

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2021- Thèse n° 068

**ETUDE COMPAREE DES CARCINOMES EPIDERMOIDES
ORaux CHEZ LE CHIEN ET CHEZ L'HOMME :
CARACTERISATION HISTOLOGIQUE,
IMMUNOHISTOCHIMIQUE ET TRANSCRIPTOMIQUE**

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 19 octobre 2021
Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

Par

QUEFFEULOU Alexis

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2021- Thèse n° 068

**ETUDE COMPAREE DES CARCINOMES EPIDERMOIDES
ORAUX CHEZ LE CHIEN ET CHEZ L'HOMME :
CARACTERISATION HISTOLOGIQUE,
IMMUNOHISTOCHIMIQUE ET TRANSCRIPTOMIQUE**

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 19 octobre 2021
Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

Par

QUEFFEULOU Alexis

Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (01-09-2021)

ABITBOL	Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ARCIANGIOLI	Marie-Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
AYRAL	Florence	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BECKER	Claire	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BELLUCO	Sara	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENAMOU-SMITH	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENOIT	Etienne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BERNY	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BOULOCHER	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BOURDOISEAU	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur émérite
BOURGOIN	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BUFF	Samuel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BURONFOSSE	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
CACHON	Thibaut	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CADORÉ	Jean-Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
CHABANNE	Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CHALVET-MONFRAY	Karine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DE BOYER DES ROCHES	Alice	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DJELOUADJI	Zorée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ESCRIOU	Catherine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
FRIKHA	Mohamed-Ridha	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GALIA	Wessam	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
GONTHIER	Alain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GRANCHER	Denis	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
GREZEL	Delphine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
HUGONNARD	Marine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
JUNOT	Stéphane	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
KODJO	Angeli	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
KRAFFT	Emilie	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
LAABERKI	Maria-Halima	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LAMBERT	Véronique	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LE GRAND	Dominique	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
LEBLOND	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LEDoux	Dorothee	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LEFEBVRE	Sébastien	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEGROS	Vincent	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LEPAGE	Olivier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LOUZIER	Vanessa	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
MARCHAL	Thierry	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOISSONNIER	Pierre	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOSCA	Marion	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
MOUNIER	Luc	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
PEPIN	Michel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
PIN	Didier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PONCE	Frédérique	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PORTIER	Karine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
POUZOT-NEVORET	Céline	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
PROUILLAC	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
REMY	Denise	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
RENE MARTELLET	Magalie	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ROGER	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
SAWAYA	Serge	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
SCHRAMME	Michael	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
SERGEANTET	Delphine	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
THIEBAULT	Jean-Jacques	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
TORTEREAU	Antonin	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
VIGUIER	Eric	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
ZENNER	Lionel	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-Yves BLAY,

De la Faculté de médecine de Lyon, Claude Bernard Lyon I

Pour m’avoir accordé le privilège d’accepter la présidence de ce jury de thèse,
Ma profonde gratitude.

A Madame le Professeur Frédérique PONCE,

Professeur à VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon,

Pour m’avoir guidé et conseillé tout au long de cette aventure que constitue la
thèse d’exercice vétérinaire, toujours avec bienveillance,
Mes remerciements les plus sincères.

A Monsieur le Docteur Antonin TORTEREAU,

Maître de conférences à VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon,

Pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse, pour son soutien et ses
conseils sur la conception et réalisation des manipulations en lien avec
l’histologie et immunohistochimie des échantillons néoplasiques,
Mes remerciements les plus sincères.

A Madame le Docteur Karène MAHTOUK,

Maître de conférences à l’Université Claude Bernard Lyon 1,

Pour m’avoir encadré et soutenu au cours de ce projet de recherche, y compris
dans les moments de manipulations infructueuses,
Mes remerciements les plus sincères.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ANNEXES	9
TABLE DES FIGURES	11
TABLE DES TABLEAUX	13
LISTE DES ABBREVIATIONS	15
INTRODUCTION	17
Partie I : Revue bibliographique	19
I. Epidémiologie des carcinomes épidermoïdes oraux chez l’Homme et le Chien	20
A. Données d’épidémiologie générale	20
B. Facteurs de risque internes	20
C. Facteurs de risque environnementaux	22
II. Pathogénie et comportement biologique : localisation, aspect, invasion locale, métastases et stade clinique	27
A. Localisation des tumeurs primaires	27
B. Aspect macroscopique des lésions primaires et invasion locale	27
C. Comportement métastatique	29
D. Classification en stades cliniques des cancers de la cavité orale.....	29
III. Apports de l’histologie et immunohistochimie au diagnostic et au pronostic.....	33
A. L’histologie, méthode de référence pour le diagnostic de certitude.....	33
B. Intérêts pronostics de l’histologie et immunohistochimie.....	34
IV. Données transcriptomiques	37
A. Etude comparée des carcinomes épidermoïdes oraux chez l’Homme et le Chien par séquençage ARN ‘bulk’	37
B. Le séquençage ARN ‘single-cell’ chez l’Homme permet un meilleur accès à l’hétérogénéité intra-tumorale des HNSCC	43
V. Prise en charge thérapeutique	54
A. Prise en charge chirurgicale.....	54
B. Radiothérapie.....	57
C. Photothérapie dynamique.....	59
D. Chimiothérapie cytotoxique.....	59
E. Thérapies ciblées	61
F. Inhibiteurs des points de contrôle immunitaires	61
G. Surveillance carcinologique	62

