la masse tumorale.

Les critères de notation du CD3 ϵ et de Pax-5 sont rappelés dans le Tableau X suivant :

Immunomarquages	Degré d'infiltration	Distribution de	Score
considérés	lymphocytaire	l'infiltrat	
		lymphocytaire	
	Absent à minimal	Diffus et périphérique	1
		à la masse tumorale	
CD3 E	Modéré	Nodulaire et	2
Pax-5		périphérique	
	Marqué	Nodulaire, central et	3
		périphérique	
	Massif, densité	Nodulaire et diffus	4
	lymphocytaire	infiltrant la totalité de	
	supérieure à celle des	la masse tumorale	
	cellules tumorales		

Tableau X : Critères de lecture des immunomarquages CD3 ε et Pax-5 au sein de l'HCC

3. Immunomarquage de CD204

La nature des cellules marquées et leur localisation tissulaire ont été évaluées qualitativement, la densité de cellules marquées quantitativement.

Deux localisations tissulaires ont été évaluées pour ce marquage, suite à l'observation de l'existence d'une localisation tumorale préférentielle par les macrophages : la périphérie et le centre de la tumeur. Ces localisations préférentielles sont notamment décrites et évaluées (« nest TAM », centraux et intratumoraux versus « margin TAM », périphériques) dans

plusieurs études en histologie humaine (Ohno et al. 2002; Ohno et al. 2003). La zone d'évaluation périphérique correspondait au tiers le plus extérieur de la tumeur ainsi qu'à ses marges proches, la zone centrale aux deux tiers restant de la tumeur (Figure 31). Cette délimitation a été fixée à la suite de nos observations sur l'ensemble des lames.





Une notation allant de 1 à 4 des lames marquées a été effectuée pour chaque localisation, avec une comptabilisation des cellules positives sur 3 champs à fort grossissement (x400, soit 0.477mm²). Le choix des champs s'est fait selon les zones présentant la densité la plus élevée de cellules positives au marquage (après un premier passage à plus faible grossissement), les seuils de densité ont été déterminés a posteriori après analyse des lames, proportionnellement à la densité de cellules positives comptabilisées au marquage.

Les critères de notation du CD204 sont explicités dans le Tableau XI suivant :

Immunomarquage considéré	Localisation de l'infiltrat	Critères d'évaluation (lecture sur 3	Score
		champs, 0.47/mm ²)	
		< 5 cellules positives	1
	Intra-tumoral	5 à 100 cellules positives	2
	intra-tumorai	100 à 200 cellules positives	3
CD204		> 200 cellules, amas cellulaires denses et nodulaires	4
	Péri-tumoral	< 5 cellules positives	1
		5 à 100 cellules positives	2
		100 à 200 cellules positives	3
		> 200 cellules, amas cellulaires denses et nodulaires	4

Tableau XI : Critères de lecture de l'immunomarquage CD204 au sein de l'HCC

4. Immunomarquage de DC-LAMP

La nature des cellules marquées et leur localisation tissulaire ont été évaluées qualitativement, la densité de cellules marquées quantitativement.

Comme pour l'évaluation du marquage CD204, deux localisations préférentielles des cellules marquées ont été mises en évidence : la zone péri-tumorale et la zone intra-tumorale. Un système de notation allant de 1 à 4 des lames marquées similaire à celui du CD204 a été mis en place pour chaque localisation, avec une comptabilisation des cellules positives sur 3 champs à fort grossissement (x400, soit 0.477mm²). Le choix des champs s'est fait selon les zones présentant la densité la plus élevée de cellules positives aux marquages, les seuils de densité ont été déterminés a posteriori après analyse des lames. Le nombre réduit de cellules positives pour ce marquage explique les variations de seuils observées vis-à-vis des autres marquages.

Les critères de notation du DC-LAMP sont explicités dans le Tableau XII suivant :

Immunomarquage considéré	Localisation de l'infiltrat	Critères d'évaluation (lecture sur 3 champs, 0.477 mm ²)	Score
		< 5 cellules positives	1
	Intra-tumoral	5 à 50 cellules positives	2
	intra-tuniorai	50 à 100 cellules positives	3
DC-LAMP		> 100 cellules positives	4
		< 5 cellules positives	1
	Péri-tumoral	5 à 50 cellules positives	2
		50 à 100 cellules positives	3
		> 100 cellules positives	4

Tableau XII : Critères de lecture de l'immunomarquage DC-LAMP au sein de l'HCC

5. Immunomarquage de CD206

La nature des cellules marquées et leur localisation tissulaire ont été évaluées qualitativement.

Les cellules positives semblent présenter certaines localisations préférentielles. La forte densité de cellules positives pour ce marquage nous mène à évaluer cette densité uniquement de manière qualitative, le système de notation repose principalement sur la répartition spatiale des cellules positives.

Les critères de notation du CD206 sont explicités dans le Tableau XIII suivant :

Tableau XIII : Critères de lecture de l'immunomarquage CD206 au sein de l'HCC

Immunomarquage considéré	Critères d'évaluation : distribution des cellules positives	Score
	Absence de cellules positives	1
CD206	Présence de cellules positives uniquement à la périphérie tumorale	2
	Présence de cellules positives à la périphérie et au centre de la tumeur	3
	Présence de cellules positives à la périphérie, au centre de la tumeur et en position sous-épidermique	4

6. Immunomarquage de FoxP3

La nature des cellules marquées et leur localisation tissulaire ont été évaluées qualitativement, la densité de cellules marquées quantitativement.

Comme pour l'évaluation des marquages CD204 et DC-LAMP, deux localisations préférentielles des cellules marquées ont été mises en évidence : la zone péri-tumorale et la zone intra-tumorale. Un système de notation allant de 1 à 4 des lames marquées a été mis en place pour chaque localisation, avec une comptabilisation des cellules positives sur 3 champs à fort grossissement x400 (0.477mm²). Le choix des champs s'est fait selon les zones présentant la densité la plus élevée de cellules positives aux marquages, les seuils de densité ont été déterminés a posteriori après analyse des lames. Le nombre réduit de cellules positives pour ce marquage explique les variations de seuils observées vis-à-vis des autres marquages.

Les critères de notation de FoxP3 sont explicités dans le Tableau XIV suivant :

	-		
Immunomarquage considéré	Localisation de l'infiltrat	Critères d'évaluation (lecture sur 3	Score
		champs, 0.477mm ²)	
		< 5 cellules positives	1
		5 à 30 cellules	2
	Intra-tumoral	positives	
		30 à 60 cellules	3
		positives	
		> 60 cellules	4
FoxP3		positives	
	Péri-tumoral	< 5 cellules positives	1
		5 à 30 cellules	2
		positives	
		30 à 60 cellules	3
		positives	
		> 60 cellules	4
		positives	

Tableau XIV : Critères de lecture de l'immunomarquage FoxP3 au sein de l'HCC

E. Méthode de lecture et analyse statistique

1. Lecture des lames

La lecture des lames a été réalisée par un étudiant et une pathologiste du service d'anatomopathologie de VetAgro Sup sur un microscope optique de marque Leitz modèle Laborlux S (oculaire x10, objectif max x100, FN 18).

Les photos des champs microscopiques ont été obtenues sur un microscope optique Zeiss Imager.D2 (oculaire x10, objectif max x100, FN 22) à l'aide d'une Axiocam 506 Color (Zeiss) et traitées à l'aide du logiciel ZEN (Zeiss).

2. Traitement des données et analyse statistique

L'ensemble des données de lecture a été compilé à l'aide du logiciel Excel (Microsoft).

L'analyse statistique des données est effectuée à l'aide du logiciel R Studio version 8.9 (RStudio). Ce logiciel permet la réalisation des statistiques descriptives de notre étude, des diagrammes associés, ainsi que des tests statistiques. La répartition de nos données et le faible nombre de cas nous oriente vers des tests non-paramétriques, plus robustes mais de puissance statistique moindre.

Les moyennes des données recueillies pour chaque paramètre évalué (comptage mitotique, comptage cellulaire DC-LAMP, CD204 et FoxP3) sont calculées et comparées à l'aide du test de comparaison des moyennes de Kruskall-Wallis pour plusieurs séries d'observations indépendantes ou le test des rangs de Mann-Whitney-Wilcoxon pour deux séries indépendantes d'observations.

Les tests du χ^2 d'ajustement et d'indépendance (avec possible correction de Yates si les effectifs calculés sont inférieurs à n=5) nous permettent d'évaluer une différence significative entre les fréquences (d'une variable qualitative) d'une ou plusieurs séries d'observations indépendantes.

Les corrélations entre tous les différents paramètres sont évaluées par le test des rangs de Kendall, test non-paramétrique pour l'établissement des corrélations. Le calcul du tau de Kendall (τ) nous renseigne sur la force de la corrélation entre les deux paramètres considérés ; le signe, les valeurs du τ et leur interprétation sont explicitées dans le Tableau XV.

Les intervalles de confiance sont établis à 95% et les arrondis des valeurs décimales réalisés de façon à conserver deux chiffres significatifs. Une valeur de p-value <0.05 a été définie comme significative (Jacob Cohen, 1988; Hinkle et al. 2003).

<u>Tableau XV</u> : Interprétation de la force des corrélations en fonction de la valeur et du signe du τ de Kendall (Jacob Cohen, 1988; Hinkle et al. 2003)

Signe du τ de Kendall	Valeur absolue du τ de Kendall	Force de la corrélation
	0 à 0.1	Corrélation absente
τ> 0 : Corrélation positive	0.1 à 0.3	Corrélation faible
τ< 0 : Corrélation négative	0.3 à 0.5	Corrélation modérée
	0.5 à 1	Corrélation forte

III. Résultats

A. Population étudiée : analyse épidémiologique

1. Descriptif de la population

Le nombre de cas sélectionnés est de 32. Ils proviennent tous de chiens différents, ayant subi une exérèse chirurgicale de masse cutanée à visée curative chez leur vétérinaire traitant. Les échantillons ont ensuite été envoyés au laboratoire d'anatomo-histopathologie de VetAgro Sup pour y subir une analyse histopathologique.

Il s'agit pour tous les échantillons sélectionnés de pièces d'exérèse complètes et non pas de biopsies. Les cas proviennent de cliniques vétérinaires privées réparties sur tout le territoire français.

Seules quatre localisations des tumeurs retirées sont précisées (angle interne de l'œil droit, pavillon auriculaire gauche, oreille gauche et face dorsale du métacarpe gauche), rendant impossible une quelconque analyse statistique de ce paramètre.

Le sexe, l'âge et la race sont partiellement précisés dans les commémoratifs accompagnants les échantillons à analyser des 32 cas.

Les informations relatives aux cas sélectionnés et étudiés sont renseignées en annexe (Annexe 5).

2. Sexe

Le sexe est renseigné chez tous les animaux de l'étude. Les femelles représentent le plus grand nombre d'individus avec 59.4% (n=19/32) des cas étudiés, les mâles 40.6% (n=13/32).

La réalisation d'un test du χ^2 d'ajustement ne montre pas de relation significative entre le sexe et le développement d'un HCC dans notre étude (X²_{Obs}= 1.125, p-value>0.1).

L'état de stérilisation des animaux n'est que sporadiquement spécifié et ne constitue donc pas un paramètre exploitable.

3. Age

L'âge des animaux est indiqué chez 29 des 32 animaux de l'étude. Ce dernier varie de 7 mois à 158 mois (13 ans et 2 mois) au moment de l'exérèse de la tumeur. L'âge moyen est de 56 mois (4 ans et 8 mois) +/- 14,5 mois ; l'âge médian de 46 mois (3 ans et 10 mois).



Figure 32 : Boxplot de la répartition des âges en mois des 32 chiens inclus dans l'étude

Le test non-paramétrique de comparaison des moyennes de Kruskal Wallis ne montre pas de différence significative entre les moyennes d'âge des 4 groupes d'HCC (p-value= 0.27). De plus, aucune corrélation entre âge de l'individu et groupe d'HCC n'est constatée (τ = - 0.15, p-value= 0.32).

4. Race

Le type de chien considéré est renseigné pour tous les animaux, les chiens n'étant pas de race pure sont désignés par la mention « croisé ». On recense 2 chiens croisés (6.3%) et 30 chiens de race, répartis en 16 races différentes.

La race la plus représentée est celle du Bouledogue Français, avec 10 cas sur 32 (31.2%). Viennent ensuite le Berger Allemand (3 cas, 9.4%) et l'Americain Staffordshire Terrier (3 cas, 9.4%) puis le Cocker Anglais (2 cas, 6.3%).

Les 12 races suivantes sont représentées par un unique individu au sein de l'étude : Dogue de Bordeaux, Teckel, Cairn Terrier, Border Collie, Epagneul Breton, West Highland White Terrier, Berger Belge Malinois, Yorkshire Terrier, Shar Pei, Bruno St Hubert, Golden Retriever et Griffon.



Figure 33 : Diagramme de répartition des races au sein de la population étudiée (n=32)

B. Analyse histologique

L'ensemble des lames présente un bon état de conservation. Quelques artefacts liés à la technique (plis, déchirures des échantillons) sont sporadiquement présents sur les colorations HE. Les données relatives aux analyses histologiques sont disponibles en annexe (Annexe 6).

1. Effectifs des groupes d'HCC

L'infiltrat lymphocytaire évalué est composé de petites cellules basophiles à fort rapport nucléo-cytoplasmique, correspondant à des lymphocytes matures. D'autres cellules immunitaires sont parfois retrouvées au sein de l'infiltrat telles que les plasmocytes et les macrophages.

La présence de cellules inflammatoires lymphocytaires et plus majoritairement de PNN à la surface de la masse tumorale (ulcération épidermique) n'est pas prise en compte dans la classification de Cockerell *et al.* et n'entre donc pas dans le groupage des cas.

Les 32 cas sont classifiés en 4 groupes, aux effectifs non-homogènes : on retrouve 9 cas groupés 1, 4 groupés 2, 12 groupés 3 et 7 groupés 4. Ces effectifs ainsi que les critères de groupage sont rappelés dans le Tableau XVI.

Les cas du groupe 1 présentent un infiltrat lymphocytaire absent à minimal, localisé en zone périphérique. Les zones de nécrose sont rares à absentes (Figure 34).



<u>Figure 34</u> : Cas classifié groupe 1 : infiltrat lymphocytaire absent à minimal, localisé en périphérie de la masse tumorale ; coloration hématoxyline-éosine, Gx50

Les HCC classés dans le groupe 2 comportent un infiltrat lymphocytaire toujours périphérique (marges tumorales et tiers extérieur de la masse tumorale), mais organisé de manière plus nodulaire (Figure 35). Cet infiltrat tend à progresser vers le centre de la tumeur. Des foyers nécrotiques caractérisés par des zones de matériel éosinophile (fibrine), des débris cellulaires et par une condensation du noyau des cellules tumorales sont retrouvés au contact de l'infiltrat lymphocytaire.



<u>Figure 35</u> : Cas classifié groupe 2 : infiltrat lymphocytaire modéré, d'organisation nodulaire et localisé en périphérie de la masse tumorale (flèche noire) ; coloration hématoxylineéosine, Gx50

L'infiltrat lymphocytaire est plus marqué et important chez les cas du groupe 3 et envahit la périphérie ainsi que le centre de la masse tumorale. Cet infiltrat est organisé de manière nodulaire, on retrouve des foyers voire des plages de nécrose de grande taille associées à l'infiltrat, également au centre de la tumeur (Figure 36). Seule la portion sous-épidermique présente encore une absence d'infiltration par les cellules lymphocytaires.



<u>Figure 36</u> : Cas classifié groupe 3 : infiltrat lymphocytaire marqué, organisé en nodules localisés en périphérie et au sein de la masse tumorale (flèches noires). Notez la présence des zones nécrotiques au centre des foyers lymphocytaires (flèche rouge) ; coloration hématoxyline-éosine, Gx50

Au sein du groupe 4, l'ensemble de la masse tumorale est infiltré par les lymphocytes. Cette infiltration est diffuse, parfois nodulaire, la densité de cellules lymphocytaires est supérieure à celle des cellules tumorales (Figure 37). De larges plages éosinophiles de nécrose sont retrouvées en périphérie et au centre de la tumeur.



<u>Figure 37</u> : Cas classifié groupe 4 : infiltrat lymphocytaire massif, la densité des cellules lymphocytaires est supérieure à celle des cellules tumorales. L'infiltrat est diffusément nodulaire au sein de toute la masse tumorale ; coloration hématoxyline-éosine, Gx50

Tableau XVI : Critères de classification des cas d'HCC et effectifs associés (Cockerell et al. 1979)

Groupe	Degré d'infiltration lymphocytaire	Distribution de l'infiltrat	Effectif associé
1 (Fig 34)	Absent à minimal	Diffus et périphérique à la masse tumorale	N=9/32
2 (Fig 35)	Modéré	Nodulaire et périphérique	N=4/32
3 (Fig 36)	Marqué	Nodulaire, central et périphérique	N=12/32
4 (Fig 37)	Massif, densité lymphocytaire supérieure à celle des cellules tumorales	Nodulaire et diffus infiltrant la totalité de la masse tumorale	N=7/32

2. Analyse des marqueurs histologiques

L'absence de positivité des cellules tumorales pour l'immunomarquage Iba-1 chez un des cas ne permet pas de confirmer le diagnostic d'HCC préalablement émis sur des critères histologiques. La positivité des cellules tumorales à l'Iba-1 constituant le critère d'inclusion dans notre étude, ce cas en est donc exclu. L'effectif actuel total corrigé des cas de l'étude est maintenant de n=31, avec le retrait de ce cas de score d'infiltration lymphocytaire 1 de nos analyses.

a. Morphologie des cellules tumorales

La morphologie des cellules tumorales présente une variabilité en fonction des groupes d'HCC.

Chez les cas du groupe 1, les cellules tumorales sont présentes sur de larges plages, réparties de manière uniforme au sein d'un fin stroma. Les cellules sont rondes, aux contours marqués, leur cytoplasme est abondant, éosinophile et parfois finement granuleux. Leur noyau est de forme variable : rond, ovalaire à réniforme. La chromatine nucléaire est finement indentée et le nucléole est parfois visible, positionné de manière aléatoire au sein du noyau. Des figures de mitose sont fréquemment observées (Figure 38).



<u>Figure 38</u> : Plage de cellules tumorales chez un cas d'HCC du groupe 1. Notez la présence des nombreuses figures de mitoses (flèches noires) ; coloration hématoxyline-éosine, Gx400

Concernant le groupe 2, l'aspect morphologique des cellules tumorales situées au sein de plages non-infiltrées par les lymphocytes reste inchangé. Certaines cellules présentent sporadiquement des signes de mort cellulaire (rétractation et condensation du noyau, cytoplasme extrêmement éosinophile) mais d'amplitude non comparable aux modifications constatées dans les zones de nécrose décrites ci-dessous.

Le groupe 3 comporte des zones de nécrose tumorale larges au contact des lymphocytes. Ces derniers sont intercalés au sein des cellules tumorales, modifiant l'architecture du tissu tumoral. Les cellules tumorales apparaissent de forme plus polygonale, avec un cytoplasme parfois vacuolisé. Les plages de nécroses montrent des cellules au cytoplasme éosinophile, au noyau condensé (pycnose) ainsi que des images de fragmentation nucléaire (caryorrhexis).

Les lames du groupe 4 montrent de rares cellules tumorales disséminées au sein de l'infiltrat inflammatoire. Les plages de nécrose sont massives et les cellules tumorales restantes dégénèrent. Des cellules tumorales plurinucléées sont parfois visibles.



<u>Figure 39</u> : Plage de cellules tumorales infiltrée par des lymphocytes chez un cas d'HCC du groupe 4. Les cellules tumorales, certaines plurinucléées (flèche noire), dégénèrent et apparaissent parfois avec un cytoplasme vacuolisé (flèche bleue). Leur noyau se condense (flèche rouge), des images de fragmentation nucléaire sont également observées (flèche orange) ; coloration hématoxyline-éosine, Gx1000

b. Comptage mitotique

Des figures de mitose sont retrouvées au sein des plages de cellules tumorales chez 90.3% des cas (28/31 cas). Le nombre de figures de mitose observées sur une zone de 2.37mm² est compris entre un minimum de 1 et un maximum de 27. La moyenne du comptage mitotique est de 9.6 et la valeur médiane de 6 mitoses par zone. Ce comptage mitotique vise à caractériser la prolifération des cellules tumorales.

Groupe et effectifs	Intervalle du	Valeur moyenne du	Valeur médiane du
	comptage mitotique	comptage mitotique	comptage mitotique
1	[5 ; 18]	12.4	13.5
(n=8)			
2	[2 ; 27]	13.5	12.5
(n=4)			
3	[1;27]	10.1	5
(n=12)			
4	[0 ; 8]	3.3	3
(n=7)			

<u>Tableau XVII</u> : Valeurs extrêmes, moyennes et médianes des comptages mitotiques en fonction des groupes d'HCC





Le test non-paramétrique de comparaison des moyennes de Kruskal Wallis ne montre pas de différence significative entre les moyennes des 4 groupes (p-value= 0.08). Le test de corrélation de Kendall montre une corrélation négative modérée entre le comptage mitotique et le groupe d'HCC (τ = - 0.33, p-value= 0.032).

c. Ulcération

Une ulcération superficielle de la masse tumorale est observée chez 77.4% des cas (24/31).

Cette ulcération se caractérise par une absence d'épithélium malpighien, associée à la présence de matériel éosinophile (fibrine) ainsi que de PNN à la surface de la tumeur (Figure 41).



<u>Figure 41</u> : Zone d'ulcération superficielle de la masse tumorale ; coloration hématoxylineéosine, Gx200

Les 7 cas ne présentant pas d'ulcération sont répartis de manière uniforme entre tous les groupes (2 cas du groupe 1, 2 et 3, 1 cas de groupe 4). Les effectifs réduits nous poussent à effectuer des regroupements de classe et à corriger le test du χ^2 d'indépendance avec le test de Yates. Il n'existe pas de différence significative entre la présence d'ulcération au sein des groupes 1 et 2 avec les groupes 3 et 4 (p-value= 0.49). Le test de corrélation de Kendall ne

montre pas de corrélation significative entre la présence d'ulcération et le groupe d'HCC (τ = 0.036, p-value= 0.84).

d. Infiltrats intraépidermiques

Les infiltrats tumoraux intraépidermiques des cellules tumorales sont retrouvés chez 35.5% (11/31) des cas.

Ces infiltrats peuvent être de nature discrète, comptant quelques cellules tumorales, à massifs avec plusieurs dizaines de cellules impliquées (Figure 42). Une déformation de la lame basale et une désorganisation de la structure de l'épithélium stratifié sont observées.



<u>Figure 42</u> : A gauche : infiltration massive de cellules tumorales au sein de l'épiderme ; coloration hématoxyline-éosine, Gx400. A droite : confirmation immunohistochimique de la nature des cellules marquées, Iba-1⁺, Gx400

<u>Tableau XVIII</u> : Répartition des infiltrats intraépidermiques de cellules tumorales au sein des 4 groupes d'HCC

Groupe et effectifs	Pourcentage de présence d'infiltrats	
1	0% (0/8)	
(n=8)		
2	50% (2/4)	
(n=4)		
3	50% (6/12)	
(n=12)		
4	42.9% (3/7)	
(n=7)		

Les effectifs réduits nous poussent à effectuer des regroupements de classe et à corriger le test du χ^2 d'indépendance avec le test de Yates. Le pourcentage d'infiltrats du groupe 1 est significativement différent de celui des groupes 2, 3 et 4 (p-value= 0.045). Le test de corrélation de Kendall ne montre pas de corrélation significative entre la présence d'infiltrats intraépidermiques et le groupe d'HCC (τ = 0.17, p-value= 0.33).

e. Foyers et plages de nécrose

La présence de plages de nécrose ou de foyers de taille supérieure à 20% d'un champ de 0.159mm² est observée chez 83.9% (26/31) des cas.

Les plages de nécrose sont visualisable par la présence d'un matériel éosinophile abondant, disséminé entre les cellules tumorales restantes et les lymphocytes (Figure 43). Des cellules en cours de mort cellulaire au noyau pycnotique et au cytoplasme éosinophile sont observées au sein des foyers de nécrose. Des débris basophiles associables à des débris nucléaires secondaires à un processus de caryorrhexis sont visualisables.