Partie II : l'analyse transcriptomique des carcinomes épidermoïdes de la cavité orale chez l'Homme et le Chien révèle une hétérogénéité à plusieurs niveaux dans la transition épithélio-mésenchymateuse et sa régulation	63
I. Matériel et Méthodes.....	64
II. Résultats.....	68
III. Discussion.....	77
CONCLUSION.....	80
BIBLIOGRAPHIE.....	82
ANNEXES.....	103

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Hétérogénéité inter-tumorale dans l'expression des facteurs de transcription majeurs de la TEM et dans la signature de TEM, au sein de la cohorte de Guscetti *et al.*
.....103

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Cas de leucoplasie linguale chez l'Homme	28
Figure 2 : Les carcinomes épidermoïdes oraux adoptent des aspects macroscopiques variés	23
Figure 3 : Coupe histologique d'un carcinome épidermoïde lingual canin, de sous-type histologique 'conventionnel' et bien différencié	33
Figure 4 : Hétérogénéité des profils d'expression des cellules malignes et non malignes au sein de carcinomes épidermoïdes oraux chez l'Homme	45
Figure 5 : Modèles alternatifs ou complémentaires de dissémination tumorale, à la lumière de la grande similarité entre HNSCC primaire et métastase ganglionnaire correspondante	49
Figure 6 : Populations et sous-populations de cellules T au sein de carcinomes épidermoïdes tête et cou d'après les données de séquençage ARN 'single-cell'	51
Figure 7 : Recoupement entre les trois signatures utilisées pour caractériser le phénotype de transition épithélio-mésenchymateuse	66
Figure 8 : La comparaison des tissus sains et tumoraux dans les jeux de données canins et humains révèle un enrichissement concordant de la transition épithélio-mésenchymateuse dans les échantillons néoplasiques	69
Figure 9 : Les différents jeux de données analysés présentent des spécificités dans l'expression différentielle des facteurs de transcription majeurs de la transition épithélio-mésenchymateuse	70
Figure 10 : A l'échelle de l'échantillon, l'enrichissement dans la signature TEM est associé à une augmentation de l'expression des facteurs de transcription majeurs de la TEM et/ou à une diminution de la pureté des tumeurs dans les jeux de données humain et canin ...	72
Figure 11 : L'enrichissement dans la signature TEM reste associé à une augmentation de l'expression des facteurs de transcription majeurs de la TEM dans des tumeur avec de hautes estimations de pureté	73
Figure 12 : Les cellules malignes présentent une hétérogénéité inter- et intra-tumorale vis-à-vis des signatures en lien avec la transition épithélio-mésenchymateuse	74
Figure 13 : L'analyse des données 'single-cell' permet l'identification de sous-populations de cellules malignes avec des caractéristiques spécifiques vis-à-vis de la transition épithélio-mésenchymateuse	75
Figure 14 : Dissociation en éléments cellulaires individuels et tri cellulaire à partir d'un carcinome épidermoïde oral canin	77

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Sites anatomiques inclus au sein de la cavité orale et de l’oropharynx	19
Tableau II : Principales techniques utilisées pour identifier HPV dans les lésions d’OSCC ou OPSCC	24
Tableau III : Classification TNM de l’UICC des cancers de la cavité orale chez l’Homme	31
Tableau IV : Attribution du stade clinique chez l’Homme, selon la classification TNM de l’UICC	31
Tableau V : Classification TNM de l’OMS des cancers oraux chez le Chien	32
Tableau VI : Attribution du stade clinique chez le Chien, selon la classification TNM de l’OMS	32
Tableau VII : Spécificités histologiques des sous-types de carcinome épidermoïde oraux chez l’Homme, et prévalence des lésions analogues chez le Chien	34
Tableau VIII : Informations sur les cas de la cohorte de Liu <i>et al.</i>	38
Tableau IX : Informations sur les cas de la cohorte de Guscetti <i>et al.</i>	39
Tableau X : Gènes retrouvés mutés à la fois dans les HNSCC canins et humains d’après les données de séquençage ARN de Liu <i>et al.</i>	43
Tableau XI : Articles originaux analysant des données de séquençage ARN ‘single-cell’ de carcinomes épidermoïdes tête et cou chez l’Homme	44
Tableau XII : Méthodes utilisées par les estimateurs de pureté ABSOLUTE, ESTIMATE, LUMP et IHC	64
Tableau XIII : Caractéristiques principales des jeux de données RNAseq inclus	64

LISTE DES ABBREVIATIONS

ANC = Anomalie du Nombre de Copies [de gènes]
ASR = Age-Standardized incidence Rate
Bulk = Analyse d'un échantillon entier (tumoral ou non) sans faire de distinction entre ses différents constituants cellulaires
CAF = Fibroblastes associés au cancer ('Cancer Associated Fibroblasts')
CDK = Cyclin Dependent Kinase
CG = Centre Germinatif
CMS = Cellules Myéloïdes Suppressives
CPE = Mesure consensus dérivée (Estimation de la pureté tumorale)
CPV = Canine Papillomavirus
cOSCC = carcinome épidermoïde oral de type histologique conventionnel ('conventional OSCC')
COPV = Canine Oral PapillomaVirus = CPV-1
CTC = Cellules Tumorales Circulantes
DP = Dérivé de Platine
DOI = profondeur ou distance d'invasion au-delà de la lame basale ('Depth of Invasion')
EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor
END = Exérèse optionnelle des nœuds lymphatiques cervicaux ('Elective Neck Dissection')
ENE = envahissement extra-capsulaire d'un nœud lymphatique (Extra-Nodal Extension)
EVA = Expression Variation Analysis
FB = Fumeur-Buveur
FFPE = Echantillon Fixé en Formaline et inclus en paraffine ('Formalin-Fixed Paraffin-Embedded')
fGSEA = fast pre-ranked Gene Set Enrichment Analysis
FT = Facteur(s) de transcription
GD = plus grand diameter ('Greater Diameter')
HE = Hemalun-Eosine
HGNC = HUGO Gene Nomenclature Committee
HPPH = pyropheophorbide-alpha-hexyl-ether
HPV =
IC95 = Intervalle de Confiance à 95 %
ICD = International Classification of Diseases
ICI = Inhibiteurs des points de contrôle immunitaires ('Immune Check-point Inhibitors')
IHC = Immunohistochimie
INHANCE = INternational Head And Neck Cancer Epidemiology

HNSCC = carcinome épidermoïde de la tête et du cou ('Head and Neck Squamous Cell Carcinoma')

HPPH = pyropheophorbide-alpha-hexyl-ether

HPV = Human PapillomaVirus

LIT = Leucocytes Intra-Tumoraux

log2(FC) = log2(Fold Change), avec 'Fold Change' le changement d'expression relatif entre deux échantillons ou groupes d'échantillons

LSCC = carcinome épidermoïde laryngé ('Laryngeal Squamous Cell Carcinoma')

MAT = Macrophages Associés aux Tumeurs

MSigDB = Molecular Signature DataBase

NFNB = Non Fumeur-Non Buveur

NL = Nœud Lymphatique

OR = Odds-Ratio

OMS = Organisation Mondiale de la Santé

OPSCC = carcinome épidermoïde oropharyngé ('Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma')

OSCC = carcinome épidermoïde de la cavité orale (Oral Squamous Cell Carcinoma)

padj = p-value ajustée

PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen

q(RT-)PCR = quantitative (Reverse Transcription -) Polymerase Chain Reaction

RGH = réaction du Greffon contre l'Hôte

R/M = [cancer] récurrent ou métastatique

RNAseq = séquençage ARN

SCC = carcinome épidermoïde ('Squamous Cell Carcinoma')

scRNAseq = séquençage ARN cellule unique (single-cell RNAseq)

SLT = Structure Lymphoïde tertiaire

TCGA = The Cancer Genome Atlas

Tconv = lymphocyte T CD4+ conventionnel

TEM = Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TEM-p = TEM partielle

TFH = [lymphocyte] T Folliculaire Helper

TPM = Transcript-per-million

Treg = Lymphocyte T CD4+ régulateur

UICC = Union Internationale Contre le Cancer

VEGF(R) = Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)

X-SCID = Déficit Immunitaire Combiné Sévère lié à l'X

5-FU = 5-fluouracil

INTRODUCTION

Les carcinomes épidermoïdes sont des cancers se développant à partir d'un épithélium malpighien, c'est-à-dire un épithélium pavimenteux stratifié. Les carcinomes épidermoïdes survenant au niveau de la cavité orale, des cavités nasales, des sinus, du pharynx, du larynx, des glandes salivaires ou de la thyroïde sont regroupés au sein d'une entité nosologique : les carcinomes épidermoïdes tête et cou (HNSCC, 'Head and Neck Squamous Cell Carcinoma'). Cette définition large des HNSCC peut connaître des variations. Certains auteurs ou institutions en excluent ainsi le nasopharynx, les glandes salivaires et/ou la thyroïde [1]. Même au sein des HNSCC, différentes localisations sont associées à des facteurs de risque, pronostics voire traitements différents, il peut donc être pertinent de les étudier séparément. Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux carcinomes épidermoïdes de la cavité orale (OSCC, 'Oral Squamous Cell Carcinoma').

Les OSCC canins partagent de nombreuses caractéristiques histologiques avec les OSCC humains [2,3]. Quelques études basées sur le séquençage ARN (RNAseq) ont également mis en évidence des similarités potentielles dans le processus de carcinogenèse des OSCC [4,5], soutenant l'idée que les OSCC canins peuvent constituer un modèle intéressant pour les OSCC humains. Les similarités mises en évidence incluaient la présence d'un processus de Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) [4,5].