<u>Figure 43</u> : A gauche : larges plages de nécrose (flèche rouge) visualisables entre les cellules tumorales et les foyers de lymphocytes (flèche noire) ; coloration hématoxyline-éosine, Gx200. A droite : foyer de nécrose intratumoral ; coloration hématoxyline-éosine, Gx400

L'évaluation de la nécrose vise à caractériser la destruction des cellules tumorales. Les 5 cas ne présentant pas de tels foyers de nécrose proviennent des groupes 1 (4 cas) et 2 (un cas). Les effectifs réduits nous poussent à effectuer des regroupements de classe et à corriger le test du χ^2 d'indépendance avec le test de Yates. Le pourcentage de présence de nécrose chez les groupes 1 et 2 est significativement différent de celui des groupes 3 et 4 (p-value= 0.01). Le test de corrélation de Kendall montre une corrélation positive modérée entre la présence de nécrose et le groupe d'HCC (τ = 0.493, p-value= 0.007).

C. Analyse des marquages immunohistochimiques

Les données relatives aux analyses immunohistochimiques sont disponibles en annexe (Annexe 7).

1. Analyse des témoins positifs et négatifs

L'ensemble des lames témoins négatifs réalisées ne présentait pas de marquage ni de bruit de fond.

Les témoins positifs pour chaque lame correspondent aux cellules recherchées marquées et présentes en zone saine, qui attestent de la spécificité de l'anticorps primaire pour l'antigène recherché et le type cellulaire ciblé. Pour chaque marquage, ces cellules sont retrouvées en tissu sain et identifiées à l'aide de leur morphologie (Figure 44).



<u>Figure 44</u> : Témoin positif de l'immunomarquage Iba-1 : cellule de Langerhans épidermique (flèche noire), présentant des extensions cytoplasmiques caractéristiques s'immisçant entre les kératinocytes adjacents, Gx1000

2. Analyse des immunomarquages

a. Iba-1

Le marquage Iba-1 est cytoplasmique à membranaire, légèrement granuleux et d'intensité variable (Figure 45 a). Les cellules positives au marquage présentent une morphologie et une localisation compatible avec les cellules tumorales, les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques interstitielles et les macrophages. Les kératinocytes semblent également prendre le marquage de manière sporadique et non-spécifique.

Tous les cas sauf un ont présenté une positivité des cellules tumorales à l'immunomarquage Iba-1. Le cas négatif pour le marquage ne présentait pas de cellules tumorales positives, malgré des caractéristiques histologiques fortes en faveur d'un HCC. Cette absence de marquage a été défini comme un critère de non-inclusion dans notre étude et ce cas retiré de nos analyses suivantes.

L'intensité du marquage des cellules est variable, les macrophages semblent présenter un marquage plus intense que les cellules tumorales. De plus, le marquage de ces dernières est variable. La partie périphérique profonde de la tumeur semble présenter une plus grande quantité de cellules positives au marquage (Figure 45 b), contrairement à la partie plus centrale et superficielle de la tumeur (Figure 45 c). Néanmoins, un marquage fort des cellules situées sous l'épiderme est noté dans certains cas (Figure 45 d).



<u>Figure 45</u> : a : Marquage granuleux membranaire à cytoplasmique des cellules tumorales, Gx1000. b : Le marquage Iba-1 est davantage retrouvé chez les cellules périphériques de la tumeur, Gx50. c : L'intensité du marquage Iba-1 est plus faible chez les cellules du centre de la tumeur, Gx50. d : Une bande de cellules fortement positives au marquage Iba-1 est observée sous l'épiderme de certains cas, Gx50

b. CD3 ε

Le marquage CD3 ε est d'expression cytoplasmique, d'intensité forte et constante chez toutes les cellules marquées. Les cellules positives au marquage présentent une morphologie et une localisation compatible avec des lymphocytes T (Figure 46).



<u>Figure 46</u> : Marquage cytoplasmique et granuleux CD3 ϵ des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, Gx1000

Toutes les lames présentent des cellules positives au marquage, réparties en 4 groupes distincts selon notre système de notation. Les critères de ce score et effectifs associés à chaque groupe sont compilés dans le Tableau XIX. L'infiltration de la masse tumorale par les LT s'effectue depuis les marges de la tumeur. Les LT s'organisent en foyers et en travées et s'immiscent entre les plages de cellules tumorales, progressivement vers le centre de la tumeur. Cette progression est accompagnée d'une diminution de la densité de cellules tumorales et par la présence de foyers de nécroses (Figure 47).

Le test de corrélation de Kendall montre une forte corrélation positive entre le marquage CD3 ε et le groupe d'HCC (τ = 0.89, p-value= 2.0e-07), ainsi qu'une corrélation positive modérée avec la présence de nécrose (τ = 0.44, p-value= 0.017). Une faible corrélation négative est notée avec le comptage mitotique (τ = - 0.29, p-value= 0.045). Aucune autre corrélation significative entre la présence d'ulcération ou d'infiltrats intraépidermiques et le marquage CD3 ε n'a été mise en évidence.

Tableau XIX : Critères de lecture de l'immunomarquage CD3 ε au sein de l'HCC et effectifs associés

Immunomarquage	Degré d'infiltration	Distribution de	Score et effectifs
considéré	lymphocytaire	l'infiltrat	associés
		lymphocytaire	
	Absent à minimal	Diffus et périphérique	1
	(Fig. 47 a)	à la masse tumorale	N=6/31
	Modéré	Nodulaire et	2
CD3 ε	(Fig. 47 b)	périphérique	N=3/31
	Marqué	Nodulaire, central et	3
	(Fig. 47 c)	périphérique	N=15/31
	Massif, densité	Nodulaire et diffus	4
	lymphocytaire	infiltrant la totalité de	
	supérieure à celle des	la masse tumorale	N=7/31
	cellules tumorales		
	(Fig. 47 d)		



<u>Figure 47</u>: a : Score CD3 ε 1, l'infiltrat de LT est quasiment absent et relégué aux marges et à la périphérie de la tumeur, Gx50. b : Score CD3 ε 2, l'infiltrat de LT est nodulaire et périphérique, Gx50. c : Score CD3 ε 3, des formations nodulaires de LT sont retrouvées en périphérie et au centre de la tumeur, Gx50. d : Score CD3 ε 4, l'infiltrat de LT envahit toute la masse tumorale de manière diffuse, Gx50

c. Pax-5

Le marquage Pax-5 est d'expression nucléaire, d'intensité très forte et constante chez toutes les cellules marquées. Les cellules positives au marquage présentent une morphologie et une localisation compatible avec des lymphocytes B (Figure 48).



Figure 48 : Marquage Pax-5 nucléaire de forte intensité des lymphocytes B, Gx1000

Toutes les lames présentent des cellules positives au marquage, réparties en 4 groupes distincts selon notre système de notation. Les critères de ce score et effectifs associés à chaque groupe sont compilés dans le Tableau XX. La répartition des LB au sein de la tumeur suit le même schéma d'infiltration que les LT, mais dans une proportion moindre. L'infiltrat de LB est d'abord périphérique, s'organise en foyers et en travées envahissant la tumeur de manière centripète. La densité de LB est supérieure à celle des cellules tumorales au stade 4. On note une répartition parfois plus focale ou bien isolée des LB de manière comparative aux LT. Des foyers de nécrose sont également associés aux foyers de LB, mais dans une moindre mesure comparée aux observations faites avec les LT (Figure 49).

Le test de corrélation de Kendall montre une corrélation positive modérée entre le marquage Pax-5 et le groupe d'HCC (τ = 0.49, p-value= 0.004), ainsi qu'avec la présence de nécrose (τ = 0.37, p-value= 0.029). Aucune autre corrélation significative entre le comptage mitotique, la présence d'ulcération, ou d'infiltrats intraépidermiques et le marquage Pax-5 n'a été mise en évidence.

<u>Tableau XX</u> : Critères de lecture de l'immunomarquage Pax-5 au sein de l'HCC et effectifs associés

Immunomarquage	Degré d'infiltration	Distribution de	Score et effectifs
considéré	lymphocytaire	l'infiltrat	associés
		lymphocytaire	
	Absent à minimal	Diffus et périphérique	1
	(Fig. 49 a)	à la masse tumorale	N=11/32
	Modéré	Nodulaire et	2
Pax-5	(Fig. 49 b)	périphérique	N=13/32
	Marqué	Nodulaire, central et	3
	(Fig. 49 c)	périphérique	N=5/32
	Massif, densité	Nodulaire et diffus	4
	lymphocytaire	infiltrant la totalité de	
	supérieure à celle des	la masse tumorale	N=2/32
	cellules tumorales		
	(Fig. 49 d)		



<u>Figure 49</u> : a : Score Pax-5 1, l'infiltrat de LB est quasiment absent et relégué aux marges et à la périphérie de la tumeur, Gx50. b : Score Pax-5 2, l'infiltrat de LB est nodulaire et périphérique, Gx50. c : Score Pax-5 3, des formations nodulaires de LB sont retrouvées en périphérie et au centre de la tumeur, Gx50. d : Score Pax-5 4, l'infiltrat de LB envahit toute la masse tumorale de manière diffuse, Gx50

d. CD204

Le marquage CD204 est d'expression cytoplasmique, d'aspect granuleux, d'intensité forte et constante chez toutes les cellules marquées. Les cellules positives au marquage présentent une morphologie et une localisation compatible avec des macrophages tissulaires (Figure 50).



<u>Figure 50</u> : Marquage CD204 cytoplasmique et granuleux des macrophages tissulaires, Gx1000

Le marquage CD204 présente des cellules positives sur l'ensemble de la lame pour 30 cas sur 31. L'absence de témoins positifs internes sur une lame nous a conduits à écarter ce cas de nos analyses. Les critères de ce score et effectifs associés à chaque groupe sont compilés dans le Tableau XXI.

Deux localisations préférentielles des cellules positives ont été évaluées : la périphérie tumorales et ses marges proches ainsi que le centre de la tumeur. En périphérie, la densité de macrophages est plus élevée (63.3% de score 4 versus 33.3% en intra-tumoral). Les macrophages sont organisés en foyers (Figure 51 b), parfois associés aux infiltrats de LT et LB autour des foyers de nécrose tumorale. Au centre de la tumeur et en position sous-épidermique, la répartition des macrophages tissulaires est diffuse et homogène (Figure 51 a).

Le test de corrélation de Kendall montre une corrélation positive forte entre les marquages CD204 intra et péri-tumoraux (τ = 0.57, p-value= 0.002), ainsi qu'une corrélation positive forte à modérée avec le groupe d'HCC (intratumoral : τ = 0.66, p-value= 1.0e-05 ; péritumoral : τ = 0.43, p-value= 0.013). Une corrélation positive modérée avec la présence de nécrose est également établie (intratumoral : τ = 0.44, p-value= 0.017 ; péritumoral : τ = 0.46, p-value= 0.014). Aucune autre corrélation significative entre le comptage mitotique, la présence d'ulcération ou d'infiltrats intraépidermiques et le marquage CD204 n'a été mise en évidence.

Immunomarquage	Localisation de	Critères d'évaluation	Score et effectifs
considéré	l'infiltrat	(lecture sur 3	associés
		champs, 0.477mm ²)	
		< 5 cellules positives	1
			N=0/30
		5 à 100 cellules	2
	Intra-tumoral	positives	N=8/30
	(Fig. 51)	100 à 200 cellules	3
		positives	N=12/30
		> 200 cellules, amas	4
		cellulaires denses et	N=10/30
CD204		nodulaires	
		< 5 cellules positives	1
			N=0/30
		5 à 100 cellules	2
	Péri-tumoral	positives	N=5/30
	(Fig. 51)	100 à 200 cellules	3
		positives	N=6/30
		> 200 cellules, amas	4
		cellulaires denses et	N=19/30
		nodulaires	

<u>Tableau XXI</u> : Critères de lecture de l'immunomarquage CD204 au sein de l'HCC et effectifs associés



<u>Figure 51</u> : A gauche : marquage CD204 intra-tumoral des macrophages tissulaires, répartis de manière diffuse au sein de l'ensemble de la masse tumorale, Gx50. A droite : marquage CD204 péri-tumoral, présentant une densité importante de cellules marquées organisées en foyers en périphérie de la masse tumorale, Gx50

e. DC-LAMP

Le marquage DC-LAMP est d'expression cytoplasmique et d'aspect fortement granuleux. Son intensité est variable, allant de forte à modérée chez les cellules marquées. Les cellules positives au marquage présentent une morphologie et une localisation compatible avec des cellules dendritiques conventionnelles, aux longues ramifications cytoplasmiques. On note également la positivité de cellules rondes de grande taille contenant des débris cytoplasmiques, assimilables à des macrophages (Figure 52). Les kératinocytes prennent de manière sporadique et non-spécifique le marquage DC-LAMP.



<u>Figure 52</u> : Marquage DC-LAMP cytoplasmique et granuleux des cellules dendritiques conventionnelles (flèche noire) et de cellules rondes assimilables à des macrophages mentionnées précédemment (flèche rouge), Gx1000

Toutes les lames présentent des cellules positives au marquage, réparties en 4 groupes distincts selon notre système de notation. Les critères de ce score et effectifs associés à chaque groupe sont compilés dans le Tableau XXII.

La proportion de cellules dendritiques conventionnelles et de cellules marquées compatibles avec des macrophages est variable d'un cas à l'autre, sans qu'une nette tendance semble se dessiner. La répartition et la densité des cellules dans leur ensemble ont été évaluées, sans ségrégation et en prenant en compte deux localisations préférentielles de manière similaire à l'évaluation du marquage précédent. En région péri-tumorale comme intra-tumorale, les cellules positives sont réparties de manière éparse, des foyers sont rarement observables (Figure 53). On ne note pas de localisation particulière vis-à-vis des foyers lymphocytaires. On observe davantage de cas classés 3 à 4 à forte densité de cellules en région péri-tumorale (25,8%) qu'en région intra-tumorale (12.9%). La densité moyenne et médiane de cellules positives sont respectivement de 14.6 et 3 en intra-tumoral, contre 29.8 et 8 en péri-tumoral. Le test de comparaison des moyennes de Mann-Whitney-Wilcoxon ne montre pas de différence significative entre les moyennes des comptages intra et péri-tumoraux (p-value= 0.15). Le test de corrélation de Kendall montre néanmoins une forte corrélation positive entre les marquages DC-LAMP intra et péri-tumoraux (τ = 0.78, p-value= 1.2e-05). La densité observée de ces cellules immunitaires est beaucoup plus faible que celles des lymphocytes et macrophages tissulaires.

Le test de corrélation de Kendall montre également une corrélation positive modérée entre le marquage DC-LAMP et le groupe d'HCC (intratumoral : τ = 0.37, p-value= 0.037 ; péritumoral : τ = 0.41, p-value= 0.015). Aucune autre corrélation significative entre le comptage mitotique, la présence d'ulcération, d'infiltrats intraépidermiques ou de nécrose et le marquage DC-LAMP n'a été mise en évidence.

Immunomarquage	Localisation de	Critères d'évaluation	Score et effectifs
considéré	l'infiltrat	(lecture sur 3	associés
		champs, 0.477	
		smm²)	
		< 5 cellules positives	1
			N=18/31
		5 à 50 cellules	2
	Intra-tumoral	positives	N=9/31
	(Fig. 53)	50 à 100 cellules	3
		positives	N=3/31
		> 100 cellules	4
DC-LAMP		positives	N=1/31
		< 5 cellules positives	1
			N=14/31
	Péri-tumoral	5 à 50 cellules	2
	(Fig. 53)	positives	N=9/31
		50 à 100 cellules	3
		positives	N=6/31
		> 100 cellules	4
		positives	N=2/31

<u>Tableau XXII</u> : Critères de lecture de l'immunomarquage DC-LAMP au sein de l'HCC et effectifs associés



<u>Figure 53</u> : A gauche : marquage DC-LAMP intra-tumoral, les cellules positives sont réparties de manière diffuse au sein de l'ensemble de la masse tumorale, Gx200. A droite : marquage DC-LAMP péri-tumoral, la plus forte densité de cellules positives est retrouvée en périphérie de la tumeur, Gx100

f. CD206

Le marquage CD206 est d'expression cytoplasmique et uniforme. Son intensité est globalement modérée et variable. Les cellules positives au marquage présentent une morphologie et une localisation compatible avec les cellules tumorales et les macrophages (Figure 54). Les kératinocytes prennent également la marquage de manière sporadique et non-spécifique.



Figure 54 : Marquage CD206 cytoplasmique des cellules tumorales, Gx1000

Toutes les lames présentent des cellules positives au marquage, réparties en 4 groupes distincts selon notre système de notation. Néanmoins, cet immunomarquage n'a pas été réalisé sur un des cas. Les critères de ce score et effectifs associés à chaque groupe sont compilés dans le Tableau XXIII.

Les cellules tumorales et les macrophages sont donc positifs au marquage CD206. Les macrophages tissulaires semblent présenter un marquage constant, d'intensité forte, néanmoins il est compliqué d'évaluer clairement la population de macrophages positifs étant donné la grande proportion de cellules tumorales marquées. Ce marquage est variable pour les cellules tumorales, et d'intensité plus faible que celle des macrophages. On retrouve des tumeurs présentant des cellules tumorales négatives au CD206 dans 26.7% des cas. Ce marquage semble progresser dans sa localisation, en étant exprimé par les cellules tumorales en périphérie de la masse, puis au centre et enfin en position sous-épidermique (Figure 55). Le marquage est positif pour l'ensemble des cellules tumorales dans un tiers des cas. Etant donné la difficulté de ségrégation entre les macrophages et les cellules tumorales sur l'intensité du marquage, les critères d'évaluation se sont vu être réévalués et basés uniquement sur le marquage des cellules tumorales.

Le test de corrélation de Kendall montre une corrélation positive modérée entre le marquage CD206 et le groupe d'HCC (τ = 0.40, p-value= 0.018). Aucune autre corrélation significative entre le comptage mitotique, la présence d'ulcération, d'infiltrats intraépidermiques ou de nécrose et le marquage CD206 n'a été mise en évidence.

Immunomarquage	Critères d'évaluation : distribution des	Score et effectifs
considéré	cellules positives	associés
CD206	Absence de cellules tumorales positives	1
	(Fig. 55 a)	N=8/30
	Présence de cellules tumorales positives	2
	uniquement à la périphérie de la tumeur	N=2/30
	(Fig. 55 b)	
	Présence de cellules tumorales positives à	3
	la périphérie et au centre de la tumeur	N=10/30
	(Fig. 55 c)	
	Présence de cellules tumorales positives à	4
	la périphérie, au centre de la tumeur et en	N=10/30
	position sous-épidermique	
	(Fig. 55 d)	

<u>Tableau XXIII</u> : Réévaluation des critères de lecture de l'immunomarquage CD206 au sein de l'HCC et effectifs associés



<u>Figure 55</u> : a : Score CD206 1, absence de cellules tumorales positives sur l'ensemble de la tumeur, Gx50. b : Score CD206 2, les cellules tumorales sont positives en périphérie de la tumeur, Gx50. c : Score CD206 3, les cellules tumorales sont positives en périphérie et au centre de la tumeur. Les cellules positives éparses au marquage de forte intensité correspondent à des macrophages tissulaires, Gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positives sur l'ensemble de la tumeur, gx100. d : Score CD206 4, les cellules tumorales sont positiv

g. FoxP3

Le marquage FoxP3 est d'expression nucléaire et d'intensité forte. Les cellules positives au marquage présentent une morphologie et une localisation compatible avec des lymphocytes T CD4⁺ TReg (Figure 56).


<u>Figure 56</u> : Marquage FoxP3 nucléaire de forte intensité des lymphocytes T CD4⁺ TReg, Gx1000

Toutes les lames présentent des cellules positives au marquage, réparties en 4 groupes distincts selon notre système de notation. Néanmoins, cet immunomarquage n'a pas été réalisé sur un des cas, le même que précédemment. Les critères de ce score et effectifs associés à chaque groupe sont compilés dans le Tableau XXIV.

On ne retrouve pas de cellules positives pour ce marquage en périphérie chez 16.7% des cas (5/30) et 20% des cas (6/30) en intra-tumoral. Les cas ne présentant pas de cellules positives en intra et en péri-tumoral sont identiques. En périphérie de la tumeur, les cellules positives au marquage FoxP3 sont retrouvées préférentiellement au contact des nodules lymphocytaires, organisées en foyers (Figure 57 b). Ce n'est pas le cas dans le centre de la tumeur, où l'on retrouve des foyers de LT CD4⁺ TReg mais plus volontairement une répartition dispersée de ces derniers (Figure 57 a). La densité moyenne et médiane de cellules positives sont respectivement de 36.1 et 23 en intra-tumoral, contre 11.9 et 20 en péri-tumoral. Le test de comparaison des moyennes de Mann-Whitney-Wilcoxon ne montre pas de différence significative entre les moyennes des comptages intra et péri-tumoraux (p-value=0.92). Le test de corrélation de Kendall montre cependant une forte corrélation positive entre les marquages FoxP3 intra et péri-tumoraux (τ = 0.52, p-value= 0.001).

Aucune corrélation significative entre le groupe d'HCC, le comptage mitotique, la présence d'ulcération, d'infiltrats intraépidermiques ou de nécrose et le marquage FoxP3 n'a été mise en évidence.

Immunomarquage	Localisation de	Critères d'évaluation	Score et effectifs	
considéré	l'infiltrat	(lecture sur 3	associés	
		champs, 0.477mm ²)		
FoxP3	Intra-tumoral (Fig. 57)	< 5 cellules positives	1	
			N=8/30	
		5 à 30 cellules	2	
		positives	N=13/30	
		30 à 60 cellules	3	
		positives	N=3/30	
		> 60 cellules	4	
		positives	N=6/30	
		< 5 cellules positives	1	
	Péri-tumoral (Fig. 57)		N=5/30	
		5 à 30 cellules	2	
		positives	N=15/30	
		30 à 60 cellules	3	
		positives	N=6/30	
		> 60 cellules	4	
		positives	N=4/30	

<u>Tableau XXIV</u> : Critères de lecture de l'immunomarquage FoxP3 au sein de l'HCC et effectifs associés



<u>Figure 57</u> : A gauche : marquage FoxP3 intra-tumoral, les lymphocytes T CD4⁺ TReg marqués sont répartis en foyers ou de manière diffuse au sein de l'ensemble de la masse tumorale, Gx200. A droite : marquage FoxP3 péri-tumoral, les lymphocytes T CD4⁺ TReg marqués sont retrouvés concomitants aux foyers lymphocytaires, Gx200

D. Analyse des corrélations

Les tableaux regroupant les résultats des corrélations entre les différents paramètres évalués sont disponibles en annexe (Annexe 3 & 4).

1. Paramètres épidémiologiques et marquages immunohistochimiques

Les tests de corrélation effectués n'ont pas permis de mettre en évidence de corrélations significatives entre les paramètres épidémiologiques (sexe, âge et race) et les différents marquages immunohistochimiques.

2. Paramètres histologiques et marquages immunohistochimiques

Les tests de corrélation effectués n'ont pas permis de mettre en évidence de corrélations significatives entre les paramètres histologiques (comptage mitotique, présence d'ulcération, d'infiltrats intraépidermiques ou de zones de nécrose) et les différents marquages immunohistochimiques. Les valeurs du τ et de la p-value sont regroupées en annexe (Annexe 3).