La Transition Epithélio-Mésenchymateuse consiste, pour une cellule d'origine épithéliale, en la perte de ses caractéristiques épithéliales et/ou le gain de caractéristiques mésenchymateuses. La TEM est régulée à de multiples niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel, et post-traductionnel [2]. Le niveau transcriptionnel en particulier peut être étudié avec le RNAseq, qui donne accès à l'abondance relative des transcrits ARN. La régulation transcriptionnelle de la TEM implique de multiples Facteurs de Transcription (FT), parmi lesquels SNAI1/2, TWIST1 et ZEB1/2 sont considérés comme des FT majeurs de ce processus. Leurs fonctions ne sont pas entièrement équivalentes [6,7] et différents FT majeurs pourraient prédominer selon le type de cancer, le contexte tissulaire et la cinétique. Dans les OSCC humains et canins, des publications basées sur l'immunohistochimie (IHC) [8–11] ou le RNAseq [4,5,12] ont ainsi suggéré que différents FT pourraient dominer la régulation de la TEM.

Depuis que le RNAseq « tumeur entière » (ou 'bulk') a été développé, il est devenu l'une des technologies les plus utilisées dans la recherche en cancérologie. Une limite du RNAseq 'bulk' est que les tumeurs contiennent des populations cellulaires hétérogènes. Le RNAseq 'bulk' révèle par conséquent un profil d'expression génétique moyenné, un inconvénient majeur qui a été surmonté par de nouvelles technologies telles que le RNAseq 'single-cell' à l'échelle de la cellule unique. Pour les HNSCC, trois jeux de données 'single-cell' ont été publiés à ce jour [12–14], tandis qu'aucun jeu n'est actuellement disponible pour les OSCC canins. En plus de son coût, une difficulté pour réaliser du séquençage 'single-cell' sur des tumeurs canines est le recrutement d'échantillons frais, sur lesquels les technologies actuelles sont basées.

L'objectif de cette étude était d'investiguer la régulation de la TEM par les FT majeurs de la TEM dans les OSCC canins et humains, à travers une analyse comparée de données RNAseq publiques. Dans cet objectif, des jeux de données 'bulk' [4,5,15] et 'single-cell' [12,16] ont été analysés, permettant d'évaluer l'hétérogénéité inter-patient et intra-tumorale respectivement. Par ailleurs, un second aspect de notre projet était de mettre au point une procédure permettant d'isoler des cellules uniques à partir d'échantillons FFPE d'OSCC canins avec l'objectif à long terme de réaliser du RNAseq 'single-cell' à partir d'échantillons FFPE.

Partie I : Revue bibliographique

Avant d'aller plus loin il convient d'abord de définir précisément ce que l'on entend par cavité orale. La cavité orale est délimitée par les lèvres, les joues, le palais dur, le plancher de la bouche, et s'arrête caudalement au début de l'oropharynx. La distinction entre cavité orale et pharynx (naso-, oro- et hypopharynx) est particulièrement pertinente au vu des spécificités des carcinomes épidermoïdes provenant de ces deux régions, aussi bien chez l'Homme que chez le Chien. La distinction de ces deux régions, ainsi que les critères d'attribution à l'une ou l'autre, ne sont cependant pas constants d'une étude à l'autre, ce qui peut compliquer leur interprétation [17].

Des définitions de la cavité orale et de l'oropharynx adaptées à l'oncologie des voies aéro-digestives supérieures sont présentées dans le tableau I, en y associant les sites anatomiques correspondants (tab I). Ces définitions sont adoptées dans un grand nombre de publications incluant celles de l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer) [18] et du consortium INHANCE (INternational Head And Neck Cancer Epidemiology) [1].

Tableau I : Sites anatomiques inclus au sein de la cavité orale et de l'oropharynx

Code ICD - Site anatomique	Sites d'origine des "tumeurs de la cavité orale" (code ICD)	Sites d'origine des "tumeurs oropharyngées" (code ICD)
C00 - Lèvres	Face interne des lèvres (C00.3 à C00.4)	/
C01 et C02 - Langue	Langue à l'exclusion de sa base et des tonsilles linguales (C02.0 à C02.3)	Base de la langue (C01) Tonsilles linguales (C02.4)
C03 - Gencives	Oui	/
C04 - Plancher buccal	Oui	/
C05 - Palais	Palais dur (C05.0)	Palais mou (C05.1) Uvula (C05.2)
C06 - Sites autres ou non spécifié au sein de la cavité orale	Oui	/
C07 - Glandes parotides	/	/
C08 - Glandes salivaires autres ou non spécifié	/	/
C09 - Tonsilles palatines	/	Oui
C10 - Oropharynx	/	Oui
C11 - Nasopharynx	/	/
C12 - Sinus pyriforme	/	/
C13 - Hypopharynx	/	/

ICD = *International Classification of Diseases* [19]

I. Epidémiologie des carcinomes épidermoïdes oraux chez l'Homme et le Chien

A. Données d'épidémiologie générale

Chez l'Homme, les cancers des lèvres et de la cavité orale ont été estimés responsables de 378 000 nouveaux cas et 178 000 décès dans le Monde en 2020 [20], en discrète augmentation par rapport aux estimations des années précédentes [21–23]. Rapporté à la population standard de Segi-Doll, les taux d'incidence annuels standardisés (ASR pour Age-Standardized Rate) étaient respectivement de 6,0 et 2,3 pour 100 000 habitants chez l'homme et la femme en 2020. Cela correspondait à environ 2 % des nouveaux cas de cancers dans le Monde [20].

Une large proportion (plus de 90 %) de ces cancers oraux chez l'Homme sont des carcinomes épidermoïdes [24,25], au point que les termes de « cancer de la cavité orale » et « carcinome épidermoïde de la cavité orale » sont fréquemment utilisés de façon synonyme dans la littérature.

Les données d'incidence récentes dans la population générale canine sont bien plus rares que chez l'Homme, du fait d'une médicalisation moindre, et surtout de la difficulté de regrouper et centraliser les données. Cray et Selmic *et al.* ont récemment calculé un taux d'incidence des tumeurs orales (bénignes ou malignes) de 4,9 pour 1 000 chiens au sein d'une population hospitalière [26]. Ce taux d'incidence élevé ne correspond cependant pas à un taux annuel puisque calculé sur la période 1996-2017. L'estimation d'un taux d'incidence annuel est par ailleurs impossible sans information sur les durées de suivi des chiens. Enfin, étudier une population hospitalière au lieu de la population générale est susceptible de biaiser à la hausse l'incidence de toute maladie. De futures études, ou réanalyses plus poussées des données existantes, sont donc justifiées afin de préciser l'impact actuel des OSCC dans la population canine.

Plus de données sont cependant disponibles quant aux proportions relatives des différents types de cancer chez le Chien. Les OSCC représentent ainsi entre 18 et 28 % des cancers oraux chez le Chien, soit le deuxième cancer oral le plus fréquent derrière le mélanome malin [27–30]. Contrairement à l'Homme où les OSCC dominent largement, plusieurs types histologiques de cancers oraux sont donc retrouvés relativement fréquemment chez le Chien. D'autres cancers oraux retrouvés chez le Chien un peu moins fréquemment que le mélanome malin et l'OSCC incluent le fibrosarcome et l'ostéosarcome [29,30].

B. Facteurs de risque internes

B.1. Age

Comme pour la majorité des cancers, le risque de développer un OSCC augmente avec l'âge chez l'Homme et le Chien.

Chez l'Homme, les HNSCC et OSCC sont principalement diagnostiqués entre 50 et 70 ans, en particulier chez les patients fumeurs-buveurs (FB) qui constituent la majorité des cas dans les pays occidentaux [25,31,32]. Par comparaison, les OSCC survenant chez des individus non fumeurs-non buveurs (NFNB) sont plus susceptibles d'apparaître à des âges « extrêmes », c'est-

à-dire chez le patient jeune ou d'âge moyen (moins de 50 ans) ou le patient de plus de 65-70 ans. Plus précisément, deux sous-groupes majeurs de patients NFNB sont les femmes jeunes avec un SCC lingual [32–34], et les femmes de plus de 70 ans avec un SCC gingival ou touchant la muqueuse buccale [32,35].

Chez le Chien, les OSCC surviennent également principalement chez l'animal âgé, avec un âge moyen au diagnostic entre 8 et 14 ans selon les études [3,26,27,29,30,36]. La tranche d'âge touchée est cependant très large, avec notamment la survenue occasionnelle d'OSCC chez le très jeune chien (moins de 12 mois) [37–39].

B.2. Sexe

Une fois corrigées les différences de pyramides d'âges entre hommes et femmes, le ratio homme : femme des taux d'incidence pour les cancers de la cavité orale était de 2 : 1 en 2012 dans le Monde [40]. Ce ratio a diminué au cours des dernières décennies, ce qui semble au moins partiellement lié à l'exposition croissante des femmes à certains facteurs de risque comme le tabac et l'alcool [41].

Chez le Chien, une majorité d'études ne met pas en évidence de prédisposition sexuelle pour les OSCC [3,27,29,30], avec quelques études rapportant une surreprésentation des femelles au sein des OSCC en général [2], ou au sein des SCC linguaux plus spécifiquement [42].