3. Corrélations entre immunomarquages

a. CD3 ε

Le marquage CD3 ε présente de multiples corrélations avec les autres immunomarquages : corrélation forte et positive avec les marquages Pax-5 et CD204 intratumoral, corrélation positive et modérée avec les marquages CD204 péritumoral, DC-LAMP et CD206. Aucune corrélation significative avec le marquage FoxP3 n'est en revanche établie. Les valeurs du τ et de la p-value sont regroupées en annexe (Annexe 4). b. Pax-5

Le marquage Pax-5 présente différentes corrélations avec les autres immunomarquages : corrélation forte et positive avec le marquage CD3 ε , corrélation positive et modérée avec les marquages DC-LAMP et CD206. Aucune corrélation significative avec les marquages CD204 et FoxP3 n'est en revanche établie. Les valeurs du τ et de la p-value sont regroupées en annexe (Annexe 4).

c. CD204

Le marquage CD204 intratumoral présente une corrélation forte et positive avec le marquage CD3 ε , le CD204 péritumoral une corrélation positive et modérée avec CD3 ε . Seul le marquage CD204 intratumoral possède une corrélation positive et modérée avec le marquage DC-LAMP péritumoral. Aucune autre corrélation significative entre CD204 et les différents immunomarquages n'est établie. Les tableaux regroupant les valeurs du τ et de la p-value sont disponibles en annexe (Annexe 4).

d. DC-LAMP

Le marquage DC-LAMP intratumoral présente des corrélations positives et modérées avec les marquages CD3 ε , Pax-5 et CD206 ; DC-LAMP péritumoral des corrélations positives et modérées avec CD3 ε , Pax-5, CD206, CD204 intratumoral et FoxP3 intratumoral. Aucune autre corrélation significative entre DC-LAMP et les différents immunomarquages n'est établie. Les valeurs du τ et de la p-value sont regroupées en annexe (Annexe 4).

e. CD206

Le marquage CD206 présente des corrélations positives et modérées avec les immunomarquages CD3 ε , Pax-5, et DC-LAMP. Aucune autre corrélation significative entre CD206 et les différents immunomarquages n'est établie. Les valeurs du τ et de la p-value sont regroupées en annexe (Annexe 4).

f. FoxP3

Hormis une corrélation positive et modérée entre l'immunomarquage DC-LAMP péritumoral et FoxP3 intratumoral, les marquages FoxP3 intra et péritumoraux ne présentent pas de corrélation significative avec les autres immunomarquages. Aucune autre corrélation significative entre FoxP3 et les différents immunomarquages n'est établie. Les tableaux regroupant les valeurs du t et de la p-value sont disponibles en annexe (Annexe 4).

E. Conclusion sur les résultats

La caractérisation de l'infiltrat immunitaire au sein de l'HCC a été permise par l'analyse histologique et immunohistochimique de 31 cas provenant tous de chiens différents.

Le groupage des cas, basé sur l'évaluation de l'infiltrat lymphocytaire de Cockerell et Slauson, a permis d'obtenir une référence cinétique dans l'évolution de l'infiltrat immunitaire et de la régression tumorale. Des paramètres histologiques tels que le comptage mitotique, la présence d'ulcération de la tumeur, d'infiltrats intraépidermiques tumoraux et de foyers de nécrose ont été mis en regard de l'évolution de l'infiltrat immunitaire évaluée de manière spécifique grâce aux marquages immunohistochimiques.

La race Bouledogue français est surreprésentée dans notre étude avec 10 cas sur 31 et au moment de l'exérèse de la tumeur l'âge moyen était de 56 mois (4 ans et 8 mois), l'âge médian de 46 mois (3 ans et 10 mois). Aucune corrélation significative entre les paramètres épidémiologiques, histologiques et immunohistochimiques n'a été établie.

L'analyse histologique des lames HE révèle une évolution de l'organisation et de la morphologie des cellules tumorales en fonction du grade : les larges plages de cellules tumorales des stades initiaux laissent place à un infiltrat immunitaire centripète conséquent, conduisant à la dégénérescence (cellules plurinucléées, vacuolisation du cytoplasme, condensation et fragmentation nucléaire) des cellules tumorales. Le comptage mitotique est progressivement décroissant en fonction des groupes d'HCC, une corrélation négative modérée est établie entre ce comptage et le stade de la tumeur. L'ulcération superficielle, présente dans 24 cas sur 31 est non corrélable au groupe d'HCC. Le pourcentage d'infiltrats intraépidermiques tumoraux est de 35.5% (11/31 cas), ces infiltrats sont absents chez les tumeurs du groupe 1, paramètre toutefois non corrélé au groupe de la tumeur. Pour finir, la présence de plages et foyers de nécrose chez 26 cas sur 31 est modérément corrélée au groupe tumoral et une différence significative existe entre les cas des groupes 1 et 2 versus ceux des groupes 3 et 4.

Quant aux immunomarquages réalisés, on constate une positivité variable des cellules tumorales à l'Iba-1. On note une corrélation positive forte à modérée entre le groupe d'HCC et les marquages CD3 ε , Pax-5, CD204, DC-LAMP et CD206. Les LT et LB représentent la

majorité de l'infiltrat immunitaire, associés aux macrophages. Les LT et les macrophages sont associés significativement à la présence de foyers de nécrose tumorale. L'infiltration de la tumeur par les cellules dendritiques, suivant un schéma périphérique puis central au sein de la tumeur suit celle des lymphocytes et macrophages. Par ailleurs, le marquage DC-LAMP visant initialement les cellules dendritiques conventionnelles marque également des cellules à la morphologie compatible avec celle des macrophages. La distinction des macrophages M2 pro-tumoraux à l'aide du marquage du CD206 est trop peu spécifique et se retrouve avec une intensité moindre chez les cellules tumorales. L'évolution spatiale du marquage CD206 des cellules tumorales, de la périphérie puis vers le centre et en partie sous-épidermique est directement corrélée de manière modérée au groupe d'HCC, et donc à l'infiltration par les cellules immunitaires. Des cellules immunitaires au phénotype pro-tumoral, les LT TReg, sont présentes au sein des tumeurs étudiées dans plus de 75% des cas, mais de manière non corrélée au grade de la tumeur, rarement aux autres immunomarquages.

IV. Comparaison avec les données de la littérature

A. Paramètres épidémiologiques

Certains paramètres épidémiologiques étaient renseignés de manière incomplète avec les commémoratifs, néanmoins une confrontation avec les données de la littérature est possible.

A propos du site d'exérèse, il n'est mentionné uniquement que pour 4 individus et concerne l'angle interne de l'œil, les pavillons auriculaires et la face dorsale du métacarpe. Ces localisations sont en accord avec les localisations préférentielles d'apparition de l'HCC décrites dans la littérature (Goldschmidt et al. 1992; Morrison 2002; Maxie 2016).

Le sexe ne constitue pas un facteur de risque associé au développement d'un HCC, dans notre étude aucune relation significative n'est démontrée entre ces deux paramètres.

Au moment de l'exérèse, les individus présentaient un âge moyen de 56 mois (4 ans et 8 mois) +/- 14,5 mois et un âge médian de 46 mois (3 ans et 10 mois). On remarque que l'âge médian est bien inférieur à l'âge moyen, ce dernier est impacté par les nombreux cas supérieurs à 5 ans (8/29 cas renseignés). Globalement, l'âge d'incidence au sein de notre étude est élevé par rapport aux données de la littérature (Baines et al. 2008). L'incidence de ce type tumoral décroit rapidement après 3 ans (Moore 2014). La petite taille de notre effectif couplée à la présence de quelques cas d'âge avancé peut expliquer cet âge moyen élevé.

Parmi les 32 chiens de l'étude, on dénombre 30 chiens de race pure et 2 chiens croisés. Le Bouledogue Français est surreprésenté avec quasiment un tiers des cas. L'incidence augmentée de l'HCC chez les chiens de race pure est indéniable d'après la bibliographie, et les odds ratio sont significativement plus élevés pour le Boxer, le Teckel ou encore le Pinscher

(Goldschmidt et al. 1992; Dobson et al. 2011). Cependant, notre étude ne permet pas de garantir la « pureté » de la race des animaux sélectionnés, les commémoratifs inscrits correspondant généralement plus à un morphotype de race plutôt qu'à une race pure. De plus, la proportion des animaux de race au sein de la population dont les cas sont issus n'est pas connue, rendant difficile toute interprétation de prévalence de l'HCC.

B. Groupes d'HCC

Le groupage des cas repose sur la classification de Cockerell et Slauson, basée sur l'évaluation de l'infiltration lymphoïde au sein de l'HCC. Elle fait office de référence et a été reprise depuis dans de nombreuses études (Kipar et al. 1998; Kaim et al. 2006; Pires et al. 2009; Paździor-Czapula et al. 2015). Cette classification croissante et chronologique du stade tumoral permet de constituer une référence et d'ajouter un aspect cinétique à l'étude de l'infiltrat immunitaire.

La répartition des 32 cas au sein des 4 groupes est hétérogène. Les groupes 3 et 4 présentent un effectif total plus important que les groupes 1 et 2 réunis. Les cas tardifs présentant une infiltration importante sont davantage représentés au sein de notre étude, cette répartition peut s'expliquer par le temps d'évolution puis de régression relativement court de l'HCC (intervalle de 3 mois en moyenne), ce qui laisse peu de temps à sa détection puis son exérèse. Les cas du groupe 1 représentent le second effectif des 4 groupes. Ceci laisse à penser que la phase d'infiltration par les cellules immunitaires intervient après un certain laps de temps, une infiltration immunitaire rapide aurait grandement réduit le nombre de cas dans le groupe 1. Néanmoins, il est impossible de déterminer si l'infiltration immunitaire est concomitante de la croissance tumorale ou si elle intervient après une phase de développement maximale de tumeur. Par ailleurs, les groupes 2, 3 et 4 marquent clairement une rupture avec le groupe 1 et correspondent au début de l'infiltration immunitaire. De multiples paramètres reflètent cet état inflammatoire et anti-tumorale, que ce soit histologiquement - présence d'un infiltrat majoritairement lymphocytaire – ou bien biochimiquement par l'accroissement des cytokines pro-inflammatoires Th1, démontré par la réalisation de PCR (« Polymerase Chain Reaction ») semi-quantitatives dans la littérature (Kaim et al. 2006; Paździor-Czapula et al. 2015).

Les différentes études mentionnées dans le tableau ci-dessous présentent un mode de sélection des cas homogène, comparable à ce qui a été mené dans nos travaux. La cinétique de l'infiltration lymphocytaire y est également clairement objectivable, cependant ces études ne montrent pas de nette démarcation entre la répartition des cas au sein des groupes d'HCC.

<u>Tableau XXV</u> : Synthèse bibliographique de la répartition des cas d'HCC au sein des 4 groupes selon la classification de Cockerell et Slauson dans les études considérées (Cockerell et al. 1979; Kipar et al. 1998; Kaim et al. 2006; Puff et al. 2013; Pires et al. 2009; Pires, Rodrigues, et al. 2013; Pires, Alves, et al. 2013; Paździor-Czapula et al. 2015)

Etudes considérées	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Effectif total
(Cockerell et	18	48	19	8	93
al. 1979)	(19,3%)	(51,6%)	(20,4%)	(8.7%)	
(Kipar et al.	24		21		45
1998)	(53.3%)		(46.7%)		
(Kaim et al.	6	5	10	9	30
2006)	(20%)	(16.7%)	(33.3%)	(30%)	
(Pires et al.					
2009), (Pires,					
Rodrigues, et	15	15	42	21	93
al. 2013),	(16.1%)	(16.1%)	(45.2%)	(22.6%)	
(Pires, Alves,					
et al. 2013)					
(Puff et al.	7	6	7	7	27
2013)	(25,9%)	(22.3%)	(25.9%)	(25,9%)	
(Paździor-	13	27	17	8	65
Czapula et	(20%)	(41.5%)	(26.2%)	(12.3%)	
al. 2015)					
Thèse	9	4	12	7	32
	(28.1%)	(12.5%)	(37.5%)	(21.9%)	

C. Paramètres histologiques

1. Morphologie des cellules tumorales

Les cellules tumorales présentent des variations de morphologie et d'organisation en fonction de l'état d'infiltration de la tumeur par les cellules immunitaires anti-tumorales, principalement les lymphocytes.

Au fur et à mesure de l'infiltration par les lymphocytes et macrophages, l'architecture du tissu tumoral est modifiée, laissant apparaître des cellules polygonales. Ces modifications structurales font suite à la lyse du stroma tumoral par les enzymes protéolytiques et les MMP des cellules immunitaires (Puff et al. 2013). Les cellules tumorales présentent des signes de dégénérescence et de mort cellulaire : cytoplasme vacuolisé, éosinophilie marquée du cytoplasme (secondaire à la diminution des ARNm basophiles cytoplasmiques et à la dégradation des protéines cytoplasmiques), noyau condensé et fragmenté. Les mécanismes

d'induction de l'apoptose (toxicité cellulaire directe ou indirecte) majoritairement médiés par les LT CD8⁺ cytotoxiques au sein de l'HCC sont responsables des phénomènes de dégénérescence observés chez les cellules tumorales (Kaim et al. 2006; Moore 2014). Des mécanismes non directement liés à l'action des cellules immunitaires sont également susceptibles de rentrer en cause, tels que des modifications environnementales (hypoxie, déplétion en nutriments) ou intracellulaires (altération génomique) à l'origine d'un stress cellulaire important activant les mécanismes de l'apoptose (Gerl 2004).

2. Comptage mitotique

Les valeurs médianes du comptage mitotique sont décroissantes en fonction des groupes d'HCC. Les groupes 2 et 3 présentent des échantillons avec un comptage mitotique de grande amplitude. La différence des moyennes des comptages entre les 4 groupes n'est pas significative, néanmoins une tendance à la décroissance en fonction de l'évolution de l'infiltration immunitaire est notable malgré une p-value non significative (p-value= 0.08).

La valeur du comptage mitotique nous renseigne sur la prolifération des cellules tumorales, ce paramètre fait partie intégrante de la caractérisation tumorale, un fort index de prolifération est rattachable principalement aux tumeurs malignes. L'HCC présente un index de prolifération relativement élevé par rapport aux autres tumeurs cutanées canines malgré un caractère bénin (Martin De Las Mulas et al. 1999). Dans notre étude, le comptage mitotique est inversement corrélé de manière modérée au groupe d'HCC et donc à l'infiltration lymphocytaire. On peut en déduire que l'infiltrat immunitaire progresse soit lors d'une phase de décroissance tumorale, soit que son action directe sur les cellules tumorales limite le développement de la tumeur par inhibition de l'activité mitotique des cellules tumorales. Des travaux similaires, prenant en compte la valeur maximale du comptage mitotique sur l'ensemble des champs notent également une corrélation négative entre comptage mitotique et infiltration lymphocytaire (Paździor-Czapula et al. 2015). Cependant, aucune étude ne note de différence significative entre les comptages mitotiques ou index de prolifération des 4 groupes d'HCC, à l'instar de l'étude de Pires et al. qui se base sur l'étude du Ki67 dans 93 cas d'HCC. L'utilisation du marqueur de prolifération Ki67 permet de s'affranchir des biais rencontrés lors du comptage mitotique, notamment les variations de densité de cellules tumorales entre champs et groupes considérés. La corrélation avec l'infiltrat lymphocytaire n'y est pas réalisée mais les travaux ne révèlent pas de corrélation entre index de prolifération et apoptotique (Pires, Alves, et al. 2013).

Nos résultats concernant le comptage mitotique vont dans le sens des études préexistantes, la prolifération tumorale semble être négativement corrélée à l'infiltration lymphocytaire malgré une absence de nette différence entre comptage mitotique des différents groupes d'HCC. Cependant, notre comptage mitotique peut être sous-estimé chez les tumeurs fortement infiltrées, présentant une densité de cellules tumorales moindre. L'étude au protocole d'évaluation le plus solide utilisant le marqueur antigénique Ki67 ne semble pas soutenir l'hypothèse d'une diminution de la prolifération tumorale proportionnelle à l'infiltration lymphoïde. Les auteurs en concluent que la régression tumorale de l'HCC est

principalement due à un déséquilibre entre prolifération et mort cellulaire plutôt qu'à une chute brutale d'un de ces deux paramètres, paramètres déterminant conjointement la croissance ou la régression tumorale (Pires, Alves, et al. 2013).

3. Ulcération

L'ulcération superficielle des HCC est fréquemment rapportée par la littérature, quelques soit le degré d'infiltration immunitaire considéré, dans des proportions allant de 52 à 92% des cas. Aucune relation de corrélation significative entre ulcération et infiltration lymphocytaire ou comptage mitotique n'a été mise en évidence dans notre étude et les articles actuels (Kipar et al. 1998; Kaim et al. 2006). Cependant, nos observations et celles de Cockerell *et al.* montrent un pourcentage de présence d'ulcération maximal chez les cas fortement infiltrés par les lymphocytes (Cockerell et al. 1979).

Selon la nature tumorale, la présence et la caractérisation de l'ulcération peut constituer un indicateur de malignité (prolifération rapide, agressivité locale) et constituer un facteur pronostic défavorable (Balch et al. 1980). L'ulcération superficielle intervient lors d'une dégradation directe ou indirecte de l'épithélium par les cellules tumorales (infiltrations intraépidermiques de l'épithélium, infiltration des vaisseaux sanguins environnants), lors d'une croissance tumorale extrêmement rapide, aboutissant à une mort cellulaire massive par déplétion en oxygène et nutriments, ou encore secondairement à des traumatismes cutanée associés à la taille et au relief de la masse. Cependant l'HCC ne constitue pas un processus néoplasique malin localement agressif, l'hypothèse traumatique semble être à privilégier malgré un index de prolifération élevé et un phénomène d'infiltration intra-épidermique tumoral avéré. De plus, notre étude ne relève pas de corrélation significative entre ulcération superficielle et présence d'infiltrats tumoraux intraépidermiques.

Par ailleurs, des infiltrations de PNN dans les tissus sous-jacents sont parfois rapportées par la littérature, ce qui n'a pas été constaté dans notre étude (Puff et al. 2013). La présence de parakératose épithéliale est parfois mentionnée – 21% des cas, (Paździor-Czapula et al. 2015) – mais relevée de manière sporadique au sein de nos cas.

4. Infiltrats intraépidermiques

L'épithéliotropisme des cellules tumorales est retrouvé dans 31.5% des cas, il se manifeste par des infiltrats de taille variable (quelques cellules à plusieurs centaines de cellules) s'immisçant entre les couches de kératinocytes, déformant la membrane basale et la structure de l'épithélium malpighien. Ces infiltrats intraépidermiques sont caractéristiques de l'HCC et fréquemment décrits : la proportion d'épithéliotropisme chez les cas étudiés varie de 19 à plus de 75% (Moore et al. 1996; Moore 2014; Paździor-Czapula et al. 2015; Maxie 2016). Comme vu précédemment, on ne retrouve pas de corrélation significative entre infiltrats intraépidermiques et ulcération superficielle, de plus l'absence d'épithélium sain rend difficile

cette évaluation. Concernant les groupes d'HCC, on constate une absence d'infiltrats chez les 8 cas du groupe 1, les autres groupes présentant des pourcentages d'épithéliotropisme homogènes variant de 43 à 50%. L'infiltration de l'épiderme par les cellules tumorales s'effectuerait donc à partir d'un certain stade, dans notre étude elle est concomitante de l'apparition de l'infiltrat lymphocytaire à la périphérie de la tumeur.

Chez le chien, les tumeurs cutanées à tropisme épithéliales sont représentées par les mélanomes, les mélanocytomes, les lymphomes épithéliotropes et les HCC (Goldschmidt et al. 1992). Les mécanismes associés à l'envahissement épidermique par les tumeurs cutanées sont encore flous. Dans le cas de l'HCC, les cellules tumorales issues de précurseurs dermiques des cellules de Langerhans pourraient acquérir cette capacité de migration à travers la membrane basale via l'expression de molécules d'adhésion, en particulier CD44, ICAM-1 et VLA-4 (Moore et al. 1996). Le CD44 autorise la liaison à l'acide hyaluronique, composant de la lame basale et réticulaire de la membrane basale ; l'ICAM-1 l'adhésion avec les β 2-intégrines des cellules epithélio-endothéliales et VLA-4 (\beta1-intégrines) l'adhésion aux fibronectines de la matrice extracellulaire (Moore et al. 1996; Marlin et al. 1998). Ces molécules d'adhésion sont exprimées par les cellules de Langerhans épidermiques uniquement durant leur différenciation et maturation, lors de leur migration vers le NL locorégional après captation de l'antigène. Cette modification phénotypique des cellules tumorales s'accompagne donc de l'acquisition d'une mobilité, vers le NL locorégional mais également l'épithélium. L'activation des cellules tumorales, secondaire à une stimulation antigénique, pourrait constituer la condition à l'acquisition d'un phénotype mature autorisant la mobilité vers l'épithélium. Cette stimulation antigénique semblerait avoir lieu en même temps que l'infiltration lymphocytaire de l'HCC.

L'étude de Paździor-Czapula *et al.* évalue le niveau d'expression des molécules d'adhésion membranaires par les cellules tumorales de l'HCC en fonction du stade tumoral. L'expression des β 2-intégrines (CD18) et de la E-cadhérine est y quantifiée et mise en regard de l'infiltrat lymphocytaire. Il en ressort une corrélation modérée et positive significative entre infiltration lymphocytaire et l'expression du CD18 (r= 0.303, p-value= 0.014), ainsi qu'une corrélation modérée et négative significative avec l'expression de la E-cadhérine (r= - 0.263, p-value= 0.036). L'augmentation de l'expression de protéines d'adhésion et la perte progressive de la E-cadhérine autorisant une migration des cellules tumorales est donc concomitante à l'infiltration lymphocytaire (Baines et al. 2008; Pires et al. 2009; Paździor-Czapula et al. 2015). Cette maturation est accompagnée d'autres modifications phénotypiques comme l'expression membranaire du CMH II, physiologiquement associée à l'activation des cellules dendritiques. Nous verrons par la suite l'importance de la maturation des cellules tumorales dans les mécanismes de régression tumorale de l'HCC (Kipar et al. 1998; Pires, Rodrigues, et al. 2013).

5. Foyers et plages de nécrose

La présence de plages ou de foyers de nécrose visait à caractériser et évaluer qualitativement une partie de la destruction des cellules tumorales. On retrouve ces foyers dans 84% des cas (26/31) au sein de notre étude, les cas qui ne présentent pas de nécrose proviennent des groupes 1 et 2. Une différence significative est établie entre les groupes 1/2 et 3/4, ainsi qu'une corrélation positive modérée entre présence de nécrose et infiltration lymphocytaire. La nécrose des cellules tumorales est donc présente dès les premiers stades de développement de l'HCC, et devient majeure lors de la progression de l'infiltrat immunitaire. Aucune quantification des zones de nécrose n'a été effectuée dans notre étude, mais on peut affirmer de manière qualitative que les foyers de nécrose sont présents de manière plus importante au fur et à mesure de l'infiltration. Au sein des études considérées, la présence de nécrose associée à l'infiltrat lymphocytaire est clairement rapportée de manière qualitative (Cockerell et al. 1979; Pires, Alves, et al. 2013; Moore 2014).

Cependant, la destruction des cellules tumorales passe davantage par des phénomènes actifs comme l'apoptose. L'étude de l'évolution de ce paramètre au sein de l'HCC permet d'expliciter plus spécifiquement la destruction des cellules tumorales. La méthode TUNEL (« Terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated biotin dUTP nick-end Labelling ») permet de déterminer un index apoptotique en se basant sur la présence des fragments d'ADN clivés par les nucléases lors du processus d'apoptose. L'HCC présente un index apoptotique modéré par rapport aux autres tumeurs cutanées canines, il est extrêmement variable selon les études, allant de 1 à 40% (Martin De Las Mulas et al. 1999; Guvenc et al. 2002; Kaim et al. 2006; Pires, Alves, et al. 2013). Ces différences peuvent s'expliquer par les différences de protocoles et l'absence de classification des tumeurs en fonction du stade de régression, réalisé uniquement dans les études de Kaim et al. et Pirès et al. Contrairement à nos observations qualitatives sur la présence de nécrose, ces études ne démontrent pas de différence significative entre les index apoptotiques des 4 groupes d'HCC. L'absence d'augmentation de l'index apoptotique chez les cas fortement infiltrés et considérés en voie de régression est étonnante, d'autant plus qu'ils présentent qualitativement des foyers de nécrose conséquents par rapport aux cas de stade 1. Cependant, l'index apoptotique n'est pas corrélé avec le comportement biologique de la tumeurs chez certains types tumoraux (Kaim et al. 2006). De plus, l'évaluation du développement tumoral repose sur l'analyse conjointe de l'index de prolifération, de l'index apoptotique et de la phagocytose pour être interprétable (Kerr et al. 1994; Soini et al. 1998). Il est suggéré que cette absence d'augmentation de l'apoptose chez les cas en régression correspond à un turn-over élevé des cellules apoptotiques, phénomène retrouvé chez les histiocytoses langerhansiennes humaines : on y dénombre un index apoptotique (via la méthode TUNEL) faible malgré une activité Fas-L (liguand apoptotique) élevée et la présence d'une régression de cette prolifération (Petersen et al. 2003).

L'accroissement des zones de nécrose observées au sein de notre étude proportionnellement à l'infiltrat lymphocytaire ne pas reflète donc pas de manière correcte la destruction tumorale. Les travaux réalisant un index apoptotique par le biais de la méthode TUNEL sont davantage informatifs sur l'amplitude de la destruction tumorale. Il s'avère qu'à l'instar de l'index de prolifération, l'index apoptotique de l'HCC ne subit pas de forte variation au cours de la progression de l'infiltrat lymphocytaire.