B.3. Populations et génétique

Chez l'Homme, l'incidence des OSCC est nettement plus importante en Asie du Sud (Inde, Sri Lanka, *etc.*) et dans certaines îles du Pacifique (Papouasie-Nouvelle-Guinée) où les OSCC représentent le cancer le plus fréquent chez les individus masculins [20,40]. La région de l'Asie du Sud en particulier regroupait 40,9 % des nouveaux cas de cancer de la cavité orale dans le Monde en 2012 [40]. Des différences d'environnement et d'exposition aux carcinogènes entre populations semblent cependant suffisantes pour expliquer ces disparités (voir sous-partie « I.C. Facteurs de risque environnementaux »), sans pouvoir exclure une contribution génétique. A l'échelle de l'individu, un historique familial de HNSCC constitue un facteur de risque pour le développement d'un HNSCC [43]. Cela suggère l'existence de prédispositions génétiques au développement de HNSCC, mais pourrait également refléter une exposition commune à des facteurs de risque environnementaux. Par ailleurs, plusieurs polymorphismes de gènes impliqués dans le métabolisme de l'alcool, de la nicotine et dans la réparation de l'ADN ont été associés avec une augmentation du risque d'OSCC (et/ou d'HNSCC en général) [44,45].

Chez le Chien, les études réalisées ne mettent pas en évidence de prédisposition de race [27,29,36] ou divergent quant aux races mises en évidence [2,42]. Ce type d'analyse est rendu difficile par les effectifs souvent limités des études, par opposition avec la grande diversité des races canines. La comparaison à une population de référence robuste est de plus nécessaire pour s'affranchir de la fréquence relative des différentes races. Les races rapportées comme prédisposées incluent le Berger des Shetlands et le Springer Anglais (ou 'English Springer Spaniel') pour les OSCC [2], ainsi que le Samoyède, le Caniche et le Labrador Retriever pour les SCC linguaux [42].

C. Facteurs de risque environnementaux

Chez l'Homme, de nombreuses méta-analyses et jeux de données ont permis d'éclairer considérablement l'importance relative des différents facteurs de risque pour les HNSCC. En particulier la base de données du consortium INHANCE [1,46] comportait fin 2020 35 études cas-témoin regroupant plus de 25 700 patients HNSCC et 37 100 témoins. Cette base de données est plus particulièrement représentative des populations européennes et américaines, 28 études sur les 35 provenant exclusivement d'Europe ou Amérique du Nord.

C.1. Exposition au tabac et à l'alcool

Le tabac est un facteur de risque établi pour les OSCC et les HNSCC en général. La consommation de cigarettes, par comparaison aux non-fumeurs, est ainsi associée à un Odds-Ratio (OR) de 2,13 (intervalle de confiance à 95 % (IC95) : 1,53–2,98) pour le développement d'un HNSCC [47]. Le risque additionnel est évident même pour une consommation faible (une à quelques cigarettes par jour) [48,49], et augmente avec la durée et fréquence de consommation [47,49], la durée étant l'élément le plus important [50]. La cigarette n'est pas seule en cause et les autres formes de tabac fumé (pipe et cigare) [48], ainsi que le tabac prisé ou chiqué [51,52] sont également associés à une augmentation du risque d'OSCC. Chez les individus ne consommant pas de tabac, le tabagisme passif de longue durée (plus de 15 ans) a enfin été associé à une augmentation du risque de HNSCC (OR = 1,55-1,6 selon le type d'exposition). Ces effets concernent cependant essentiellement le pharynx et le larynx, les résultats pour la cavité orale étant non concluants [53].

Indépendamment du tabac, la consommation d'alcool est également un facteur de risque pour les OSCC et les HNSCC en général. Contrairement au tabac, l'augmentation du risque n'est évidente que pour des consommations importantes (pour plus de 3 verres/jour par comparaison aux non-buveurs, OR = 2,04 ; IC95 : 1,29–3,21) [47]. Les populations Asiatiques semblent être une exception, avec une augmentation du risque mise en évidence même à des niveaux d'exposition faibles (moins de 12,5g/jour) [54]. Cette observation pourrait s'expliquer par l'importante prévalence des mutations impliquées dans le métabolisme de l'éthanol et de l'acétaldéhyde au sein des populations Asiatiques [54–56]. Enfin le risque additionnel de la consommation d'alcool augmente avec la durée et fréquence de consommation [54,57], la fréquence étant l'élément le plus important [50].

Alcool et tabac présentent de plus des effets synergiques sur l'augmentation du risque d'OSCC. Hashibe *et al.* ont ainsi observé que le risque additionnel observé chez les individus fumeurs et buveurs était supérieur à la somme des effets attendus pour les consommations isolées d'alcool et de tabac [58]. La même étude réalisée sur 27 389 individus Européens ou Américains a estimé que 64 % des cas d'OSCC, ou 72 % des cas d'HNSCC, pouvaient être attribués à la consommation d'alcool et/ou de tabac dans les populations étudiées [58].

Chez le Chien, les arguments épidémiologiques manquent pour une influence du tabagisme passif sur la survenue de cancers des voies aérodigestives supérieures [59,60] ou du poumon [61,62], les publications rapportant majoritairement une absence d'association significative entre cancer et exposition à la fumée de cigarette. Les chiens peuvent cependant inhaler la fumée de cigarette, ce qui peut être évalué par la détection de la nicotine ou de ses métabolites sur les poils et dans l'urine des chiens [63–65]. Par ailleurs, des lésions cellulaires et modifications inflammatoires des voies aérodigestives ont été mises en évidence chez des

chiens exposés à la fumée de cigarette [66,67]. Il est donc possible que les chiens ne soient pas exposés à la fumée de cigarette à des niveaux suffisants et/ou suffisamment longtemps pour que cela constitue un risque significatif de HNSCC, sans pouvoir exclure un risque faible non mis en évidence par les études réalisées jusque-là.