D. Marquages immunohistochimiques

1. Iba-1

Tous les cas sauf celui mentionné précédemment présentent des cellules tumorales positives à l'immunomarquage Iba-1. Les cellules de la lignée histiocytaire présentes sont également toutes positives au marquage comme décrit dans la littérature, à savoir les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques interstitielles et les macrophages (Pierezan et al. 2014). A noter que les kératinocytes prennent le marquage de manière sporadique et non spécifique, ce phénomène est parfois observé avec d'autres immunomarquages (DC-LAMP et CD206 dans notre étude). La positivité du marquage est uniquement évaluée de manière qualitative, mais l'intensité du marquage semble présenter des variations en fonction des cellules positives. Les variations d'intensité du marquage Iba-1 peuvent s'expliquer par une activation ou maturation différente des cellules tumorales au fur et à mesure de l'infiltration par les cellules anti-tumorales.

Chez l'Homme, la maturation de certaines cellules de la lignée macrophagique (les cellules microgliales) durant les phénomènes inflammatoires passe par une surexpression de la protéine lba-1 (Imai et al. 2002; Greter et al. 2015). Cependant, l'expression de l'Iba-1 chez les cellules à l'origine de l'HCC – les cellules dendritiques immatures dermales CD14⁺ – n'a jamais été évaluée, chez l'Homme ou chez le chien. A la vue de nos résultats concernant le marquage lba-1 des cellules tumorales, de la forte suspicion d'HCC très précoce lba-1⁻ et du modèle d'activation des cellules microgliales, on peut émettre l'hypothèse d'une éventuelle maturation et activation des cellules tumorales au fur et à mesure du développement tumoral, concomitante ou débutant avant l'infiltration lymphocytaire. Le marquage lba-1 pourrait permettre d'objectiver l'état d'activation des cellules tumorales de l'HCC. Aucune étude évaluant la positivité du marquage lba-1 des cellules en fonction de l'infiltrat immunitaire n'est néanmoins recensée.

2. CD3 ε

L'infiltration par les LT est principalement focale et diffuse. Les effectifs observés des groupes du score du CD3 ε sont extrêmement proches de ceux des groupes d'HCC (forte corrélation positive entre ces deux paramètres). Ce résultat n'est pas étonnant étant donné que le système de notation repose sur l'état d'infiltration par les lymphocytes et plus spécifiquement des LT pour le marquage CD3 ε . Néanmoins on retrouve un infiltrat minimal ou absent chez 6 cas pour le groupe d'HCC et 9 cas pour CD3 ε . Ceci suggère que d'autres lymphocytes, notamment les LB, infiltrent précocement la tumeur et ce avant l'infiltration par les LT. On retrouve une corrélation positive modérée entre présence de nécrose et l'infiltration par les LT. Ce résultat est compatible avec l'action cytotoxique des LT CD8⁺ sur les cellules tumorales, et l'accumulation de débris cellulaires secondaires à la mort des cellules tumorales ainsi que des cellules immunitaires engagés dans la lutte anti-tumorale.

Le schéma d'infiltration par les LT décrit dans la littérature et en premier lieu par Cockerell *et al.* correspond à celui observé dans notre étude, progressant de la périphérie vers le centre de la tumeur. L'extravasation des lymphocytes après leur activation au sein des organes lymphoïdes s'effectue par les capillaires sanguins péritumoraux (Bellone et al. 2013). La migration de ces derniers est médiée par des facteurs chimiotactiques, issus des cellules tumorales et des cellules inflammatoires présentes sur le site (van der Woude et al. 2017). De plus, la migration des lymphocytes est facilitée par l'action des métalloprotéases, sécrétées par les cellules tumorales, les cellules stromales et les cellules inflammatoires. Ces molécules dégradent la matrice extracellulaire, autorisant le développement tumoral mais également la progression des cellules immunitaires, qui semble prévaloir dans le cas de l'HCC. La MMP-9 semble jouer un rôle clef dans l'infiltration lymphocytaire en clivant le collagène IV de la lame endothéliale des capillaires sanguins péri-tumoraux de l'HCC, zone où son expression a été démontrée la plus forte (Leppert et al. 1995; Puff et al. 2013).

L'infiltration par les lymphocytes T constitue la pierre angulaire de la régression tumorale de l'HCC, notamment par l'action cytotoxique directe des LT CD8⁺. Les LT CD8⁺ ne constituent pas le seul sous-type de LT présent au sein de l'infiltrat, leur action nécessitant une costimulation par les LT CD4⁺ helper. Certaines études rapportent la faible présence de LT CD4⁺ par rapport au contingent de CD8⁺ (Moore et al. 1996). En revanche, l'étude Kaim et al. démontre une présence accrue des LT CD4⁺ par rapport aux LT CD8⁺ sur les cas d'HCC classés 1, après dénombrement cellulaire. Le ratio CD4/CD8 change ensuite de manière significative à partir des cas du groupe 2 en faveur des LT CD8⁺ (1278/mm2 vs 918/mm2 LT CD4⁺ au sein du groupe 4). Les LT CD4⁺ sont donc majoritaires au début de l'infiltration lymphocytaire de la tumeur. Ces cellules possèdent un rôle majeur dans l'initiation de la réponse anti-tumorale, principalement par libération de cytokines stimulatrices et par co-stimulation antigénique, aboutissant à l'amorçage de la réponse immunitaire spécifique des LT CD8⁺ cytotoxiques (Barry et al. 2002; Kaim et al. 2006). Les LT CD4⁺ possèdent également d'autres fonction antitumorales telles que le recrutement et l'activation de l'activité des macrophages sur le site tumoral (Hung et al. 1998). Leur présence au début de l'infiltration lymphocytaire est donc cohérente. Cependant, les LT CD4⁺ ne sont que co-stimulateurs et non initiateurs de la réponse immunitaire spécifique, la fonction de présentation de l'antigène étant réalisée par les CPA, caractérisées dans les parties suivantes de notre étude.

3. Pax-5

Le schéma global d'infiltration par LB est similaire à celui observé avec les LT, cette infiltration est centripète et fait suite aux mêmes mécanismes d'arrivée sur le site tumoral évoqués pour les LT. Néanmoins, et de manière qualitative dans notre étude, la densité de cellules B est inférieure à celle des LT, et ce pour tous les groupes d'HCC. La répartition des LB au cours de l'infiltration est également légèrement différente, on retrouve soit davantage de foyers riches en LB soit davantage de cellules isolées. On note une forte corrélation positive entre la présence de LB et LT, ce qui laisse supposer une action synergique entre ces deux populations lymphocytaires. Cependant, les effectifs du score de Pax-5 sont moins élevés que ceux de CD3

 ε à partir des HCC du groupe 3 présentant une forte infiltration lymphocytaire (groupe 3 : 5 versus 15, groupe 4 : 2 versus 7) et une corrélation plus faible entre groupe d'HCC et LB (τ = 0.49) plutôt qu'avec les LT (τ = 0.89) est notée. On peut donc émettre l'hypothèse d'une action anti-tumorale moindre des LB, ou indirecte, passant majoritairement par une initiation de la réponse spécifique puis par une stimulation de la réponse anti-tumorale des LT. Il est d'ailleurs admis que les LB présentent un rôle co-stimulatoire au sein de l'immunité anti-tumorale, plus rarement une toxicité directe (immunoglobulines-dépendante) à l'encontre des cellules tumorales (Tsou et al. 2016; Sarvaria et al. 2017).

Les travaux de Pires, Paździor-Czapula, Kaim *et al.* rapportent également la possible action synergique entre LB et LT dans la régression de l'HCC, basée sur la corrélation LB/LT. La densité plus faible de LB par rapport aux autres lymphocytes est notée de manière qualitative chez ces auteurs et objectivée par dénombrement par Kaim *et al.* : 7, 133, 174 et 221 cellules B/mm² respectivement pour les groupes d'HCC 1, 2, 3 et 4. Ces valeurs sont largement inférieures à celles observées pour les LT tout sous-type confondu (76, 1369, 1345 et 1071 cellules T/mm²). La fonction principale des LB dans la régression tumorale est donc en relation avec leur apparition précoce observée au sein de l'infiltration dans notre étude et les études rapportées. Les LB autorisent une présentation partielle de l'antigène via leur CMH II ainsi qu'une co-stimulation antigénique des LT par liaison via le CD40 et la protéine membranaire B7, permettant ensuite la mise en place d'une réponse anti-tumorale spécifique (Tsou et al. 2016; Sarvaria et al. 2017).

4. CD204

Concernant l'évaluation de l'infiltrat macrophagique, l'absence de cellules positives en tissu tumoral et en tissu sain sur une lame nous a poussés à exclure un cas de notre étude.

L'infiltration de la tumeur par les macrophages a été basée sur nos premières observations et sur le modèle de comportement des TAM dans certaines tumeurs solides humaines, nécessitant un système de notation prenant en compte leur localisation spatiale (Ohno et al. 2002). Les macrophages présentent une forte infiltration en périphérie de la tumeur, parfois organisés en foyers contrairement au centre de la tumeur où ils sont répartis de manière diffuse. Une forte corrélation positive est notée entre macrophages péri et intratumoraux, ainsi qu'avec le groupe d'HCC. Les effectifs réduits en intra-tumoral par rapport au comptage péri-tumoral montrent clairement une infiltration centripète. Une corrélation positive modérée avec la présence de nécrose est également établie. Les macrophages, notamment de phénotype M1, présentent donc une action tumoricide indéniable, activés par les cytokines du profil Th1 sécrétées majoritairement par les LT CD4⁺. L'augmentation significative des cytokines de ce profil activant une réponse immunitaire spécifique cellulaire (IL-2, IFN-y et TNF- α) proportionnelle à l'infiltration lymphocytaire a été démontrée par Kaim *et al.* (Kaim et al. 2006). L'IFN-y augmente l'activité cytotoxique des macrophages et favorise leur recrutement. Une boucle de stimulation se met en place, la libération accrue de TNF- α par les macrophages objectivée par Kaim et al. promeut à son tour la prolifération lymphocytaire (Ohno et al. 2002; Kaim et al. 2006; Cheville 2009). L'infiltrat macrophagique présente donc une cinétique comparable à celle des LT, retrouvée dans notre étude mais également dans la bibliographie (Tableau XXXI).

<u>Tableau XXVI</u> : Synthèse bibliographique de l'étude de l'infiltration des macrophages en fonction du groupe d'HCC considéré. La méthode d'évaluation des macrophages et les marqueurs ciblés sont précisés pour chaque étude (Kipar et al. 1998; Kaim et al. 2006; Puff et al. 2013; Pires, Rodrigues, et al. 2013)

Etude considérée	Méthode d'évaluation	Cible	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Effectif total
(Kipar et al. 1998)	IHC	Lysozyme, leucocyte- protéine L1	Qualitative : présence positive de macrophages				
(Kaim et al. 2006)	PCR semi- quantitative	ARNm iNOS, % d'échantillons positifs	0/6 (0%)	3/5 (60%)	7/10 (70%)	7/9 (78%)	30
(Puff et al. 2013)	IHC	MMP9	Qualitative : présence positive de macrophages				
(Pires, Rodrigues, et al. 2013)	IHC	MAC387, + : 0-10% de cellules positives, ++ : 10 à 50%	+ : 13/14 ++ : 1/14	+ : 12/15 ++ : 3/15	+ : 26/42 ++ : 16/42	+ : 13/21 ++ : 8/21	92

Dans notre étude, la présence des macrophages au sein de l'infiltrat immunitaire de l'HCC est principalement retrouvée de manière qualitative, mais mise en regard du groupe d'HCC et donc de l'infiltrat lymphocytaire. On note globalement une augmentation de l'infiltration par les macrophages autour des groupes 2 et 3, soit légèrement après l'afflux de lymphocytes. Ceci peut s'expliquer par le recrutement plus tardif des macrophages suite à la production d'IFN-y par les LT CD4⁺. Le marquage CD204 et les marquages proposés dans la littérature ne permettent pas faire le distinguo entre macrophages M1 et M2, aux comportements opposés vis-à-vis de la tumeur. En effet, il a été démontré que l'expression de la iNOS est étonnamment similaire entre les macrophages M1 et M2. MAC387 est révélateur de la lignée granulo-monocytaire et la production de MMP9 n'est pas retrouvée uniquement chez les macrophages (Pires, Rodrigues, et al. 2013; Puff et al. 2013). Le marquage CD206 présenté par la suite a été réalisé dans un objectif de ségrégation du phénotype des macrophages (Heinrich et al. 2017).

5. DC-LAMP

Une partie des cellules DC-LAMP⁺ présentent des caractéristiques morphologiques spécifiques des cellules dendritiques, telles que des dendrites cytoplasmiques. Leur localisation nous conduit à considérer ces cellules comme des cellules dendritiques conventionnelles. Néanmoins, on retrouve aussi des cellules positives à la morphologie compatible avec celle des macrophages, sans constater qualitativement de prépondérance d'une de ces populations par rapport à l'autre. La répartition des cellules marquées au sein de la tumeur est d'abord périphérique puis centrale (deux fois plus de lames de score 3 et 4 à forte densité de cellules positives en péri-tumoral). La moyenne des comptages péri-tumoraux est également deux fois supérieure à celle des comptages intra-tumoraux, malgré une différence non significative entre les comptages intra et péri-tumoraux des cellules dendritiques. Une forte corrélation positive est constatée entre comptages intra et péri-tumoraux. On note cependant que 6 lames ne présentent pas de cellules dendritiques en zone péri-tumorale, ainsi 7 lames en intratumorale. Ces lames sont pour la moitié issue du groupe 1 d'HCC, on retrouve par ailleurs une corrélation positive modérée entre le groupe d'HCC et le comptage des cellules dendritiques. Il semblerait alors que les cellules dendritiques activent la réponse immunitaire spécifique et l'immunité anti-tumorale, mais qu'elles ne soient pas seules effectrices de cette réponse, des LT étant déjà observés avant la détection des cellules dendritiques interstitielles par le marquage DC-LAMP.

L'infiltration péri et intra-tumorale de la tumeur par les cellules dendritiques est corrélée positivement avec l'infiltration par les LT et LB. Cette infiltration concomitante reflète l'activation des lymphocytes par les cellules dendritiques. On peut néanmoins noter la quasiabsence de corrélation entre l'infiltration des macrophages CD204⁺ et celle des cellules DC-LAMP⁺, bien que certaines de ces cellules soient assimilées à des macrophages. Ces cellules de l'immunité innée ne nécessitent pas d'activation secondaire à la présentation d'un antigène pour exercer leur action anti-tumorale, rôle que remplissent les cellules dendritiques conventionnelles.

L'évaluation des cellules dendritiques interstitielles au sein de l'HCC ne présente pas de résultats bibliographiques équivalents. Kippar *et al.* ou encore Moore *et al.* rapportent la présence de cellules à la morphologie compatible avec des cellules dendritiques interstitielles, exprimant les molécules du CMH II et la protéine Thy-1 à leur surface. C'est également le cas de Pires *et al.*, néanmoins les cellules dendritiques interstitielles ne sont pas les seules cellules CMH II⁺ au sein de l'infiltrat, cette évaluation n'est donc pas spécifique. Pour autant, le rôle prépondérant des cellules dendritiques interstitielles dans l'activation de la réponse antitumorale est largement évoqué dans la littérature (Moore et al. 1996; Kipar et al. 1998; Pires, Rodrigues, et al. 2013). La présence de LT CD4⁺ et CD8⁺ au sein de l'infiltrat de l'HCC indique qu'une présentation des antigènes via le CMH I et II a lieu et initie la réponse immunitaire. L'activation des LT requiert la formation d'un complexe entre les molécules du CMH II des CPA et le CD4/CD8 ainsi que la présence d'un signal de co-stimulation. Ce signal est médié par la liaison aux protéines CD28 (liguand CTLA-4) des LT, et B7 des CPA, incluant les LB, les monocytes activés par l'IFN-γ, les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans (Kipar et al. 1998). L'activation de l'immunité spécifique a lieu directement sur le site tumoral, mais

principalement au sein du NL loco-régional, après captation et migration des cellules dendritiques interstitielles. Les cellules dendritiques folliculaires résidentes et les LT CD4⁺ costimulateurs y amplifient alors la réponse anti-tumorale (Tizard 2018). Le rôle des cellules dendritiques dans l'immunité anti-tumoral est avéré, elles contribuent non seulement à l'activation de l'activité cytotoxique des LT, mais également au recrutement des macrophages et des NK (Kim et al. 2007; Zitvogel et al. 2008; Tran Janco et al. 2015).

La présence des cellules dendritiques est donc essentielle dans l'activation de l'immunité antitumorale, néanmoins elles ne semblent pas être les seules CPA majoritaires étant donné la présence de LT avant leur détection. L'observation d'une élévation de l'expression membranaire des molécules du CMH II par les cellules tumorales, couplée à l'acquisition de leur mobilité par perte de la E-cadhérine correspond à un phénotype proche de celui des CPA matures. Cette constatation appuie une hypothèse solide dans laquelle les cellules tumorales de l'HCC amplifieraient elle-même la réponse cytotoxique à leur encontre (Moore et al. 1996; Kipar et al. 1998; Baines et al. 2008; Pires, Rodrigues, et al. 2013; Paździor-Czapula et al. 2015).

6. CD206

Marquage initialement réalisé dans un but d'identification des macrophages M2 protumoraux, les TAM et les cellules tumorales se sont révélés être positifs au marquage CD206. Cependant, la distinction entre macrophages M1 et M2 n'a pas été possible, étant donné de la positivité de la grande majorité des cellules tumorales au CD206. Un système de notation qualitatif évaluant la progressivité du marquage des cellules tumorales des marges vers le centre puis la surface de la tumeur a été mis en place, basé sur une hypothèse de maturation et activation progressive des cellules tumorales. En effet, un marquage CD206⁺ a été rapporté chez les cellules dendritiques dermiques canines dans un contexte inflammatoire d'atopie cutanée (Ricklin et al. 2010). Dans notre étude, le marquage semble progresser de la périphérie vers le centre et la surface de la tumeur. On retrouve des cellules tumorales positives dans quasiment 75% des cas, la moitié des cas négatifs correspondent à des HCC du groupe 1, le groupe d'HCC est par ailleurs corrélé positivement et modérément avec le score du CD206. L'infiltrat lymphocytaire est donc concomitant de l'expression du CD206 par les cellules tumorales, et pourrait correspondre à l'acquisition d'un phénotype mature de ces dernières. Cette acquisition serait accompagnée d'autres modifications phénotypiques (expression membranaire du CMH II par exemple) menant à une phase active de régression tumorale (Pires, Rodrigues, et al. 2013).

Il s'agit de la première tentative de ségrégation décrite des macrophages intra-tumoraux de l'HCC et de la première description de cellules de Langerhans tumorales canines présentant une positivité au marquage CD206. Il a été démontré qu'il existait une surexpression du CD206 par les cellules dendritiques dermiques canines en cas de contexte inflammatoire fort (Ricklin et al. 2010). L'expression du CD206 pourrait être proportionnelle à l'état inflammatoire mis en place au fur et à mesure de la régression tumorale par les cellules de l'immunité innée et acquise, en accord avec nos observations. On peut ajouter que l'expression du CD206 chez les

cellules de Langerhans tumorales semble dépendre des signaux présents dans le microenvironnement tumoral, et être associé à leur processus de maturation (Rőszer 2015).

La présence des M2 au sein de l'infiltrat immunitaire n'a pas pu être évaluée mais a été notée de manière qualitative. Leur présence est surprenante dans un contexte anti-tumoral fort (Mantovani et al. 2002). En effet, l'expression du CD206 est renforcée chez les macrophages M2 en présence d'un profil de cytokines pro-tumorales (M-CSF, IL-4, IL-6) et déprimée par les sécrétions de TNF- α et d'IFN- γ , cytokines anti-tumorales (Porcheray et al. 2005; Rőszer 2015). C'est ce dernier contexte inflammatoire qui est retrouvé dans le cadre de l'HCC (Kaim et al. 2006). Néanmoins, un faible contingent de TAM M2 est parfois retrouvé même au sein d'un microenvironnement inflammatoire anti-tumoral, le changement phénotypique étant rapporté de manière progressive (Gordon et al. 2010). L'obtention quantitative d'un ratio entre macrophages M1 et M2 permettrait d'objectiver clairement l'orientation phénotypique du pool de TAM présents (Monteiro et al. 2018).

7. FoxP3

Les LT TReg sont retrouvés dans notre étude dans plus de 85% des cas, et l'absence de LT TReg ne ressort pas dans un groupe d'HCC particulier. On ne note aucune corrélation entre la présence de LT TReg, en intra comme en péri-tumoral, avec le groupe d'HCC. Par ailleurs, la différence entre les moyennes des comptages intra et péri-tumoraux est extrêmement non significative (p-value= 0.92), ce qui suggère une absence de spatialité particulière de l'infiltration de la part des LT TReg au sein de l'HCC. Ce paramètre est associé à une répartition aléatoire et diffuse des cellules au sein de la tumeur, parfois regroupées avec les foyers lymphocytaires en péri-tumoral. Cette population de cellules immunitaires semble donc peu évoluer au cours du développement et de la régression tumorale. L'absence quasi-totale de corrélations entre le marquage FoxP3 et celui des autres immunomarquages renforce notre constat d'une présence non évolutive des LT TReg au sein de l'HCC, présence qui semble varier indépendamment vis-à-vis de l'infiltration des autres cellules immunitaires. La corrélation positive modérée entre FoxP3 intra-tumoral et le marquage DC-LAMP péri-tumoral observée (p-value= 0.0076) pourrait correspondre à un cross-talk entre cellules dendritiques et LT TReg, néanmoins son interprétation est difficile compte tenu de l'absence d'autres corrélations positives entre cellules DC-LAMP intra/péri-tumoral et FoxP3 intra/péri-tumoral.

La détection spécifique des LT CD4⁺ TReg au sein de l'HCC n'avait jusqu'à ici pas été décrite dans la littérature. Ces cellules sont connues pour leurs propriétés immunomodulatrices, en réduisant principalement l'activité cytotoxique des LT CD8⁺, des NK et inhibant la prolifération des cellules anti-tumorales (Grivennikov et al. 2010; Shklovskaya et al. 2011). La présence de LT TReg constitue un facteur pronostic négatif en médecine humaine et vétérinaire comme démontré récemment par Sakai *et al.* dans le cas de certaines tumeurs solides canines (O'Neill et al. 2009; Sakai et al. 2018). Cette étude met en avant l'importance de la densité et de la distribution de l'infiltrat dans la détermination du pronostic. En cas de densité de LT TReg élevée en région intra-tumorale, la médiane de survie s'en trouve grandement réduite ; c'est le cas des mélanomes, des carcinomes épidermoïdes et pulmonaires. En revanche, les tumeurs qui comportent une différence non significative entre la densité de l'infiltrat de TReg intra et péri-tumoraux ne sont pas associées à une médiane de survie réduite pour l'animal (Sakai et al. 2018). Ces observations suggèrent que les LT TReg ont une action pro-tumorale importante uniquement lors de l'infiltration du centre de la tumeur, et en grand nombre. Pour faire le parallèle avec nos résultats, la différence observée entre les comptages intra et péritumoraux était non significative et qualitativement quasi-absente. Malgré une phase d'expansion rapide, l'action immunomodulatrice des LT TReg semble donc très limitée malgré leur présence aux différents stades de développement et de régression de l'HCC. La régression de l'HCC n'est donc pas secondaire à la régression d'un microenvironnement pro-tumoral, même si une limitation de l'activité des LT TReg par les cellules de Langerhans est rapportée par Senechal *et al.* lors de processus inflammatoire cutané (Seneschal et al. 2012).