C.2. Consommation de chique de Bétel en Asie du Sud et du Sud-Est

La chique de Bétel est une préparation à mâcher très utilisée en Asie du Sud (Inde, Pakistan, Bangladesh, *etc.*) et Asie du Sud-Est (Taiwan, Papouasie-Nouvelle-Guinée, *etc.*). Elle comprend habituellement des noix d'arec (ou noix de bétel) tranchées, du citron vert et des feuilles de bétel, auxquelles viennent éventuellement s'ajouter du tabac [52]. Comme on l'a vu dans la sous-partie précédente, la mastication de tabac est associée à un risque augmenté d'OSCC [51,52]. Même lorsqu'elle n'incorpore pas de tabac, la consommation de chique de Bétel est elle-même associée à une augmentation du risque d'OSCC (OR = 2,82 ; IC₉₅ : 2.35-3,40) [52]. Ce risque additionnel augmente avec la durée et fréquence de consommation, ainsi que lorsque du tabac est ajouté à la préparation [68]. La consommation fréquente de la chique de Bétel semble être le principal facteur expliquant l'incidence élevée des OSCC dans les pays Asiatiques concernés [20].

C.3. Infection par les Papillomavirus

Chez l'Homme, l'infection de la cavité orale et du pharynx par des Papillomavirus Humains (HPV) sexuellement transmissibles est un facteur de risque majeur pour les carcinomes épidermoïdes oropharyngés (OPSCC) [69,70]. HPV-16, ainsi que HPV-18 dans une moindre mesure, sont les sous-types les plus impliqués [71] bien que de nombreux autres HPV « à haut risque » soient décrits [72]. Le rôle de l'infection par HPV dans la survenue des OSCC est cependant moins clair.

La séropositivité vis-à-vis d'HPV n'est pas significativement associée à la survenue d'OSCC, contrairement aux OPSCC [69]. Certains comportements sexuels dont la pratique constitue un facteur de risque pour les SCC oropharyngés ne sont pas non plus significativement associés à la survenue d'OSCC [73]. A l'échelle de la tumeur, les HPV à haut risque sont identifiés (sous forme d'ADN/ARN viral ou de protéines induites) bien moins fréquemment dans les OSCC que les OPSCC [69,71,74–78]. Par ailleurs HPV peut infecter la cavité orale (ou l'oropharynx) de manière concomitante, sans être impliqué dans l'oncogenèse [79]. Selon la méthodologie utilisée pour détecter HPV (tab II), les proportions estimées de tumeurs « HPV-positives » surestiment donc plus ou moins la proportion de tumeurs pour lesquelles HPV est effectivement impliqué dans l'oncogenèse.

En se basant sur l'expression des oncogènes viraux E6 et E7, il est ainsi estimé que la fraction étiologique des HPV à haut risque (ou proportion de cas dont la cause est attribuable à) est comprise entre 2 et 6 % pour les OSCC [77,78,80,81] contre 30 à 40 % environ pour les OPSCC [71,80]. Ces fractions étiologiques connaissent cependant des variations considérables entre régions du Monde, selon l'importance relative des différents facteurs de risque [71,80,82].

Tableau II : Principales techniques utilisées pour identifier HPV dans les lésions d’OSCC ou OPSCC

Test	Cible/utilisation	Interprétation
(q)PCR	ADN de HPV	La PCR conventionnelle est très sensible, mais ne traduit que l’infection par HPV (donc peu spécifique d’un rôle dans l’oncogenèse) [83] La qPCR peut éventuellement être plus indicative d’un rôle oncogénique si le nombre de copies est élevé
(q)RT-PCR	ARNm de E6/E7	L’expression des protéines virales E6/E7 est directement impliquée dans le processus d’oncogenèse, d’où une meilleure spécificité vis-à-vis du rôle d’HPV dans l’oncogenèse [83]
IHC	Protéine p16 au sein des tissus	La définition d’un marquage « p16-positif » doit être considérée avec attention [79,84] Pour les OPSCC, bonne sensibilité et spécificité modérée vis-à-vis du rôle d’HPV dans l’oncogenèse [84] Pour les OSCC, le test est difficilement interprétable au vu de la mauvaise valeur prédictive positive [77]
Hybridation <i>in situ</i>	ARNm de E6/E7 au sein des tissus	Très bonne spécificité vis-à-vis du rôle d’HPV dans l’oncogenèse [83]

Les techniques évaluant le niveau d’expression des oncogènes viraux E6 et E7 sont considérées comme le gold-standard pour évaluer le rôle d’HPV dans l’oncogenèse de la tumeur étudiée [81,84]. *qPCR* = *quantitative PCR* ; *qRT-PCR* = *quantitative Reverse Transcriptase PCR* ; *IHC* = *Immunohistochimie*.