V. Etude critique

A. Analyse du matériel et de la méthode

1. Sélection des cas

Parmi les 32 cas sélectionnés au sein de l'étude, un seul ne présentait pas de cellules tumorales Iba-1⁺, qui avait été établi comme étant le critère d'inclusion dans notre travail et prouvait l'origine histiocytaire des cellules tumorales. Pourtant, la morphologie des cellules prolifératives était compatible avec des cellules de Langerhans tumorales ; la masse issue du pavillon externe d'un chien Bouledogue français de 11 ans et demi. Le comptage mitotique y était élevé (39), et on ne constatait pas d'ulcération superficielle, d'infiltrats intraépidermiques ou encore de zones de nécrose. Les immunomarquages CD3 ϵ et Pax-5 réalisés montraient une absence de LT et LB au sein de la masse, avec néanmoins quelques cellules CD204⁺. Les autres immunomarquages n'ont pas été réalisés. Nous sommes conscients que certaines origines cellulaires ne sont pas écartables après réalisation de ces marquages (mélanome amélanotique, mastocytome peu différencié, carcinome neuroendocrinien), néanmoins la morphologie des cellules tumorales penchent pour nous très en faveur d'un HCC, en dépit de l'Iba-1⁻. Il pourrait s'agir d'un HCC dans sa phase très précoce de développement, et l'absence totale d'infiltration par les LT et LB va dans le sens de cette hypothèse. La non-expression de la protéine Iba-1 chez les cellules immatures de la microglie a été rapportée chez l'Homme lors d'absence de contexte inflammatoire (Raibon et al. 2009). Il se pourrait que les précurseurs des cellules dendritiques dermiques CD14⁺ dont dérivent les cellules tumorales de l'HCC n'expriment ce marqueur qu'en cas d'activation. Or l'absence totale d'infiltrat lymphocytaire observée chez ce cas Iba-1⁻ pourrait correspondre à un environnement non-inflammatoire n'entrainant pas d'activation des cellules tumorales.

La précision très incomplète du site d'exérèse et d'autres informations telles que la possible multiplicité des masses auraient pu compléter notre étude. Dans l'étude Moore *et al.*, les masses décrites comme des HCC multiples (histiocytoses cutanées langerhansiennes canines) représentent 7 cas sur 23 HCC (Moore et al. 1996). En revanche, cette prévalence est quasi nulle au sein des autres études concernant l'HCC, et les études de grande ampleur rapportent une prévalence de moins de 1% (Goldschmidt et al. 1992; Kipar et al. 1998; Baines et al. 2008; Puff et al. 2013). L'absence de cette donnée a pu nous conduire à considérer des masses issues d'histiocytoses cutanées langerhansiennes canines comme des HCC uniques, néanmoins dans une très faible proportion (Moore 2014; Faller et al. 2016).

La présence d'une lymphadénopathie du nœud lymphatique drainant la zone cutanée associée à la tumeur n'était également pas renseignée, tout comme l'état général de l'animal au moment de l'exérèse. Ces paramètres auraient pu être associés à un processus métastatique de la part des cellules tumorales de l'HCC, ou encore d'une maturation et migration physiologique des cellules de Langerhans tumorales et des cellules dendritiques associées à l'infiltrat immunitaire tumoral vers le NL locorégional. Il aurait été intéressant de corréler ce paramètre avec la composition de l'infiltrat immunitaire tumoral ainsi qu'au stade tumoral. L'étude de Moore *et al.* rapporte un taux de lymphadénopathie associée d'un cas sur 16 pour les tumeurs uniques et de 3 cas sur 7 pour les tumeurs multiples (Moore et al. 1996). La prévalence des lymphadénopathies associées à l'HCC est quasi nulle dans le reste des études (Kipar et al. 1998; Baines et al. 2008; Puff et al. 2013). Les lymphadénopathies éventuelles sont de plus peu investiguées et les NL rarement ponctionnés face au diagnostic d'HCC bénin, sous évaluant surement ce paramètre (Faller et al. 2016). Une activation transitoire de la réponse spécifique au sein des NL locorégionaux par les cellules tumorales matures n'est donc pas à exclure.

Notre étude ne comporte également pas d'informations sur le suivi global des cas a posteriori. Il aurait été intéressant de connaître le pourcentage de récidive des HCC retirés, ainsi que de réaliser une éventuelle médiane de survie post exérèse malgré le caractère le plus souvent auto-résolutif et bénin de ce type de tumeur. Les récidives sont rarement rapportées par les études actuelles, et en cas de présence de métastases au sein du NL locorégional la médiane de survie associée est excellente, des mécanismes de régression tumorale similaires à ceux observés au niveau de la tumeur cutanée semblent rentrer en jeu (Taylor et al. 1969; Goldschmidt et al. 1992; Faller et al. 2016).

2. Réalisation des marquages immunohistochimiques

a. Choix des anticorps primaires employés

La caractérisation des cellules de l'infiltrat nous imposait d'utiliser des anticorps spécifiques des protéines des cellules immunitaires canines. Ces marquages devaient être réalisables sur des tissus préalablement fixés au formol et conservés paraffinés sous forme de blocs. La fixation des tissus a limité nos possibilités d'étude du microenvironnement immunitaire.

La protéine Iba-1 est de localisation cytoplasmique à membranaire, associée au calcium et aux molécules d'actine, jouant un rôle crucial dans le fonctionnement du cytosquelette et dans l'initiation de la phagocytose. On la retrouve chez toutes les cellules de la lignée monocytaire et macrophagique ainsi que chez les cellules dendritiques du chien (Pierezan et al. 2014). L'utilisation de ce marquage nous permet de confirmer la nature histiocytaire des cellules tumorales, sur des tissus préalablement fixés. Cependant l'expression de l'Iba-1 chez les précurseurs dermiques dont dérivent les cellules tumorales de l'HCC n'est pas connue. Il se pourrait que les cellules tumorales, avant leur activation secondaire à des stimuli inflammatoires, n'expriment pas cette protéine, d'où le probable cas d'HCC Iba-1⁻ écarté de notre étude (Raibon et al. 2009).

La glycoprotéine transmembranaire DC-LAMP (CD208) est associée aux lysosomes des cellules dendritiques matures chez l'Homme, sa localisation est cytoplasmique et granulaire (de Saint-Vis et al. 1998; Salaun et al. 2004). Cependant, ce marqueur est peu décrit chez le chien (Thongtharb et al. 2016). De plus, les populations de cellules dendritiques sont très hétérogènes et présentent une large diversité de fonctions, localisations et de phénotypes différents, avec de surcroit une variabilité intra et interspécifique démontrées (Alcántara-Hernández et al. 2017). Les bovins présentent par exemple des cellules DC-LAMP⁺ compatibles avec une population macrophagique (macrophages à corps tingibles), qui pourrait être compatible avec les macrophages DC-LAMP⁺ de notre étude (Romero-Palomo et al. 2013). La détection des cellules dendritiques interstitielles dans nos travaux a pu donc manquer de sensibilité et de spécificité.

La protéine CD204 est associée aux « scavengers receptors » de classe A des monocytes et macrophages, impliqués dans la reconnaissance, l'adhésion et la phagocytose des éléments étrangers. Le marquage CD204 est de localisation cytoplasmique et certaines études penchent en faveur d'une expression plus marquée du CD204 chez les TAM M2 du chien (Kato et al. 2013; Seung et al. 2018). Cette considération est discutable dans notre étude. Tout d'abord, l'infiltration des macrophages CD204⁺ est clairement associée à une régression tumorale, ce qui ne penche pas en faveur d'un phénotype pro-tumoral de la part de ces macrophages infiltrants. De plus, le changement phénotypique entre TAM M1 et M2 semble être progressif et nécessite la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire chronique, ce qui n'est pas le cas de l'HCC (Chanmee et al. 2014). Par ailleurs, les travaux de Kaim *et al.* montrent au sein de l'HCC un microenvironnement riche en cytokines et molécules anti-tumorales (IFN- γ , iNOS) activant et produites en partie par des TAM M1 anti-tumoraux (Kaim et al. 2006).

CD206, également désigné par MRC1 (C-type Mannose Receptor 1), est un marqueur des macrophages M2 récemment mis en avant à la suite de test in vitro chez le chien (Heinrich et al. 2017). Cette glycoprotéine transmembranaire est impliquée dans la reconnaissance et la liaison aux autres glycoprotéines membranaires, initiant l'étape d'internalisation de la phagocytose. Son expression est membranaire à cytoplasmique (Rőszer 2015). L'utilisation de ce marqueur in vivo pour la ségrégation des TAM M2 est confortée par l'étude de Monteiro *et al.*, qui montre une prédominance des TAM CD206⁺ chez les adénocarcinomes mammaires canins plutôt que chez les adénomes mammaires, traduisant un environnement pro-tumoral propre aux M2 de sombre pronostic (Monteiro et al. 2018). Cependant, la positivité

inattendue des cellules tumorales au marquage CD206 nous a empêchés d'évaluer l'infiltration tumorale par les M2.

b. Réalisation des contrôles positifs et négatifs

La réalisation des différents contrôles immunohistochimiques nous a permis de confirmer la spécificité des anticorps utilisés pour détecter les antigènes des cellules immunitaires canines considérés ainsi que la spécificité et sensibilité de la technique de détection et d'amplification employée (système avidine-biotine-peroxydase dans notre étude).

Les témoins positifs permettent d'attester de la spécificité de l'anticorps primaire pour l'antigène recherché, on parle également de « primary antibody control ». Pour des raisons de coûts et de logistique, ils correspondaient dans notre étude aux zones saines de l'épiderme et du derme à distance de la masse tumorale, où les cellules immunitaires recherchées étaient physiologiquement présentes, identifiables grâce à leurs caractéristiques morphologiques (Adle-Biassette et al. 2007; Burry 2011). Tous ces contrôles se sont révélés être correctement positifs, même si toutefois leur sensibilité aurait pu être augmentée sur un tissu plus riche en antigènes recherchés.

La réalisation de témoins négatifs permet de contrôler que le marquage observé après la mise en œuvre de la révélation est lié de manière spécifique à l'anticorps primaire ; ils attestent de la spécificité de la méthode de détection. On parle de « secondary antibody control ». Ils ont été effectués en remplaçant l'anticorps primaire uniquement par une solution de dilution (Emerald diluent antibody) (Adle-Biassette et al. 2007; Burry 2011). Une absence de positivité de la réaction sur chaque lame témoin négative a été constatée.

On peut néanmoins notifier au sein de notre étude l'absence de témoin d'isotype, de réaction et de coloration, permettant respectivement d'effectuer un contrôle des colorations aspécifiques liées à l'anticorps primaire, de l'absence de coloration endogène et du bon déroulement des réactions immunohistochimiques (Adle-Biassette et al. 2007; Burry 2011).

3. Critères d'évaluations histologiques

L'évaluation des critères histologiques a été effectuée sur lames colorées à l'HE, sans colorations supplémentaires.

La détermination de la présence d'ulcération et d'infiltrats intra-épidermiques repose sur des critères facilement appréciables et objectivables. Concernant l'évaluation des zones de nécrose, notre évaluation est qualitative et avait pour but d'estimer la proportion de cellules tumorales détruites. Cependant, cette estimation est peu spécifique, les zones de nécroses englobant aussi bien des débris de cellules tumorales que ceux d'autres types cellulaires. De plus, on ne peut établir de relation entre nécrose et apoptose, qui sont deux processus bien distincts.

Plus significatif que l'évaluation de la nécrose tumorale, il existe des méthodes quantitatives afin de quantifier le pourcentage de cellules tumorales en cours de mort cellulaire, telles que la méthode TUNEL développée précédemment. Cette méthode est beaucoup plus sensible en terme de détection des cellules en cours de mort cellulaire, en comptabilisant les cellules dès le début du processus, souvent non visualisable sur lame HE. La spécificité est également augmentée, la condensation du noyau pouvant être parfois associée à des phénomènes autres que la mort cellulaire tels que la mitose (Negoescu et al. 1996). Cette méthode est utilisée dans les études actuelles sur l'HCC et permet de quantifier de manière précise l'apoptose, phénomène reflétant directement la mort cellulaire tumorale. L'évaluation des zones de nécrose dans notre étude s'est avérée peu révèlatrice de la destruction tumorale, de plus ce processus est bien distinct du phénomène d'apotose (Kaim et al. 2006; Pires, Alves, et al. 2013).

Notre évaluation de la prolifération cellulaire s'est basée sur un comptage mitotique simple des cellules en cours de mitose, présentant des figures caractéristiques des phases de la division cellulaire, sur une surface standardisée de 2.37mm². Cependant cette méthode peut manquer de spécificité, les images de pycnose et de dégénérescence nucléaire pouvant être comptabilisées comme des figures de mitose et vice-versa; de plus les cellules entrées en phase de division ne présentent pas toutes ces figures de mitose. La sélection des champs présentant le plus fort nombre de mitose est également difficile à réaliser, d'autant que les champs présentent des variations en termes de nombre de cellules tumorales, qui régressent au profit des cellules immunitaires au fur et à mesure de l'infiltration. Ceci nous conduit à sous-estimer la prolifération cellulaire. D'autres techniques plus sensibles et spécifiques sont disponibles, comme l'index mitotique, qui correspond au nombre de mitoses rapportées au nombre de cellules tumorales (cependant difficile à comptabiliser dans notre étude chez les stades les plus avancés d'HCC), ou encore des immunomarquages (Ki67, PCNA) ciblant des protéines nucléaires actives lors de la phase de division cellulaire et permettant d'établir un index de prolifération (Sarli et al. 1999; Gal et al. 2005). L'utilisation du Ki67 est largement répandue dans les études ciblant l'HCC (Pires, Alves, et al. 2013).

Néanmoins, certaines études comparant différentes méthodes d'évaluation de la prolifération montrent une corrélation significative entre le comptage mitotique et le Ki67 (Sarli et al. 1999; Aziz et al. 2016). En standardisant les critères et la surface de lecture, le comptage mitotique permet donc d'appréhender la prolifération des cellules tumorales au sein de l'HCC.

4. Critères d'évaluation des immunomarquages

Les différents immunomarquages réalisés présentaient des objectifs spécifiques et différents, principalement l'évaluation de la disposition spatiale et de la densité de cellules marquées. Les distinctions de score entre périphérie et centre de la tumeur reposent sur le comportement d'infiltration des lymphocytes et des TAM, décrit lors de l'infiltration des tumeurs par ces cellules en histopathologie vétérinaire (Cockerell et al. 1979) et humaine (Ohno et al. 2003; Ohno et al. 2004; Sakai et al. 2018).

Cependant, la délimitation intra versus péritumorale présente de légères variations spatiales entre chaque lame (évaluation subjective, conformations différentes de masses tumorales), et tous les marquages évalués ne présentent pas de différence significative entre l'évaluation semi-quantitative intra et péritumorale.

Concernant l'évaluation des densités cellulaires, celle des lymphocytes T et B via les marquages CD3 ε et Pax-5 est largement répandue dans les études concernant l'HCC. La plupart des travaux complètent l'analyse qualitative de la répartition de l'infiltrat lymphocytaire en réalisant une mesure de densité de lymphocytes/mm², dont nous nous sommes affranchis à l'aide d'un système de notation semi-quantitatif (Kaim et al. 2006). Néanmoins, un dénombrement précis aurait été approprié dans le cadre de cas avec un nombre de cellules positives parfois bien au-dessus du seuil de densité cellulaire supérieur, comme dans le cas des cellules CD204⁺ par exemple.

Bien que plus pertinentes, les analyses quantitatives auraient été trop chronophages étant donné le grand nombre de cas et d'immunomarquages réalisés. De plus, le fort taux de cellules positives pour certains comptages aurait accru la pénibilité du comptage manuel. Une évaluation quantitative passant par des logiciels d'analyse d'images immunohistologiques aurait pu constituer une alternative, ces applications sont constamment utilisées en médecine humaine (Tuominen et al. 2010; Horai et al. 2017). Les systèmes de notation semi-quantitatifs mis en place semblent être un compromis intéressant entre évaluation de la densité et de la spatialité de l'infiltration, donnant une composante cinétique à la caractérisation de cette infiltration immunitaire de l'HCC.

5. Obtention et exploitation des résultats

Les lames HE et les immunomarquages ont été lus en double aveugle et les résultats mis en commun par la suite afin de limiter les éventuelles erreurs de lecture.

L'exploitation statistique des résultats s'est parfois heurtée à un effectif de cas relativement faible (n=31), le coût des immunomarquages réalisés a constitué le principal frein à la maximisation des cas de notre étude.

Concernant les tests statistiques, des corrections ont dû être appliquées afin de s'affranchir des petits effectifs et des tests non-paramétriques employés. Ces ajustements ont rendu nos analyses plus robustes mais ont diminué leur puissance statistique : les tests restent valables malgré des conditions d'applications modifiées dues aux faibles effectifs, cependant leur aptitude à détecter une différence significative est moindre.

Afin d'améliorer la puissance de nos tests statistiques, une diminution de la valeur seuil de la p-value aurait pu être envisagée. Or, certains résultats se trouvant déjà fréquemment dans des intervalles supérieurs proches de la valeur limite de 0.05 de la p-value, cela n'aurait pas été envisageable. Néanmoins, malgré des p-value> 0.05, des tendances semblent se dessiner lors de p-value < 0.15, ceci couplé à une analyse qualitative des données.

L'augmentation de la puissance statistique de notre analyse et la diminution des p-values calculées aurait donc principalement reposé sur l'agrandissement de la taille de l'effectif de notre étude.

B. Limites de l'étude

Notre étude comporte plusieurs limites, en termes de matériel et de méthode ainsi qu'au niveau de l'interprétation de nos résultats.

1. Matériel et méthode

La première limite de notre étude repose sur le mode de conservation des tissus. Les tissus conservés au sein de blocs de paraffine sont préalablement fixés dans une solution à base de formaldéhyde. La fixation au formaldéhyde entraine un masquage des antigènes tissulaires suite à une modification des épitopes par formation de liaisons méthylène entre les acides aminés des chaines protéiques. Malgré les étapes de démasquage des sites antigéniques avant réalisation des immunomarquages, ces modifications limitent le panel d'anticorps utilisables par rapport à des tissus frais congelés (Ezaki 2000; Scalia et al. 2017). Il aurait été par exemple intéressant de réaliser les immunomarquages CD4 et CD8 disponibles uniquement sur tissus frais afin de mieux qualifier la population de LT au sein de l'infiltrat. D'autres immunomarquages comme celui des intégrines via le CD11c auraient également été réalisables et auraient permis de caractériser plus spécifiquement les cellules dendritiques présentes plutôt qu'avec le marquage DC-LAMP, qui on l'a vu présente des limites en terme de sensibilité et spécificité chez le chien (Wang et al. 2007).

Ce manque de sensibilité et de spécificité des immunomarquages (en particulier ceux visant la lignée histiocytaire : Iba-1, DC-LAMP, CD204 et CD206) constitue notre seconde limite majeure (Fritschy 2008). En effet, les anticorps poly et monoclonaux utilisés pour la réalisation des immunomarquages sont majoritairement des clones murins, dont l'affinité est connue pour les antigènes humains. Une grande majorité des anticorps « croisent » pour les antigènes canins, cependant les cellules étudiées présentent parfois des variations phénotypiques majeures inter-spécifiques. De plus, certaines cellules (notamment les cellules dendritiques) montrent des variations phénotypiques en fonction de leur état d'activation (environnement inflammatoire, captation de l'antigène), là encore selon des mécanismes différents d'une espèce à l'autre. La variation d'immunogénicité des marqueurs ciblés est également à prendre en compte. Une évaluation des témoins positifs autre que par la morphologie des cellules (marquages immunohistochimiques différents, usage de la PCR) aurait pu être réalisée (Wang et al. 2007; Al-Ashmawy 2018).

Quant à nos critères d'évaluation, ils peuvent représenter une certaine limite à l'exploitation de nos résultats. L'évaluation des immunomarquages se base principalement sur des critères semi-quantitatifs, intégrant une dimension spatiale à l'évaluation de l'infiltrat. La délimitation

spatial des espaces péri et intratumoraux a pu manquer de constance que ce soit vis-à-vis des limites fixées par l'opérateur ou bien de par l'organisation de la masse tumorale, parfois irrégulière. La ségrégation morphologiques des cellules marquées (DC-LAMP⁺ notamment) aurait pu être davantage informative. Le comptage des cellules marquées n'a été effectué que sur une surface limitée (3 champs, 0.477 mm²), dans les zones présentant la densité estimée de cellules marquées la plus forte. Là encore notre étude a pu comporter des biais d'évaluation, et l'absence de réalisation d'un index mitotique peut être considérée comme limitante.

Tous ces éléments ont pu nous mener à des diminutions de spécificité et de sensibilité de l'évaluation de nos immunomarquages.

De plus, notre étude ne comporte pas de commémoratifs précis sur l'évolution des tumeurs cutanées retirées, tels que leur durée et courbe d'évolution (période d'apparition, d'exérèse ; phases de croissance et de régression). La mise en regard avec les groupes histologiques observés aurait pu permettre de définir plus précisément les stades de régression tumorale de l'HCC. Enfin, il est vrai que notre évaluation des stades de régression repose uniquement sur une analyse histologique des masses tumorales et de l'infiltrat associé. D'autres modes d'évaluation (réalisation de PCR notamment, visant les cytokines anti-tumorales par exemple) auraient pu compléter notre analyse et établir une évaluation plus fine du stade tumoral ainsi que du phénotype des cellules engagées dans la réponse anti-tumorale (Overbergh et al. 2003; Kaim et al. 2006; Elgström et al. 2017).

2. Résultats et interprétation

Le nombre de cas intégrés au sein de notre étude constitue un facteur limitant à nos analyses, d'autant plus que les cas étaient ensuite redistribués en 4 groupes, qui plus est hétérogènes. Le faible nombre de cas par groupe a parfois réduit certaines analyses alors qu'une tendance se dessinait clairement, confirmée par les données de la littérature. C'est par exemple le cas avec la comparaison des moyennes des comptages mitotiques des 4 groupes d'HCC, revenue non significative malgré une différence qualitative (p-value=0.08) dans notre étude contrairement à celle de Paździor-Czapula *et al.*, à l'effectif supérieur. L'effectif de cas réduit nous a également amené à utiliser des tests statistiques corrigés qui ont diminué la puissance statistique de nos résultats comme énoncé ci-dessus. La réalisation d'un calcul de puissance préalable aurait pu fixer le nombre de cas minimal nécessaire à intégrer dans notre étude pour obtenir une puissance satisfaisante (Greenland et al. 2016). Cependant, des limitations en termes de temps et de moyens nous étaient imposées.

Enfin, le résultat des corrélations observées doit être analysé avec prudence et parcimonie : une corrélation entre deux paramètres biologiques doit être interprétée comme une association entre ces deux paramètres à l'instant t, et non comme une relation de causalité biologique. Les coefficients de corrélation ne renseignent pas sur l'évolution d'une variable en fonction d'une autre, bien que cette idée soit largement associée à la majorité des corrélations appliquées dans le monde de la recherche actuellement. Cependant, cette analyse ponctuelle de la force (τ de Kendall dans notre étude) et de la direction (signe) de la relation linéaire entre deux variables permet déjà d'appréhender et d'extrapoler les rapports existant in vivo entre ces deux paramètres biologiques (Schober et al. 2018).

VI. Recherches complémentaires et perspectives futures

L'évaluation de l'infiltrat immunitaire au sein de l'HCC offre encore de nombreux axes d'étude, que ce soit en termes de démarche de caractérisation ou encore d'immunomarquages applicables.

Au niveau de notre étude, plusieurs pistes auraient pu faire l'objet d'amélioration et de recherches complémentaires :

- Une évaluation plus fine de l'expression du CD206 et de l'Iba-1 par les cellules tumorales accompagnée d'un dénombrement cellulaire.
- La réalisation d'immunomarquages complémentaires, visant notamment à identifier d'autres acteurs connus de l'immunité anti-tumorale, comme les NK ou les MDSC, plus difficilement caractérisables chez le chien (Michael et al. 2013). La présence d'autre cellules anti et pro-tumorales (PN neutrophiles, éosinophiles, mastocytes, plasmocytes) serait à explorer pour comprendre les interactions régnant dans le microenvironnement inflammatoire de l'HCC.
- La mise en place de l'infiltrat immunitaire s'effectue par les capillaires sanguins péritumoraux, l'évaluation de l'angiogenèse est un point que nous n'avons pas abordé et son étude permettrait de mieux comprendre la mise en place de l'infiltrat immunitaire (Dong et al. 2009; Paździor-Czapula et al. 2015)

Dans un contexte plus large d'étude de l'infiltrat de l'histiocytome canin, la démarche de caractérisation pourrait être revue et améliorée :

- Tout d'abord, cette caractérisation mériterait de s'appuyer sur des pièces d'exérèse congelées, autorisant la réalisation d'un plus large panel d'immunomarquages et donc d'une caractérisation plus fine de l'infiltrat (ségrégation LT CD4⁺/CD8⁺ et entre cellules DC-LAMP⁺ notamment).
- Ensuite, intégrer systématiquement l'exérèse et l'analyse du NL locorégional (cependant difficilement réalisable en pratique courante) serait largement informatif, et permettrait d'étudier plus clairement l'hypothèse d'une maturation et activation des cellules tumorales après migration vers ce NL (Faller et al. 2016).
- Enfin, la caractérisation réalisée dans notre étude est purement histologique et passe par le biais de l'immunohistochimie. La réalisation de PCR et de RT-PCR (« Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction ») sur extrait d'ADN et d'ARN d'échantillons

standardisés autoriserait une caractérisation différente de l'infiltrat, basée par exemple sur un profil d'expression de cytokines à un instant t de la régression tumorale (Kaim et al. 2006; Wang et al. 2007).

CONCLUSION

L'histiocytome cutané canin est une tumeur cutanée parmi les plus fréquemment rencontrées en pratique vétérinaire courante. Ce processus tumoral bénin se caractérise par une évolution rapide ainsi qu'une régression spontanée dans un intervalle de moins de 3 mois suivant son apparition.

L'objectif de cette étude était de caractériser clairement les cellules présentes au sein de l'infiltrat immunitaire ainsi que leur mise en place progressive, afin d'appréhender les mécanismes de régression tumorale présents au sein de l'HCC, encore partiellement connus.

La caractérisation de l'infiltrat immunitaire au sein de l'HCC a été permise par l'analyse histologique et immunohistochimique de tumeurs provenant de 32 chiens différents. Notre étude s'est principalement basée sur l'évaluation qualitative et semi-quantitative d'immunomarquages réalisés sur des sections d'histiocytomes paraffinés, visant les cellules de la lignée lymphoïde (CD3 ε , Pax-5, FoxP3) et de la lignée histiocytaire (Iba-1, DC-LAMP, CD204, CD206). Des paramètres histologiques tels que le comptage mitotique, la présence d'ulcération de la tumeur, d'infiltrats intraépidermiques tumoraux et de foyers de nécrose ont également été mis en regard de l'évolution de l'infiltrat immunitaire.

Nos résultats font état d'une probable activation et maturation progressive des cellules tumorales, à l'origine d'une stimulation de l'immunité anti-tumorale spécifique à leur encontre. Nos résultats ont également permis d'écarter l'hypothèse d'un développement tumoral rapide secondaire à un microenvironnement pro-tumoral. De plus, la présence de cellules clefs de l'immunité anti-tumorale – cellules dendritiques et macrophages – a été confirmée et leur infiltration confrontée au stade de régression tumoral.

Il semblerait donc que ce soit le type cellulaire dont dérivent les cellules tumorales, des cellules dendritiques immatures, qui permette une régression tumorale rapide une fois leur maturation enclenchée par les signaux du microenvironnement inflammatoire tumoral.

La poursuite des travaux visant à identifier plus finement les mécanismes et interactions dynamiques régnant entre cellules immunitaires et cellules néoplasiques au sein du microenvironnement tumoral pourrait fournir des pistes en thérapie cancéreuse humaine comme vétérinaire.

- Adle-Biassette, H. et al. 2007. Les contrôles nécessaires en immunohistochimie : de la recherche au diagnostic. *Annales de Pathologie* 27(1): p.16–26.
- Affolter, V.K., & Moore, P.F. 2000. Canine cutaneous and systemic histiocytosis: reactive histiocytosis of dermal dendritic cells. *The American Journal of Dermatopathology* 22(1): p.40–48.
- Affolter, V.K., & Moore, P.F. 2002a. Localized and Disseminated Histiocytic Sarcoma of Dendritic Cell Origin in Dogs. *Veterinary Pathology* 39(1): p.74–83.
- Affolter, V.K., & Moore, P.F. 2002b. Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. *Veterinary Pathology* 39(1): p.74–83.
- Aggarwal, B.B., Vijayalekshmi, R.V., & Sung, B. 2009. Targeting Inflammatory Pathways for Prevention and Therapy of Cancer: Short-Term Friend, Long-Term Foe. *Clinical Cancer Research* 15(2): p.425–430.
- Al-Ashmawy, G.M.Z. 2018. Dendritic Cell Subsets, Maturation and Function. In S. P. Chapoval (ed) Dendritic Cells, InTech Available at: http://www.intechopen.com/books/dendritic-cells/dendritic-cell-subsetsmaturation-and-function [Accessed June 11, 2019].
- Alcántara-Hernández, M. et al. 2017. High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. *Immunity* 47(6): p.1037–1050.e6.
- Aziz, S. et al. 2016. Evaluation of Tumor Cell Proliferation by Ki-67 Expression and Mitotic Count in Lymph Node Metastases from Breast Cancer A. Sapino (ed). *PLOS ONE* 11(3): p.e0150979.
- Baines et al. 2000. Maturation states of dendritic cells in canine cutaneous histiocytoma. *Veterinary Dermatology* 11(s1): p.1–13.
- Baines, S.J., McInnes, E.F., & McConnell, I. 2008. E-cadherin expression in canine cutaneous histiocytomas. *The Veterinary Record* 162(16): p.509–513.
- Balch, C.M. et al. 1980. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer* 45(12): p.3012–3017.
- Balkwill, F., & Mantovani, A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 357(9255): p.539–545.
- Barger, A.M., & MacNeill, A.L. eds. 2017. *Small animal cytologic diagnosis*. Boca Raton London New York: CRC Press.

- Barry, M., & Bleackley, R.C. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews Immunology* 2(6): p.401–409.
- Bellone, M., & Calcinotto, A. 2013. Ways to Enhance Lymphocyte Trafficking into Tumors and Fitness of Tumor Infiltrating Lymphocytes. *Frontiers in Oncology* 3. Available at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2013.00231/abstract [Accessed May 5, 2019].
- Bonecchi, R. et al. 2009. Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 14: p.540–551.
- Boostrom, B.O. et al. 2017. Canine Cutaneous Plasmacytosis: 21 Cases (2005-2015). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 31(4): p.1074–1080.
- Borska, P. et al. 2009. Gamma/delta T-cell lymphoma in a dog. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne* 50(4): p.411–416.
- Brigati, C., Noonan, D.M., Albini, A., & Benelli, R. 2002. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clinical & Experimental Metastasis* 19(3): p.247–258.
- Bui, J.D., & Schreiber, R.D. 2007. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Current Opinion in Immunology* 19(2): p.203–208.
- Burry, R.W. 2011. Controls for Immunocytochemistry: An Update. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59(1): p.6–12.
- Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., & Itano, N. 2014. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers* 6(3): p.1670–1690.
- Chatterjee, D. et al. 2018. CyclinD1 Is Useful to Differentiate Langerhans Cell Histiocytosis From Reactive Langerhans Cells: *The American Journal of Dermatopathology*: p.1.
- Cheville, N.F. 2009. *Ultrastructural pathology: the comparative cellular basis of disease* 2nd ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Cline, M.J. 1994. Histiocytes and histiocytosis. *Blood* 84(9): p.2840–2853.
- Cobbold, S., & Metcalfe, S. 1994. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens* 43(3): p.137–154.
- Cockerell, G.L., & Slauson, D.O. 1979. Patterns of lymphoid infiltrate in the canine cutaneous histiocytoma. *Journal of Comparative Pathology* 89(2): p.193–203.
- Colonna, M., Trinchieri, G., & Liu, Y.-J. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology* 5(12): p.1219–1226.

- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30(7): p.1073–1081.
- Coomer, A.R., & Liptak, J.M. 2008. Canine histiocytic diseases. *Compendium (Yardley, PA)* 30(4): p.202–204, 208-216; quiz 216-217.
- Corthay, A. et al. 2005. Primary Antitumor Immune Response Mediated by CD4+ T Cells. Immunity 22(3): p.371–383.
- Coussens, L.M., & Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. Nature 420(6917): p.860-867.
- Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Griffiths, C.E., & Kimber, I. 2000. Langerhans cell migration. *Clinical and Experimental Dermatology* 25(5): p.413–418.
- Danilenko, D.M., Moore, P.F., & Rossitto, P.V. 1992. Canine leukocyte cell adhesion molecules (LeuCAMs): Characterization of the CD11/CD18 family. *Tissue Antigens* 40(1): p.13–21.
- (David) Dong, Z., Aplin, A., & Nicosia, R. 2009. Regulation of Angiogenesis by Macrophages, Dendritic Cells, and Circulating Myelomonocytic Cells. *Current Pharmaceutical Design* 15(4): p.365–379.
- Delcour, N.M., Klopfleisch, R., Gruber, A.D., & Weiss, A.T.A. 2013. Canine Cutaneous Histiocytomas are Clonal Lesions as Defined by X-linked Clonality Testing. *Journal of Comparative Pathology* 149(2–3): p.192–198.
- Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., & Roitt, I.M. 2017. *Roitt's essential immunology* Thirteenth edition. Chichester, West Sussex: Wiley Blackwell.
- Do, S.H. et al. 2009. Two different types of malignant fibrous histiocytomas from pet dogs. *Journal of Veterinary Science* 10(2): p.169.
- Dobson, J.M., Lascelles, B.D.X., & British Small Animal Veterinary Association eds. 2011. *BSAVA manual of canine and feline oncology* 3rd ed. Quedgeley, Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Doré, M. 2011. Cyclooxygenase-2 Expression in Animal Cancers. *Veterinary Pathology* 48(1): p.254–265.
- Duncan, J.R., & Prasse, K.W. 1979. Cytology of Canine Cutaneous Round Cell Tumors: Mast Cell Tumor, Histiocytoma, Lymphosarcoma and Transmissible Venereal Tumor. *Veterinary Pathology* 16(6): p.673–679.
- Dunn, G.P., Old, L.J., & Schreiber, R.D. 2004. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 21(2): p.137–148.
- Elgström, E., Ohlsson, T.G., & Eriksson, S.E. 2017. Cytokine evaluation in untreated and radioimmunotherapy-treated tumors in an immunocompetent rat model. *Tumor Biology* 39(4): p.101042831769755.

- Erdman, S.E. et al. 2005. CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory Lymphocytes Induce Regression of Intestinal Tumors in *Apc*^{*Min/+*} Mice. *Cancer Research* 65(10): p.3998–4004.
- Ezaki, T. 2000. Antigen retrieval on formaldehyde-fixed paraffin sections: its potential drawbacks and optimization for double immunostaining. *Micron* 31(6): p.639–649.
- Faller, M. et al. 2016. Retrospective characterisation of solitary cutaneous histiocytoma with lymph node metastasis in eight dogs: Metastatic histiocytoma. *Journal of Small Animal Practice* 57(10): p.548–552.
- Favara, B.E. et al. 1997. Contemporary classification of histiocytic disorders. The WHO Committee On Histiocytic/Reticulum Cell Proliferations. Reclassification Working Group of the Histiocyte Society. *Medical and Pediatric Oncology* 29(3): p.157–166.
- Fayyad, A. et al. 2018. Matrix metalloproteinases expression in spontaneous canine histiocytic sarcomas and its xenograft model. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 198: p.54–64.
- Fernandez, N.J., West, K.H., Jackson, M.L., & Kidney, B.A. 2005. Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors. *Veterinary Pathology* 42(4): p.437–445.
- Fondevila, D., Ferrer, L., Ramos, J.A., Montane, V., & Ramis, A.J. 1989. Immunohistochemical localization of S-100 protein and lysozyme in canine lymph nodes and lymphomas. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe A* 36(1): p.71–77.
- Fratta, E. et al. 2011. The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. *Molecular Oncology* 5(2): p.164–182.
- Fritschy, J.-M. 2008. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *European Journal of Neuroscience* 28(12): p.2365–2370.
- Fulmer, A.K., & Mauldin, G.E. 2007. Canine histiocytic neoplasia: an overview. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne* 48(10): p.1041–1043, 1046– 1050.
- van Furth, R. et al. 1972. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization* 46(6): p.845–852.
- Gabrilovich, D.I. 2017. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunology Research* 5(1): p.3–8.
- Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews Immunology* 12(4): p.253–268.
- Gal, R. et al. 2005. An Improved Technique for Mitosis Counting. *International Journal of Surgical Pathology* 13(2): p.161–165.
- Ganguly, B., Das, U., & Das, A.K. 2016. Canine transmissible venereal tumour: a review: CTVT: a review. *Veterinary and Comparative Oncology* 14(1): p.1–12.
- Gerl, R. 2004. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis* 26(2): p.263–270.
- Glick, A.D., Holscher, M., & Campbell, G.R. 1976. Canine Cutaneous Histiocytoma: Ultrastructural and Cytochemical Observations. *Veterinary Pathology* 13(5): p.374– 380.
- Goldschmidt, M.H., & Shofer, F.S. 1992. *Skin tumors of the dog and cat* 1st ed. Oxford [England]; New York: Pergamon Press.
- Gopcsa, L. et al. 2005. Extensive flow cytometric characterization of plasmacytoid dendritic cell leukemia cells. *European Journal of Haematology* 75(4): p.346–351.
- Gordon, S., & Martinez, F.O. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32(5): p.593–604.
- Greenland, S. et al. 2016. Statistical tests, P values, confidence intervals, and power: a guide to misinterpretations. *European Journal of Epidemiology* 31(4): p.337–350.
- Greten, F.R. et al. 2004. IKKβ Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell* 118(3): p.285–296.
- Greter, M., Lelios, I., & Croxford, A.L. 2015. Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation. *Frontiers in Immunology* 6. Available at: http://www.frontiersin.org/Antigen_Presenting_Cell_Biology/10.3389/fimmu.2015.0 0249/abstract [Accessed May 5, 2019].
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., & Karin, M. 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140(6): p.883–899.
- Guvenc, T., Haligur, M., Orman, M.N., & et al. 2002. Mitosis and apoptosis in canine cutaneous histiocytoma and transmissible venereal tumour. *Acta Veterinaria Hungarica* 50(3): p.315–321.
- Halliday, G.M., Patel, A., Hunt, M.J., Tefany, F.J., & Barnetson, R.S. 1995. Spontaneous regression of human melanoma/nonmelanoma skin cancer: association with infiltrating CD4+ T cells. *World Journal of Surgery* 19(3): p.352–358.
- Hamada, I. et al. 2002. Clinical effects of tumor-associated macrophages and dendritic cells on renal cell carcinoma. *Anticancer Research* 22(6C): p.4281–4284.
- Harvey, J.W. 2001. Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals. Philadelphia, PA: Saunders.
- Hatziioannou, A., Alissafi, T., & Verginis, P. 2017. Myeloid-derived suppressor cells and T regulatory cells in tumors: unraveling the dark side of the force. *Journal of Leukocyte Biology* 102(2): p.407–421.

- Heinrich, F. et al. 2017. Morphologic, phenotypic, and transcriptomic characterization of classically and alternatively activated canine blood-derived macrophages in vitro M. A. Olszewski (ed). PLOS ONE 12(8): p.e0183572.
- Hinkle, D.E., Wiersma, W., & Jurs, S.G. 2003. *Applied statistics for the behavioral sciences* 5th ed. Boston: Houghton Mifflin.
- Holder, A. et al. 2018. Perturbation of the T cell receptor repertoire occurs with increasing age in dogs. *Developmental & Comparative Immunology* 79: p.150–157.
- Horai, Y., Kakimoto, T., Takemoto, K., & Tanaka, M. 2017. Quantitative analysis of histopathological findings using image processing software. *Journal of Toxicologic Pathology* 30(4): p.351–358.
- Hou, W.-S., & Van Parijs, L. 2004. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nature Immunology* 5(6): p.583–589.
- Hung, K. et al. 1998. The Central Role of CD4 ⁺ T Cells in the Antitumor Immune Response. *The Journal of Experimental Medicine* 188(12): p.2357–2368.
- Imai, Y., & Kohsaka, S. 2002. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: Role of Iba1. *Glia* 40(2): p.164–174.
- Inoue, S.-I., Niikura, M., Mineo, S., & Kobayashi, F. 2013. Roles of IFN-γ and γδ T Cells in Protective Immunity Against Blood-Stage Malaria. *Frontiers in Immunology* 4. Available at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00258/abstract [Accessed June 16, 2019].
- J. A. Ramos-Vara, & M. A. Miller. 2011. Immunohistochemical Expression of E-cadherin Does Not Distinguish Canine Cutaneous Histiocytoma From Other Canine Round Cell Tumors. *Veterinary Pathology* 48(3): p.758–763.
- Jacob Cohen, 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences. Second Edition*. USA: Lwarence Erlbaum Associates.
- Joiner, K.S. et al. 2010. Multicentric Cutaneous Neuroendocrine (Merkel Cell) Carcinoma in a Dog. *Veterinary Pathology* 47(6): p.1090–1094.
- Jolles, S. 2002. Paul Langerhans. *Journal of Clinical Pathology* 55(4): p.243.
- Joyce, J.A., & Pollard, J.W. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer* 9(4): p.239–252.
- Kaim, U., Moritz, A., Failing, K., & Baumgärtner, W. 2006. The regression of a canine Langerhans cell tumour is associated with increased expression of IL-2, TNF-α, IFN-γ and iNOS mRNA. *Immunology* 118(4): p.472–482.
- Kamath, A.T., Henri, S., Battye, F., Tough, D.F., & Shortman, K. 2002. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100(5): p.1734–1741.

- Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I.L., & Manz, M.G. 2003. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 198(2): p.305– 313.
- Kato, Y. et al. 2013. The Class A Macrophage Scavenger Receptor CD204 is a Useful Immunohistochemical Marker of Canine Histiocytic Sarcoma. *Journal of Comparative Pathology* 148(2–3): p.188–196.
- Kelley, J.L., Ozment, T.R., Li, C., Schweitzer, J.B., & Williams, D.L. 2014. Scavenger receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease. *Critical Reviews in Immunology* 34(3): p.241–261.
- Kerlin, R.L., & Hendrick, M.J. 1996. Malignant Fibrous Histiocytoma and Malignant Histiocytosis in the Dog—Convergent or Divergent Phenotypic Differentiation? *Veterinary Pathology* 33(6): p.713–716.
- Kerr, J.F., Winterford, C.M., & Harmon, B.V. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73(8): p.2013–2026.
- Khazaie, K. et al. 2011. The significant role of mast cells in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 30(1): p.45–60.
- Khuder, S.A., Herial, N.A., Mutgi, A.B., & Federman, D.J. 2005. Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Use and Lung Cancer. *Chest* 127(3): p.748–754.
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121(1): p.1–14.
- Kipar, A., Baumgärtner, W., Kremmer, E., Frese, K., & Weiss, E. 1998. Expression of major histocompatibility complex class II antigen in neoplastic cells of canine cutaneous histiocytoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 62(1): p.1–13.
- Kohrt, H.E. et al. 2005. Profile of Immune Cells in Axillary Lymph Nodes Predicts Disease-Free Survival in Breast Cancer A. Houghton (ed). *PLoS Medicine* 2(9): p.e284.
- Kraus, S., & Arber, N. 2009. Inflammation and colorectal cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 9(4): p.405–410.
- Larregina, A.T. et al. 2001. Dermal-resident CD14+ cells differentiate into Langerhans cells. *Nature Immunology* 2(12): p.1151–1158.
- Leek, R.D. et al. 1996. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Research* 56(20): p.4625–4629.
- Leppert, D., Waubant, E., Galardy, R., Bunnett, N.W., & Hauser, S.L. 1995. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *Journal of Immunology* (*Baltimore, Md.: 1950*) 154(9): p.4379–4389.

- Lewis, C.E., & Pollard, J.W. 2006. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Research* 66(2): p.605–612.
- Looringh van Beeck, F.A. et al. 2008. Two canine CD1a proteins are differentially expressed in skin. *Immunogenetics* 60(6): p.315–324.
- Ludwig Aschoff. 1924. Lectures on Pathology. In New York
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 23(11): p.549–555.
- Marchal et al. 1993. CD18 Birbeck granule-containing dendritic cells present in dog epidermis are equivalent of human epidermal Langerhans cells. *European Journal of Dermatology*: p.149–152.
- Marchal, T. 1994. Evidence that Langerhans cells migrate to regional lymph nodes during experimental contact sensitization in dogs.
- Marchal, T., Dezutter-Dambuyant, C., Fournel, C., Magnol, J.P., & Schmitt, D. 1995. Immunophenotypic and ultrastructural evidence of the langerhans cell origin of the canine cutaneous histiocytoma. *Acta Anatomica* 153(3): p.189–202.
- Marchal, T., Saint-André, I., Magnol, J.P., Dezutter-Dambuyant, C., & Schmitt, D. 1995. [Dendritic cells in dogs and cats: models of study in human pathology]. *Pathologie-Biologie* 43(10): p.910–920.
- Markiewski, M.M. et al. 2008. Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nature Immunology* 9(11): p.1225–1235.
- Marlin, S.D., & Rothlein, R. 1998. Intercellular Adhesion Molecules: ICAM-1, ICAM-2 And ICAM-3. In *Encyclopedia of Immunology*, 1409–1412. Elsevier Available at: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122267656003674 [Accessed May 1, 2019].
- Martin De Las Mulas, J. et al. 1999. Apoptosis and mitosis in tumours of the skin and subcutaneous tissues of the dog. *Research in Veterinary Science* 66(2): p.139–146.
- Masten, B.J. et al. 2006. Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177(11): p.7784–7793.
- Maxie, M.G. ed. 2016. *Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals* Sixth edition. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- McSweeney, P.A. et al. 1998. Characterization of monoclonal antibodies that recognize canine CD34. *Blood* 91(6): p.1977–1986.
- Medleau, L., & Hnilica, K.A. 2006. *Small animal dermatology: a color atlas and therapeutic guide* 2nd ed. St. Louis, Mo: Saunders Elsevier.

- Meuten, D.J. ed. 2002. *Tumors in domestic animals* 4th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press.
- Meuten, D.J., Moore, F.M., & George, J.W. 2016. Mitotic Count and the Field of View Area: Time to Standardize. *Veterinary Pathology* 53(1): p.7–9.
- Michael, H.T. et al. 2013. Isolation and characterization of canine natural killer cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 155(3): p.211–217.
- Mielcarek, M., Kucera, K.A., Nash, R., Torok-Storb, B., & McKenna, H.J. 2007. Identification and Characterization of Canine Dendritic Cells Generated In Vivo. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 13(11): p.1286–1293.
- Miller, W.H., Griffin, C.E., Campbell, K.L., Muller, G.H., & Scott, D.W. 2013. *Muller & Kirk's small animal dermatology* 7th ed. St. Louis, Mo: Elsevier.
- Ming K Heng et al. 2000. Antigen Recognition by $\gamma\delta$ T-Cells, Madame Curie Bioscience Database.
- Monteiro, L.N., Rodrigues, M.A., Gomes, D.A., Salgado, B.S., & Cassali, G.D. 2018. Tumourassociated macrophages: Relation with progression and invasiveness, and assessment of M1/M2 macrophages in canine mammary tumours. *The Veterinary Journal* 234: p.119–125.
- Moore, P.F. 2014. A Review of Histiocytic Diseases of Dogs and Cats. *Veterinary Pathology* 51(1): p.167–184.
- Moore, P.F., Schrenzel, M.D., Affolter, V.K., Olivry, T., & Naydan, D. 1996. Canine cutaneous histiocytoma is an epidermotropic Langerhans cell histiocytosis that expresses CD1 and specific beta 2-integrin molecules. *The American Journal of Pathology* 148(5): p.1699–1708.
- Morrison, W.B. 2002. *Cancer in dogs and cats: medical and surgical management* 2. ed. Jackson, Wyo: Teton NewMedia.
- Murphy, K.M., & Weaver, C. 2017. *Janeway's immunobiology* 9th edition. New York London: GS, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Nagata, M., Hirata, M., Ishida, T., Hirata, S., & Nanko, H. 2000. Progressive Langerhans' cell histiocytosis in a puppy. *Veterinary Dermatology* 11(4): p.241–246.
- Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R., & Fibbe, W.E. 2006. Mesenchymal Stem Cells Inhibit Generation and Function of Both CD34+-Derived and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 177(4): p.2080–2087.
- Negoescu, A. et al. 1996. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 44(9): p.959–968.
- Nishiya, A.T. et al. 2016. Comparative Aspects of Canine Melanoma. Veterinary Sciences 3(1).

- Noy, R., & Pollard, J.W. 2014. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* 41(1): p.49–61.
- Ogilvie, G.K., Moore, A.S., & Le Sueur-Almosni, F. 1997. *Manuel pratique de cancérologie vétérinaire*. Paris; Milan; Barcelone; Maisons-Alfort: Masson; Editions du point vétérinaire.
- Ohnishi, K. et al. 2011. Suppression of TLR4-mediated inflammatory response by macrophage class A scavenger receptor (CD204). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411(3): p.516–522.
- Ohno, S. et al. 2003. The degree of macrophage infiltration into the cancer cell nest is a significant predictor of survival in gastric cancer patients. *Anticancer Research* 23(6D): p.5015–5022.
- Ohno, S. et al. 2004. Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer. *Anticancer Research* 24(5C): p.3335–3342.
- Ohno, S., Inagawa, H., Soma, G.-I., & Nagasue, N. 2002. Role of tumor-associated macrophage in malignant tumors: should the location of the infiltrated macrophages be taken into account during evaluation? *Anticancer Research* 22(6C): p.4269–4275.
- O'Keeffe, M. et al. 2002. Mouse Plasmacytoid Cells: Long-lived Cells, Heterogeneous in Surface Phenotype and Function, that Differentiate Into CD8 ⁺ Dendritic Cells Only after Microbial Stimulus. *The Journal of Experimental Medicine* 196(10): p.1307–1319.
- O'Neill, K., Guth, A., Biller, B., Elmslie, R., & Dow, S. 2009. Changes in Regulatory T Cells in Dogs with Cancer and Associations with Tumor Type. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23(4): p.875–881.
- Overbergh, L. et al. 2003. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *Journal of biomolecular techniques: JBT* 14(1): p.33–43.
- Owen, J.A., Punt, J., & Stranford, S. 2014. *Immunologie: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*. Available at: http://sbiproxy.uqac.ca/login?url=http://international.scholarvox.com/book/888207 54 [Accessed November 28, 2018].
- Park, M.-S. et al. 2006. Disseminated Transmissible Venereal Tumor in a Dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18(1): p.130–133.
- Paul, W.E. ed. 2013. *Fundamental immunology* 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Paździor-Czapula, K., Rotkiewicz, T., Otrocka-Domagała, I., Gesek, M., & Śmiech, A. 2015. Morphology and immunophenotype of canine cutaneous histiocytic tumours with particular emphasis on diagnostic application. *Veterinary Research Communications* 39(1): p.7–17.

- Petersen, B.L., Rengtved, P., Bank, M.I., & Carstensen, H. 2003. High expression of markers of apoptosis in Langerhans cell histiocytosis. *Histopathology* 42(2): p.186–193.
- Pierezan, F., Mansell, J., Ambrus, A., & Hoffmann, A.R. 2014. Immunohistochemical Expression of Ionized Calcium Binding Adapter Molecule 1 in Cutaneous Histiocytic Proliferative, Neoplastic and Inflammatory Disorders of Dogs and Cats. *Journal of Comparative Pathology* 151(4): p.347–351.
- Pires, I., Rodrigues, P., et al. 2013. Immunohistochemical and immunoelectron study of major histocompatibility complex class-II antigen in canine cutaneous histiocytoma: its relation to tumor regression. *In Vivo (Athens, Greece)* 27(2): p.257–262.
- Pires, I., Alves, A., Queiroga, F.L., Silva, F., & Lopes, C. 2013. Regression of canine cutaneous histiocytoma: reduced proliferation or increased apoptosis? *Anticancer Research* 33(4): p.1397–1400.
- Pires, I., Queiroga, F.L., Alves, A., Silva, F., & Lopes, C. 2009. Decrease of E-Cadherin Expression in Canine Cutaneous Histiocytoma Appears to be Related to its Spontaneous Regression. *Anticancer Research* 29(7): p.2713–2717.
- Porcheray, F. et al. 2005. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clinical and Experimental Immunology* 0(0): p.051006055454001.
- Puff, C., Risha, E., & Baumgärtner, W. 2013. Regression of Canine Cutaneous Histiocytoma is Associated with an Orchestrated Expression of Matrix Metalloproteinases. *Journal of Comparative Pathology* 149(2–3): p.208–215.
- Raibon, E., & Möller, T. 2009. Microglia Identification Methods. In Encyclopedia of Neuroscience, 849–852. Elsevier Available at: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080450469017526 [Accessed June 1, 2019].
- Rakoff-Nahoum, S. 2006. Why cancer and inflammation? *The Yale Journal of Biology and Medicine* 79(3–4): p.123–130.
- Ramos-Vara, J.A., Miller, M.A., & Valli, V.E.O. 2007. Immunohistochemical Detection of Multiple Myeloma 1/Interferon Regulatory Factor 4 (MUM1/IRF-4) in Canine Plasmacytoma: Comparison with CD79a and CD20. *Veterinary Pathology* 44(6): p.875– 884.
- Raskin, R., & Meyer, D.J. 2016. Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide.
- Ressel, L. 2018. Normal cell morphology in canine and feline cytology: an identification guide. Available http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlab k&AN=1548186 [Accessed December 3, 2018].

- Ricklin, M.E., Roosje, P., & Summerfield, A. 2010. Characterization of Canine Dendritic Cells in Healthy, Atopic, and Non-allergic Inflamed Skin. *Journal of Clinical Immunology* 30(6): p.845–854.
- Rios de la Rosa, J.M., Tirella, A., Gennari, A., Stratford, I.J., & Tirelli, N. 2017. The CD44-Mediated Uptake of Hyaluronic Acid-Based Carriers in Macrophages. *Advanced Healthcare Materials* 6(4): p.1601012.
- Romani, N., Clausen, B.E., & Stoitzner, P. 2010. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunological Reviews* 234(1): p.120–141.
- Romero-Palomo, F. et al. 2013. Immunohistochemical Detection of Dendritic Cell Markers in Cattle. *Veterinary Pathology* 50(6): p.1099–1108.
- Rőszer, T. 2015. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation* 2015: p.1–16.
- de Saint-Vis, B. et al. 1998. A Novel Lysosome-Associated Membrane Glycoprotein, DC-LAMP, Induced upon DC Maturation, Is Transiently Expressed in MHC Class II Compartment. *Immunity* 9(3): p.325–336.
- Sakai, K. et al. 2018. Association of tumour-infiltrating regulatory T cells with adverse outcomes in dogs with malignant tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 16(3): p.330–336.
- Salaun, B. et al. 2004. CD208/Dendritic Cell-Lysosomal Associated Membrane Protein Is a Marker of Normal and Transformed Type II Pneumocytes. *The American Journal of Pathology* 164(3): p.861–871.
- Sarli, G. et al. 1999. Evaluating Mitotic Activity in Canine and Feline Solid Tumors: Standardizing the Parameter. *Biotechnic & Histochemistry* 74(2): p.64–76.
- Sarvaria, A., Madrigal, J.A., & Saudemont, A. 2017. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cellular & Molecular Immunology* 14(8): p.662–674.
- Scalia, C.R. et al. 2017. Antigen Masking During Fixation and Embedding, Dissected. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 65(1): p.5–20.
- Schober, P., Boer, C., & Schwarte, L.A. 2018. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesthesia & Analgesia* 126(5): p.1763–1768.
- Seiller, C., & Dubois, B. 2017. Rôle protumoral des lymphocytes B dans le cancer du pancréas: Vers de nouvelles pistes thérapeutiques ? *médecine/sciences* 33(10): p.859–862.
- Seneschal, J., Clark, R.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C.M., & Kupper, T.S. 2012. Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells. *Immunity* 36(5): p.873–884.
- Seré, K. et al. 2012. Two Distinct Types of Langerhans Cells Populate the Skin during Steady State and Inflammation. *Immunity* 37(5): p.905–916.

- Seung, B.-J. et al. 2018. CD204-Expressing Tumor-Associated Macrophages Are Associated With Malignant, High-Grade, and Hormone Receptor–Negative Canine Mammary Gland Tumors. *Veterinary Pathology* 55(3): p.417–424.
- Shankaran, V. et al. 2001. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410(6832): p.1107–1111.
- Shklovskaya, E. et al. 2011. Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(44): p.18049–18054.
- Shortman, K., & Caux, C. 1997. Dendritic Cell Development: Multiple Pathways to Nature's Adjuvants. *Stem Cells* 15(6): p.409–419.
- Shortman, K., & Naik, S.H. 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Reviews Immunology* 7(1): p.19–30.
- Sica, A. et al. 2008. Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in Cancer Biology* 18(5): p.349–355.
- Simko, S.J. et al. 2014. Differentiating Skin-Limited and Multisystem Langerhans Cell Histiocytosis. *The Journal of Pediatrics* 165(5): p.990–996.
- Soini, Y., Pääkkö, P., & Lehto, V.-P. 1998. Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer. *The American Journal of Pathology* 153(4): p.1041–1053.
- Spel, L., Boelens, J.-J., Nierkens, S., & Boes, M. 2013. Antitumor immune responses mediated by dendritic cells: How signals derived from dying cancer cells drive antigen crosspresentation. *Oncolmmunology* 2(11): p.e26403.
- Steinman, R.M., & Cohn, Z.A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of Experimental Medicine* 137(5): p.1142–1162.
- Stoitzner, P., Stössel, H., Romani, N., & Pfaller, K. 2002. A Close-Up View of Migrating Langerhans Cells in the Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 118(1): p.117–125.
- Strumane, K., Berx, G., & Van Roy, F. 2004. Cadherins in Cancer. In J. Behrens & W. J. Nelson (eds) *Cell Adhesion*, 69–103. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-68170-0_4 [Accessed December 17, 2018].
- Swann, J.B., & Smyth, M.J. 2007. Immune surveillance of tumors. *Journal of Clinical Investigation* 117(5): p.1137–1146.
- Szabolcs, P., Ciocon, D.H., Moore, M.A., & Young, J.W. 1997. Growth and differentiation of human dendritic cells from CD34+ progenitors. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 417: p.15–19.

- Szabolcs, P., Moore, M.A., & Young, J.W. 1995. Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34+ bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF-alpha. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 154(11): p.5851–5861.
- Tan, Y.-F., Leong, C.-F., & Cheong, S.-K. 2010. Observation of dendritic cell morphology under light, phase-contrast or confocal laser scanning microscopy. *The Malaysian Journal of Pathology* 32(2): p.97–102.
- Taylor, D.O., Dorn, C.R., & Luis, O.H. 1969. Morphologic and biologic characteristics of the canine cutaneous histiocytoma. *Cancer Research* 29(1): p.83–92.
- Termeer, C. et al. 2003. Targeting dendritic cells with CD44 monoclonal antibodies selectively inhibits the proliferation of naive CD4+ T-helper cells by induction of FAS-independent T-cell apoptosis. *Immunology* 109(1): p.32–40.
- Thilo Jakob, Mark C. Udey. 1998. Regulation of E-Cadherin-Mediated Adhesion in Langerhans Cell-Like Dendritic Cells by Langerhans Cell-Like Dendritic Cells by Langerhans Cells In Vivo. J Immunol 1998; 160:4067-4073.
- Thongtharb, A., Uchida, K., Chambers, J.K., Kagawa, Y., & Nakayama, H. 2016. Histological and immunohistochemical studies on primary intracranial canine histiocytic sarcomas. *Journal of Veterinary Medical Science* 78(4): p.593–599.
- Thoolen, R.J.M.M. et al. 1992. Malignant fibrous histiocytomas in dogs and cats: an immunohistochemical study. *Research in Veterinary Science* 53(2): p.198–204.
- Tizard, I.R. 2018. Veterinary immunology Tenth edition. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Tran Janco, J.M., Lamichhane, P., Karyampudi, L., & Knutson, K.L. 2015. Tumor-Infiltrating Dendritic Cells in Cancer Pathogenesis. *The Journal of Immunology* 194(7): p.2985– 2991.
- Tsou, P., Katayama, H., Ostrin, E.J., & Hanash, S.M. 2016. The Emerging Role of B Cells in Tumor Immunity. *Cancer Research* 76(19): p.5597–5601.
- Tuominen, V.J., Ruotoistenmäki, S., Viitanen, A., Jumppanen, M., & Isola, J. 2010. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Research* 12(4): p.R56.
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. 2015. Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *Journal of Immunology Research* 2015: p.1–21.
- Valli, V.E. 2007. Veterinary comparative hematopathology 1st ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub.
- Van Lint, P., & Libert, C. 2007. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 82(6): p.1375–1381.

- Villablanca, E.J., & Mora, J.R. 2008. A two-step model for Langerhans cell migration to skindraining LN. *European Journal of Immunology* 38(11): p.2975–2980.
- Wang, X., & Lin, Y. 2008. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacologica Sinica* 29(11): p.1275–1288.
- Wang, Y.-S. et al. 2007. Characterization of canine monocyte-derived dendritic cells with phenotypic and functional differentiation. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire* 71(3): p.165–174.
- Weiss, D.J., Wardrop, K.J., & Schalm, O.W. eds. 2010. *Schalm's veterinary hematology* 6th ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Withers, S.S. et al. 2019. Association of macrophage and lymphocyte infiltration with outcome in canine osteosarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 17(1): p.49–60.
- Withrow, S.J., Vail, D.M., & Page, R.L. eds. 2013. *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology* 5th edition. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- van der Woude, L.L., Gorris, M.A.J., Halilovic, A., Figdor, C.G., & de Vries, I.J.M. 2017. Migrating into the Tumor: a Roadmap for T Cells. *Trends in Cancer* 3(11): p.797–808.
- Yasuda, N., Masuda, K., Tsukui, T., Teng, A., & Ishii, Y. 2009. Identification of canine natural CD3-positive T cells expressing an invariant T-cell receptor alpha chain. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 132(2–4): p.224–231.
- Yona, S. et al. 2013. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* 38(1): p.79–91.
- Zitvogel, L. et al. 2008. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *Journal of Clinical Investigation* 118(6): p.1991–2001.
- Zitvogel, L., Terme, M., Borg, C., & Trinchieri, G. 2006. Dendritic cell-NK cell cross-talk: regulation and physiopathology. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 298: p.157–174.

<u>Annexe 1</u> : Tableau des principales tumeurs cutanées et désordres histiocytaires inclus dans le diagnostic différentiel clinique, cytologique et histologique de l'histiocytome cutané canin (Duncan et al. 1979; Kerlin et al. 1996; Affolter et al. 2000; Medleau et al. 2006; Coomer et al. 2008; Do et al. 2009; Joiner et al. 2010; Miller et al. 2013; Nishiya et al. 2016; Raskin et al. 2016; Barger et al. 2017)

Pathologie	Epidémiologie	Présentation clinique	Cytologie et histologie
Lymphome cutané non- épithéliotrope	 Chiens âgés Rare et moins et commun que le lymphome cutané épidermotrope Pas de prédisposition liée au sexe Races prédisposées : Boxer, St Bernard, Bassets, Setter Irlandais, Terriers, Berger Allemand, Golden Retriever 	 Nodules fermes, rarement focaux ou multifocaux, dermiques ou sous- cutanés, alopéciques, rouges à violacés, parfois de forme ovalaire ou linéaire Tête, tronc et extrémités Signes d'atteinte systémique souvent présents 	 Cellules de petite à grande taille, noyau rond, indenté ou convolutionné, cytoplasme légèrement basophile Infiltration nodulaire ou diffuse du derme et des tissus sous-cutanés par les lymphocytes malins, sans envahissement des follicules pileux et des glandes cutanées
Lymphone cutané épidermotrope	 Animaux âgés, entre 9- 12 ans en moyenne Pas de prédispositio ns connues 	 Plaques cutanée et érythrodermie, puis aspect nodulaire Dépigmentation, alopécie et ulcération fréquentes, stomatites ulcératives décrites Progression lente, atteinte des NL périphériques puis systémique 	 Cellules lymphoïdes abondantes et rondes, cytoplasme basophile, noyau pléomorphique, indenté à lobulaire Bandes lichénoïdes de lymphocytes néoplasiques infiltrant le derme superficiel ainsi que la surface de l'épithélium. Inclusion intra- épidermales vésicales décrites (microabcès de Pautrier)
Mastocytome	 Tumeur cutanée la plus fréquente du chien (16- 21%), incidence élevée chez les animaux âgés (âge moyen d'incidence : 8 ans) Pas de prédisposition liée au sexe, mais liée à la race : Boxer, Terrier, Bouledogue anglais, 	 Aspect pléomorphique des lésions, plus fréquemment solitaires que multiples : nodulaires à pédiculées, dermiques à sous-cutanées, érythémateuses à hyperpigmentées, de quelques millimètres à plusieurs centimètres 	 Cellules rondes à noyau rond, abondantes granulations cytoplasmiques basophiles. La coloration des granulations est susceptible de varier en fonction du stade de différenciation Plages d'infiltration non encapsulées ou nodules

	Labrador, Golden retriever, Teckels, Shar- Pei et Braque de Weimar prédisposés	 Distribution des lésions : 50% tronc, 40% extrémités, 10% tête Apparition d'un érythème et œdème local à la palpation des lésions : signe de Darier 	densément constitués de cellules néoplasiques. Eosinophilie périphérique fréquente
Plasmocytome	 Tumeur cutanée commune, touche les chiens âgés (âge moyen d'incidence : 10 ans) Pas de prédisposition liée au sexe, les Yorkshire Terriers semblent prédisposés 	 Tumeur fréquemment unique, localisée préférentiellement aux doigts, lèvres, menton et pavillon auriculaire Lésion nodulaire, ferme, lisse, bien circonscrite, dermique, de 1 à 2cm de diamètre 	 Cellules rondes plasmocytaires, cytoplasme bleu foncé, halo périnucléaire, noyau rond excentré à chromatine mottée. Cellules multi ou binucléées courantes Plages et nodules de cellules néoplasiques infiltrant le derme et les tissus sous-cutanés. Pléomorphisme cellulaire marqué
Tumeur vénérienne transmissible canine (Sarcome de Sticker)	 Incidence variable selon les régions du monde, enzootique dans les régions au climat tempéré Pas de prédispositions connues 	 Nodules ou masses fermes à friables, rouges, souvent ulcérées et hémorragiques, dermiques à sous-cutanés, de 1 à 20 cm de diamètre Localisés à la sphère génitale préférentiellement, mais décrits sur l'ensemble du corps Régression spontanée décrite 	 Grandes cellules rondes, pléomorphiques, cytoplasme légèrement bleuté, vacuolaire, noyau rond hyperchromatique possédant 1 à 2 nucléoles Plage de cellules néoplasiques dispersées, dermiques. Figures mitotiques fréquentes, infiltration lymphocytaire présente
Mélanome amélanotique	 Age d'incidence moyen de 9 ans, prédisposition liée à la race : Scottish Terrier, Boston Terrier, Cocker Spaniel, Springers, Boxer, Golden Retriever, Setters Représente un tiers des mélanomes canin 	 Lésions solitaires et nodulaires bien circonscrites, rarement dépigmentées, alopéciques, de 0.5 à 10 cm de diamètre Localisations préférentielles : cavité buccale, tête, tronc, doigts Caractère malin confirmé si amélanotique 	 Cellules pléomorphes rondes à ovales, cytoplasme à granules pigmentées peu abondantes voire absentes Accumulation de mélanocytes, regroupés en grappe, le degré d'infiltration et l'index mitotique sont corrélés positivement à la malignité de la tumeur
Carcinome des cellules de Merkel (Carcinome neuroendocrinien)	 Rare, touche les chiens âgés de plus de 8 ans Pas de prédispositions connues 	 Lésion unique, nodule alopécique de 0.5 à 2.5 cm de diamètres, ulcéré Localisations préférentielles : lèvres, pavillons auriculaires, doigts 	 Cellules rondes à cytoplasme amphophilique abondant, noyau hyperchromatique et vésiculaire, central et rond. Cellules géantes et multinuclées parfois visibles Organisation des cellules néoplasiques en nodules ou travées, infiltration du derme uniquement Pas d'infiltration lymphocytaire décrite
Histiocytose réactionnelle cutanée	 Prolifération cutanée rare et bénigne Affecte les chiens d'âge moyen, prédisposition des Colleys et Shetlands 	 Nodules ou plaques dermiques (rarement sous- cutanées) multiples, érythémateux, alopéciques 	 Histiocytes bénins, pâles, ronds à ovalaires, à cytoplasme abondant et noyau rond

		et ulcérés de 1 à 5 cm de diamètre • Localisations préférentielles au niveau de la tête, du coup, du périnée, du scrotum et des extrémités • Pas d'atteinte systémique possible	 Infiltration d'histiocytes pléocellulaires du derme et des tissus sous-cutanés, souvent périvasculaire Folliculotropsime et envahissement vasculaire possible Présence d'un infiltrat lymphocytaire (majoritairement LT et PNN) et de zones de nécrose associées
Histiocytose réactionnelle systémique	 Chiens d'âge moyen, de 3 à 9 ans, prédisposition chez le Rottweiler, l'Irish Wolfhound, le Golden et le Labrador Retriever 	 Nodules et masses cutanées à sous-cutanées multiples, dépigmentées et ulcérées Atteinte préférentielle de la face, du tronc, des membres et du scrotum. Atteinte profonde (rate, foie, moelle osseuse) également possible 	 Prédominance d'histiocytes bénins, associés à des cellules géantes plurinucléées Infiltration multicentrique, nodulaire et angiocentrique du derme profond et du pannicule adipeux, ainsi que des vaisseaux sanguins et lymphatiques Présence d'un infiltrat inflammatoire variable (lymphocytes, PNN, PNE)
Histiocytose cutanée langerhansienne canine (HCLC)	 Chiens jeunes, prédisposition chez le Shar-Peï 	 Nodules cutanés multiples, alopéciques et fréquemment ulcérés Atteinte cutanéo- muqueuse ainsi que systémique possible 	 Grandes cellules rondes à cytoplasme basophile abondant, noyau rond à réniforme Plages d'infiltration du derme superficiel et de l'épiderme par les cellules néoplasiques Index mitotique souvent important, présence fréquente d'un infiltrat lymphocytaire
Complexe du sarcome histiocytaire : localisé ou généralisé	 Chiens d'âge moyen, supérieur à 3 ans. Prédispositions chez le Bouvier Bernois principalement, puis Rottweiler et Golden Retriever 	 Masses cutanées multiples, à croissance rapide (atteinte profonde également possible : estomac, rate, foie, système nerveux central,) Localisation préférentielle sur les membres, à proximité des articulations Présence de signes systémiques non- spécifiques (anorexie, léthargie) 	 Grandes cellules mononuclées présentant une anisocytose et anisocaryose marquée. Noyau rond, ovale à réniforme avec un nucléole proéminent, cytoplasme vacuolaire abondant et légèrement basophile Infiltration des tissus par des plages histiocytaires, figures mitotiques fréquentes, présence de cellules géantes multinucléées et de phénomène d'érythrophagocytose par les cellules tumorales
Fibrohistiocytome malin (sarcome des tissus mous)	 Chiens d'âge moyen à âgés, atteinte préférentielle des grandes races 	 Masses cutanées uniques à multiples, fermes et adhérentes aux plans profonds Atteinte profonde et systémique fréquente 	 Tumeur dite « mixte », présence de trois types cellulaires distincts : cellules fibroblastiques, histiocytes ronds à polygonaux et cellules géantes plurinucléées

	•	Sarcome des t	tissus mous
		présentant	une
		différenciation	partielle
		histiocytaire	et
		fibroblastique	
	•	Tumeur localem	ient invasive

Annexe 2 : Protocole de réalisation des immunomarquages et consommables associés

1) Principe de réalisation des immunomarquages

Pour la réalisation de marquages immunohistochimiques, les tissus préalablement fixés au formol sont déshydratés et inclus en blocs de paraffine. Des coupes de 3µm sont réalisées à l'aide d'un microtome. Ces coupes sont ensuite déparaffinées et réhydratées via un appareil spécifique (PT Module). Le démasquage des antigènes s'effectue également dans cet appareil à l'aide de bains de solutions tampons à des pH et des températures variés successifs.

Les coupes sont ensuite marquées avec différents anticorps primaires spécifiques de l'antigène, puis à l'aide de l'anticorps secondaire du kit UltraTek HRP anti-polyvalent associé à un complexe enzymatique. Ce marquage est révélé par l'ajout du substrat de la peroxydase (kit NovaRed) entraînant l'apparition d'une coloration brune. Toutes les étapes de marquage et de révélation sont effectuées à l'aide d'un appareil automatique à immunomarquages, l'autostainer (Lab Vision 360). Les lames sont ensuite rapidement colorées à l'hématoxyline-éosine afin de visualiser la morphologie du tissu en plus du marquage. Enfin, les coupes sont de nouveau déshydratées puis montées entre lame et lamelle en milieu adapté (résine synthétique). L'observation des marquages obtenus est effectuée au microscope optique.

2) Matériel utilisé

- Autostainer Lab Vision 360 (ThermoFischer Scientific)
- Appareil à déparaffinage et démasquage PT Module (ThermoFischer Scientific)
- Lames SuperFrost Plus et lamelles couvre-objet 24x60mm (VWR)
- DakoPen (crayon de paraffine)
- Support de lames métallique

3) Consommables utilisés

- Hématoxyline-éosine en solution (Merck, ref : 1.09249.2500)

- Solution saline phosphatée et tamponnée (PBS) Plus Tween 20 (ScyTek Laboratories, ref : PBT010)

- Solution tampon déparaffinage Dewax and Hier Buffer L (ThermoFischer Scientific, ref : TA-999-DHBL)

- Tampon PT Module pH 6 ou pH 9
- Milieu de montage Diamount
- Eau Oxygénée 10 volumes 1l (LPG)
- Eau distillée
- Diluant d'anticorps Emerald Diluent Antibody (Cellmarque, Sigma Aldrich Compagny)
- Solutions d'anticorps primaires (Tableau VIII)

- Kit Uktratek HRP (ScyTek Laboratories) : une solution de blocage avec anticorps, une solution avec anticorps secondaire et un complexe révélateur

- Substrat en kit Vector Novared (Vector)
- Sérum de lapin (Normal Rabbit Serum, Vector, ref : S-5000)
- Sérum de lapin Anti Goat (ThermoScientific, ref : 31732)
- Alcool absolu 2,5l Normapur (VWR, ref : 20821321)
- Ottix Shapper 2,5l (Microm, ref: 02070078)
- Ottix 5 I, solvant de déparaffinage (Microm, ref : T 02070059)

4) Préparation des solutions

- H₂O₂ : mettre 4 ml d'H₂O₂ pour 7,5ml d'eau distillée
- Tampon PT module : une bouteille de 150 ml, complétée à 1,51 avec de l'eau distillée

- PBS Tween : 250ml et compléter à 5l avec de l'eau distillée. Conservation durant plusieurs semaines possible

- Anticorps primaire à diluer à l'aide du diluant d'anticorps (Primary antibody diluting buffer de chez Biomeda) selon la concentration requise

 Solution de blocage marquage Iba-1 : 1ml de PBS + 15µl de sérum de lapin (Normal Rabbit Serum, Vector, ref : S-5000) ; solution anticorps secondaire : 200µl de solution de blocage + 1µl de sérum de lapin Anti Goat (ThermoScientific, ref : 31732)

- Kit Vector NovaRed : dans un flacon de 15ml, ajouter 10 ml d'eau distillée puis : 6 gouttes du flacon 1, 4 gouttes du flacon 2, 4 gouttes du flacon 3, 4 gouttes flacon 4 ; à vortexer 1 minute pour homogénéiser. A préparer au dernier moment à l'abri de la lumière, prendre les précautions nécessaires vis-à-vis de la manipulation de ces substances cancérigènes

5) <u>Mode opératoire</u>

1 - Déparaffinage des échantillons (PT Module)

Mettre à préchauffer le PT Module, puis placer les lames sur les supports de l'autostainer et les mettre dans le PT module pour déparaffinage et démasquage. Le démasquage permet la restauration des sites antigéniques dénaturés par le fixateur initial.

• Iba-1, CD3 ε, Pax-5, CD204, CD206, FoxP3

<u>Démasquage</u> : solution tampon citratée (pH6, Thermoscientific Dewax and HIER Buffer L, Thermofischer, Runcorn, UK) à 95°C durant 40 minutes suivies d'un refroidissement à 20°C pendant 20 minutes DC-LAMP.

• DC-LAMP

<u>Démasquage</u> : solution tampon Tris-EDTA (pH9, Dako target retrieval solution, Dako, Carpinteria, CA) à 95°C durant 40 minutes suivi d'un refroidissement à 20°C pendant 20 minutes.

Utiliser le crayon de paraffine pour délimiter le site de marquage autour de la coupe une fois le déparaffinage et démasquage terminé.

2 - Réalisation des marquages (Autostainer Lab Vision 360)

Installer les supports de lames avec les lames dans l'autostainer, insérer les réactifs (anticorps primaires dilués, eau oxygénée, kit HRP, PBS). Dans un premier temps, l'utilisation de l'eau oxygénée permet le blocage de la peroxydase endogène. Le premier substrat du kit HRP (solution de blocage) puis la solution d'anticorps primaire diluée sont mis en contact avec l'échantillon (1 heure d'incubation à 20°C). L'incubation s'effectue ensuite avec la solution d'anticorps secondaires (30 minutes à 20°C), puis vient l'étape de révélation à l'aide de la peroxydase NovaRed (5 minutes à 20°C). Des rinçages au PBS Tween ont lieu entre chaque étape.

<u>Remarque</u> : la solution de blocage ainsi que la solution d'anticorps secondaire employées pour la réalisation du marquage Iba-1 sont différentes des solutions classiques du kit ultraTek HRP utilisées pour tous les autres marquages.

3 - Réalisation de la contre coloration à l'hématoxyline-éosine

4 - Déshydratation des coupes et montage

Le montage s'effectue entre lame et lamelle. Incuber les lames dans différents bains de solvants placés sous hotte chimique dans l'ordre suivant :

- Alcool : incubation 1 minute
- OTTIX Shapper : incubation 2 minutes
- OTTIX : incubation dans 3 bains successifs de 5 minutes chacun

Après la dernière incubation, laisser les lames dans l'OTTIX et les sortir une par une pour le montage. Déposer les lamelles sur du papier absorbant avec une fine « ligne » de milieu de montage au centre puis placer la lame sur un bord de la lamelle et faire monter le milieu par capillarité.

Faire sécher les lames 20 à 30 minutes à l'étuve à 40°C. Après avoir été séchées, les coupes peuvent être conservées à l'obscurité à température ambiante pendant plusieurs mois.

<u>Annexe 3</u> : Tableaux de résultats des analyses de corrélations entre paramètres histologiques et immunomarquages

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	Groupe HCC	0.89	2.0e-07	Oui	Positive
					forte
	Comptage	- 0.27	0.085	Non	Absence
CD3 ε	mitotique				
	Ulcération	0.12	0.51	Non	Absence
	Infiltrats	0.13	0.49	Non	Absence
	intraépidermiques				
	Nécrose	0.44	0.017	Oui	Positive
					modérée

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	Groupe HCC	0.49	0.004	Oui	Positive
					modérée
	Comptage	-0.048	0.755	Non	Absence
Pax-5	mitotique				
	Ulcération	0.042	0.82	Non	Absence
	Infiltrats	0.26	0.15	Non	Absence
	intraépidermiques				
	Nécrose	0.33	0.059	Non	Absence

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	Groupe HCC	0.66	1.0e-05	Oui	Positive
					forte
	Comptage	- 0.12	0.43	Non	Absence
CD204	mitotique				
intratumoral	Ulcération	0.049	0.79	Non	Absence
	Infiltrats	- 0.08	0.67	Non	Absence
	intraépidermiques				
	Nécrose	0.42	0.024	Oui	Positive
					modérée

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	Groupe HCC	0.43	0.013	Oui	Positive
					modérée
	Comptage	- 0.07	0.65	Non	Absence
CD204	mitotique				
péritumoral	Ulcération	0.07	0.71	Non	Absence
	Infiltrats	0.12	0.53	Non	Absence
	intraépidermiques				
	Nécrose	0.46	0.014	Oui	Positive
					modérée

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	Groupe HCC	0.37	0.037	Oui	Positive
					modérée
DC-LAMP	Comptage	- 0.14	0.39	Non	Absence
intratumoral	mitotique				
	Ulcération	0.21	0.27	Non	Absence
	Infiltrats	- 0.076	0.69	Non	Absence
	intraépidermiques				
	Nécrose	0.15	0.44	Non	Absence

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	Groupe HCC	0.41	0.015	Oui	Positive
					modérée
DC-LAMP	Comptage	0.057	0.72	Non	Absence
péritumoral	mitotique				
	Ulcération	0.11	0.57	Non	Absence
	Infiltrats	- 0.13	0.47	Non	Absence
	intraépidermiques				
	Nécrose	0.24	0.19	Non	Absence

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	Groupe HCC	0.40	0.018	Oui	Positive
					modérée
	Comptage	- 0.18	0.23	Non	Absence
CD206	mitotique				
	Ulcération	0.036	0.84	Non	Absence
	Infiltrats	0.26	0.15	Non	Absence
	intraépidermiques				
	Nécrose	0.033	0.86	Non	Absence

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	Groupe HCC	0.18	0.28	Non	Absence
	Comptage	- 0.048	0.76	Non	Absence
FoxP3	mitotique				
intratumoral	Ulcération	- 0.053	0.77	Non	Absence
	Infiltrats	0.086	0.63	Non	Absence
	intraépidermiques				
	Nécrose	0.20	0.28	Non	Absence

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	Groupe HCC	0.082	0.63	Non	Absence
	Comptage	- 0.053	0.73	Non	Absence
FoxP3	mitotique				
péritumoral	Ulcération	- 0.31	0.09	Non	Absence
	Infiltrats	- 0.24	0.18	Non	Absence
	intraépidermiques				
	Nécrose	- 0.061	0.74	Non	Absence

Annexe 4 : Tableaux de résultats des analyses de corrélations entre immunomarquages

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	Pax-5	0.53	0.0020	Oui	Positive
					forte
	CD204	0.63	3e-04	Oui	Positive
	intratumoral				forte
	CD204	0.39	0.027	Oui	Positive
	péritumoral				modérée
	DC-LAMP	0.39	0.027	Oui	Positive
CD3 ε	intratumoral				modérée
	DC-LAMP	0.44	0.011	Oui	Positive
	péritumoral				modérée
	CD206	0.48	0.0052	Oui	Positive
					modérée
	FoxP3	0.21	0.22	Non	Absence
	intratumoral				
	FoxP3	0.091	0.60	Non	Absence
	péritumoral				

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	CD3 ε	0.53	0.0020	Oui	Positive
					forte
	CD204	0.16	0.34	Non	Absence
	intratumoral				
	CD204	0.14	0.42	Non	Absence
	péritumoral				
	DC-LAMP	0.45	0.011	Oui	Positive
Pax-5	intratumoral				modérée
	DC-LAMP	0.42	0.014	Oui	Positive
	péritumoral				modérée
	CD206	0.35	0.037	Oui	Positive
					modérée
	FoxP3	0.16	0.34	Non	Absence
	intratumoral				
	FoxP3	- 0.05	0.75	Non	Absence
	péritumoral				

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	CD3 ε	0.63	3e-04	Oui	Positive
					forte
	Pax-5	0.16	0.34	Non	Absence
	DC-LAMP	0.31	0.081	Non	Absence
	intratumoral				
CD204	DC-LAMP	0.43	0.013	Oui	Positive
intratumoral	péritumoral				modérée
	CD206	0.29	0.094	Non	Absence
	FoxP3	0.23	0.18	Non	Absence
	intratumoral				
	FoxP3	0.15	0.38	Non	Absence
	péritumoral				

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	CD3 ε	0.39	0.027	Oui	Positive
					modérée
	Pax-5 0.14		0.42	Non	Absence
	DC-LAMP	0.16	0.39	Non	Absence
	intratumoral				
CD204	DC-LAMP	0.33	0.061	Non	Absence
péritumoral	péritumoral				
	CD206	0.084	0.63	Non	Absence
	FoxP3	0.31	0.081	Non	Absence
	intratumoral				
	FoxP3	0.26	0.13	Non	Absence
	péritumoral				

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	CD3 ε	0.39	0.027	Oui	Positive
					modérée
	Pax-5	0.45	0.011	Oui	Positive
					modérée
	CD204	0.31	0.081	Non	Absence
DC-LAMP	intratumoral				
intratumoral	CD204	0.16	0.39	Non Oui	Absence
	péritumoral				
	CD206	0.46	0.0086		Positive
					modérée
	FoxP3	0.27	0.12	Non	Absence
	intratumoral				
	FoxP3	0.069	0.70	Non	Absence
	péritumoral				

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	CD3 ε	0.44	0.011	Oui	Positive
					modérée
	Pax-5	0.42	0.014	Oui	Positive
					modérée
	CD204	0.43	0.013	Oui	Positive
DC-LAMP	intratumoral				modérée
péritumoral	CD204	0.33	0.061	Non	Absence
	péritumoral				
	CD206	0.46	0.0076	Oui	Positive
					modérée
	FoxP3	0.35	0.038	Oui	Positive
	intratumoral				modérée
	FoxP3	0.13	0.46	Non	Absence
	péritumoral				

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	CD3 ε	0.48	0.0052	Oui	Positive
					modérée
	Pax-5	0.35	0.037	Oui	Positive
					modérée
	CD204	0.29	0.094	Non	Absence
	intratumoral				
	CD204	0.084	0.63	Non	Absence
	péritumoral				
CD206	DC-LAMP	0.46	0.0086	Oui	Positive
	intratumoral				modérée
	DC-LAMP	0.46	0.0076	Oui	Positive
	péritumoral				modérée
	FoxP3	0.19	0.25	Non	Absence
	intratumoral				
	FoxP3	0.0081	0.96	Non	Absence
	péritumoral				

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	CD3 ε	0.21	0.22	Non	Absence
	Pax-5	0.16	0.34	Non	Absence
	CD204	0.23	0.18	Non	Absence
	intratumoral				
FoxP3	CD204	0.31	0.081	Non	Absence
intratumoral	péritumoral				
	DC-LAMP	0.27	0.12	Non	Absence
	intratumoral				
	DC-LAMP	0.35	0.038	Oui	Positive
	péritumoral				modérée
	CD206	0.19	0.25	Non	Absence

Variable	Variable	τ	P-value	Significativité	Corrélation
principale	secondaire				
	CD3 ε	0.091	0.60	Non	Absence
	Pax-5	- 0.05	0.75	Non	Absence
	CD204	0.15	0.38	Non	Absence
	intratumoral				
FoxP3	CD204	0.26	0.13	Non Non	Absence
péritumoral	péritumoral				
	DC-LAMP	0.069	0.70		Absence
	intratumoral				
	DC-LAMP	0.13	0.46	Non	Absence
	péritumoral				
	CD206	0.0081	0.96	Non	Absence

Annexe 5 : Données épidémiologiques relatives aux cas d'HCC sélectionnés

CASE_NUMBER	AGE (MOIS)	SEXE	RACE	LOCALISATION
14_1022	46	F	Berger Allemand	NA
14_1511	88	F	Epagneul Breton	NA
15_0650	45	F	Bouledogue F	NA
15_1003	39	М	Bouledogue F	NA
15_1167	158	М	Croisé	NA
15_1506	53	F	Bouledogue F	Face dorsale métacarpe G
16_0154	44	М	Berger Allemand	NA
16_0458	45	М	Croisé	NA
16_0787	NA	М	Teckel	NA
16_0842_1	59	F	Americain Staffordshire	Face interne pavillon auriculaire
16_0981_2	58	М	Bouledogue F	NA
16_0988_1	12	F	Americain Staffordshire	NA
16_1013	NA	F	Bouledogue F	NA
16_1053	16	F	Bouledogue F	NA
16_1164	26	М	Golden Retriever	NA

16_1346	15	М	Americain Staffordshire	NA
16_1420	40	F	Yorkshire	NA
16_1439	NA	М	Dogue Bordeaux	NA
16_1510	53	F	West Highland Terrier	NA
16_1608_1 (lba-1 ⁻)	140	F	Bouledogue F	Nodule dermique OG
16_1674	7	М	Griffon	NA
17_0225	92	М	Border Collie	NA
17_0357	66	F	Bouledogue F	NA
17_0438	65	F	Cocker Anglais	NA
17_0541	142	М	Cairn Terrier	NA
17_0670	47	М	Malinois	Angle interne OD
17_0672	23	М	Bouledogue F	NA
17_0806	65	F	Berger Allemand	NA
17_0817	12	F	Bouledogue F	NA
17_1118	39	F	Bruno St Hubert	NA
17_1218	39	F	SharPei	NA
17_1462	89	F	Cocker Anglais	NA

<u>Annexe 6</u> : Donnees associees a revaluation des parametres histologiques : comptage
mitotique, présence d'ulcération, d'infiltrats intraépidermiques et de zones de nécrose

.

λ.

1.

• •

1 1/2

-1 -1*

•

C

CASE_NUMBER	AGE	GROUP	CM	ULCERATION	INFILTRATS	NECROSE
14_1022	46	3	27	1	1	1
14_1511	88	3	4	1	1	1
15_0650	45	2	21	1	0	1
15_1003	39	1	10	1	0	1
15_1167	158	1	18	1	0	1
15_1506	53	1	18	1	0	1
16_0154	44	2	27	1	1	1
16_0458	45	3	12	1	1	1
16_0787	NA	2	2	0	0	1
16_0842_1	59	3	6	1	0	1
16_0981_2	58	4	3	1	0	1
16_0988_1	12	4	8	1	1	1
16_1013	NA	1	8	1	0	0
16_1053	16	3	4	1	0	1
16_1164	26	2	4	0	1	0
16_1346	15	3	18	1	0	1
16_1420	40	4	5	1	0	1
16_1439	NA	4	0	1	1	1
16_1510	53	1	5	0	0	0
16_1674	7	3	2	1	1	1
17_0225	92	3	2	0	0	1
17_0357	66	1	17	1	0	0
17_0438	65	4	7	1	0	1
17_0541	142	1	6	1	0	0
17_0670	47	3	1	1	1	1
17_0672	23	3	16	0	0	1
17_0806	65	4	0	1	0	1
17_0817	12	3	2	1	1	1
17_1118	39	1	17	0	0	1
17_1218	39	4	0	0	1	1
17_1462	89	3	27	1	0	1

CASE_NUMBER	IBA1	CD3	PAX5	CD204_intratum	CD204_intratum_density	CD204_peritum	CD204_peritum_density
14_1022	1	3	3	3	145	4	200
14_1511	1	3	4	2	90	3	110
15_0650	1	3	2	3	120	4	200
15_1003	1	1	1	2	82	3	180
15_1167	1	2	1	3	170	3	162
15_1506	1	1	1	2	48	2	34
16_0154	1	3	2	3	160	4	200
16_0458	1	3	1	3	114	4	200
16_0787	1	2	2	2	83	2	51
16_0842_1	1	3	2	4	200	4	200
16_0981_2	1	4	2	4	200	4	200
16_0988_1	1	4	3	4	200	3	165
16_1013	1	1	1	3	109	3	147
16_1053	1	3	2	4	200	4	200
16_1164	1	2	1	3	150	4	200
16_1346	1	3	3	3	135	4	200
16_1420	1	4	2	4	200	4	200
16_1439	1	4	2	4	200	4	200
16_1510	1	1	1	2	45	2	84
16_1674	1	3	2	4	200	4	200
17_0225	1	3	2	3	128	4	200
17_0357	1	1	1	2	20	2	33
17_0438	1	4	3	4	200	4	200
17_0541	1	3	2	2	45	2	52
17_0670	1	3	3	2	40	4	200
17_0672	1	3	2	4	200	4	200
17_0806	1	4	1	4	200	4	200
17_0817	1	3	1	3	180	4	200
17_1118	1	1	1	NA	NA	NA	NA
17_1218	1	4	4	3	126	3	115
17_1462	1	3	2	3	195	4	200

<u>Annexe 7</u> : Données associées à l'évaluation des immunomarquages Iba-1, CD3 ϵ , Pax-5, CD204, DC-LAMP, CD206 et FoxP3

CASE_NUMBER	DCLAMP_intratum	DCLAMP_intratum_density	DCLAMP_peritum	DCLAMP_peritum_density
14_1022	2	6	3	54
14_1511	2	6	2	26
15_0650	1	0	1	4
15_1003	1	3	1	1
15_1167	1	1	1	1
15_1506	1	0	1	2
16_0154	1	1	2	10
16_0458	1	0	1	0
16_0787	1	3	2	5
16_0842_1	3	53	3	62
16_0981_2	1	3	1	3
16_0988_1	1	0	1	0
16_1013	1	3	1	3
16_1053	2	15	2	25
16_1164	1	2	1	0
16_1346	3	52	3	72
16_1420	2	7	3	59
16_1439	4	110	4	250
16_1510	1	3	1	4
16_1674	2	8	2	18
17_0225	1	0	1	3
17_0357	1	0	1	0
17_0438	3	77	4	110
17_0541	2	18	2	8
17_0670	1	0	1	0
17_0672	1	2	3	73
17_0806	2	48	3	54
17_0817	1	3	1	0
17_1118	2	15	2	17
17_1218	2	14	2	45
17_1462	1	0	2	16

CASE_NUMBER	CD206	FoxP3_intratum	FoxP3_intratum_density	FoxP3_peritum	FoxP3_peritum_density
14_1022	3	2	26	2	21
14_1511	3	3	35	2	17
15_0650	2	2	26	4	60
15_1003	1	4	63	3	42
15_1167	3	1	0	1	0
15_1506	1	1	0	1	0
16_0154	3	4	80	2	20
16_0458	3	2	13	2	27
16_0787	1	2	15	2	7
16_0842_1	4	2	6	3	35
16_0981_2	1	1	0	2	3
16_0988_1	4	2	19	2	4
16_1013	1	2	23	3	35
16_1053	1	2	14	2	5
16_1164	3	3	31	3	35
16_1346	3	2	18	2	20
16_1420	4	2	20	2	10
16_1439	4	1	0	1	0
16_1510	3	1	4	4	93
16_1674	4	4	104	2	29
17_0225	1	4	210	4	114
17_0357	1	1	0	1	0
17_0438	4	4	76	3	36
17_0541	4	2	23	2	11
17_0670	4	1	0	1	0
17_0672	3	2	27	2	16
17_0806	4	4	96	3	32
17_0817	2	1	10	2	23
17_1118	NA	NA	NA	NA	NA
17_1218	4	2	24	2	18
17_1462	3	3	51	4	112

SAPIN Pierrick

CARACTÉRISATION DE L'INFILTRAT IMMUNITAIRE AU SEIN DE L'HISTIOCYTOME CUTANÉ CANIN

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, le 4 octobre 2019

RESUME : L'histiocytome cutané canin est une tumeur cutanée parmi les plus fréquemment rencontrées en pratique vétérinaire courante, qui représente jusqu'à 18% des néoplasies cutanées canines. Ce processus tumoral bénin est caractérisé par une croissance rapide ainsi qu'une régression spontanée dans un intervalle de moins de 3 mois suivant son apparition. Cette régression tumorale est associée à une infiltration progressive et centripète de la tumeur par un contingent de lymphocytes ; une forte activité cytotoxique médiée par les lymphocytes CD8⁺ s'avère y prévaloir. Cependant, cette action semble être couplée à celle d'autres cellules immunocompétentes, nécessaire à l'activation de l'immunité adaptative anti-tumorale.

L'objectif de cette étude était de caractériser clairement les cellules présentes au sein de l'infiltrat immunitaire ainsi que leur mise en place progressive, afin d'appréhender les mécanismes de régression tumorale présents au sein de l'HCC. Cette caractérisation a été permise par l'analyse histologique et immunohistochimique de tumeurs provenant de 32 chiens différents. Notre étude s'est principalement basée sur l'évaluation qualitative et semi-quantitative d'immunomarquages visant les cellules de la lignée lymphoïde (CD3 α , Pax-5, FoxP3) et de la lignée histiocytaire (Iba-1, DC-LAMP, CD204, CD206), ainsi que de paramètres histologiques. Nos résultats font état d'une probable activation et maturation progressive des cellules tumorales, à l'origine d'une stimulation de l'immunité anti-tumorale à leur encontre. Ils ont également permis d'écarter l'hypothèse d'un développement tumoral rapide secondaire à un microenvironnement pro-tumoral. De plus, la présence de cellules clefs de l'immunité anti-tumorale – cellules dendritiques et macrophages – a été confirmée.

Il semblerait que ce soit donc le type cellulaire dont dérivent les cellules tumorales, des cellules dendritiques immatures, qui permette une régression tumorale rapide une fois leur maturation enclenchée par les signaux du microenvironnement inflammatoire tumoral.

MOTS CLES :

- Chien Système immunitaire
- Tumeurs
- Cancer -- régression spontanée
- Histochimie
- Calleer --

JURY:

Président :

Monsieur le Professeur Jean-Yves BLAY

1er Assesseur :	Madame le Docteur Sara BELLUCO
2ème Assesseur :	Monsieur le Professeur Thierry MARCHAL

DATE DE SOUTENANCE : Vendredi 4 octobre 2019