Chez le Chien, une vingtaine de Papillomavirus Canins (CPV) sont connus à ce jour. La majorité ont été identifiés au cours des dix dernières années, et il est très probable que notre connaissance de ces virus canins soit amenée à évoluer considérablement. Plusieurs types de CPV sont associés à des tumeurs bénignes ou malignes, cutanées ou au sein de la cavité orale chez le Chien. Le rôle causal de ces virus dans la carcinogenèse n’est cependant pas toujours formellement démontré, et peu de données sont disponibles quant à leur impact réel dans la population canine.

Parmi les CPV retrouvés au niveau des voies aéro-digestives supérieures, CPV-1 (anciennement COPV pour Canine Oral Papillomavirus) est une cause fréquente de Papillomatose orale chez le jeune chien ou l’animal immunodéprimé [85]. Cette affection se traduit par l’apparition de multiples tumeurs bénignes exophytiques de type papillome au niveau de la muqueuse orale, régressant spontanément dans la majorité des cas. CPV-13 a également été rapporté comme potentiellement impliqué dans des cas de Papillomatose orale [86].

Pour ce qui est des carcinomes épidermoïdes, l’ADN ou les antigènes de CPV ne sont détectés qu’occasionnellement dans les OSCC [87–93]. Une limite possible de ces approches est que tous les types de CPV ne sont pas forcément reconnus selon les amorces ou anticorps utilisés [85,92], ce qui pourrait sous-estimer la prévalence réelle des CPV au sein des OSCC. Même si les proportions observées étaient supérieures, les méthodes utilisées ne permettent cependant que d’identifier la présence concomitante de CPV, qui peut également être retrouvé dans la cavité orale de chiens sains [94]. Par ailleurs, les études publiées à ce jour n’incluent pas de groupe témoin (muqueuse orale de chiens sans SCC) qui permettrait éventuellement d’identifier un sur-risque de SCC associé à l’infection orale par CPV et d’estimer la fraction

étiologique correspondante. De manière similaire, la surexpression de p16 dans les OSCC canins n'est rapportée qu'occasionnellement [90,91,95], et n'implique pas nécessairement la présence de CPV ou son rôle dans l'oncogenèse [91]. Quelques cas et séries de cas utilisant une combinaison de méthodes diagnostiques (qPCR, histologie, IHC, hybridation *in situ* ...), couplés aux connaissances sur la biologie des papillomavirus, démontrent tout de même de manière convaincante que certains types de CPV (dont CPV-1 et 17) sont susceptibles d'induire ou favoriser l'apparition d'OSCC chez le Chien [95–97].

Chez l'Homme, l'infection orale par des HPV à haut risque (dont HPV-16) est un facteur de risque mineur pour les carcinomes épidermoïdes oraux. Elle est par contre un facteur de risque majeur pour les carcinomes épidermoïdes oropharyngés.

Chez le Chien, certains CPV sont susceptibles d'induire ou favoriser la survenue de carcinomes épidermoïdes oraux. La fraction étiologique correspondante ne peut être estimée avec les études publiées à ce jour, mais semble limitée.

C.4. Exposition aux UV

L'exposition aux UV favorise la survenue de carcinomes épidermoïdes sur la face externe de la lèvre chez l'Homme et le Chien, et explique l'incidence élevée de cette localisation chez certaines populations blanches à forte exposition solaire (dont Australiens) [40].

Au vu des facteurs de risque spécifiques associés à ces différentes localisations, la tendance actuelle est cependant de ne pas inclure la face externe de la lèvre (code ICD C00.1 et C00.2) dans la définition de la cavité orale utilisée pour l'étude des cancers oraux (tab I).

C.5. Déficits et désordres immunitaires

L'incidence de nombreux types de cancer est augmentée chez les patients avec un déficit immunitaire primaire [98] ou acquis [99,100]. Différents mécanismes sont susceptibles de participer à l'oncogenèse selon le type de déficit immunitaire et de cancer. Ils peuvent être regroupés en trois catégories principales : (1) les anomalies moléculaires à l'origine du déficit immunitaire primaire favorisent directement la transformation néoplasique des cellules concernées ; (2) le déficit immunitaire facilite l'infection par des pathogènes oncogènes et/ou l'inflammation chronique des tissus [100,101] ; (3) le déficit immunitaire entraîne un défaut d'immunosurveillance, c'est-à-dire que le système immunitaire ne remplit pas son rôle d'élimination des cellules acquérant des caractéristiques néoplasiques [102–104].

Plus spécifiquement, l'incidence des carcinomes épidermoïdes oraux et pharyngés est augmentée chez les patients immunodéprimés, comme les transplantés ou malades du SIDA [99,100]. Ceci pourrait s'expliquer notamment par une plus grande susceptibilité à l'infection par HPV, sans exclure un défaut d'immunosurveillance. Un cas spécifique correspond aux patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse et traités pour une réaction du greffon contre l'hôte (RGH) chronique. Ces patients sont particulièrement à risque de développer un carcinome épidermoïde oral ou cutané entre autres tumeurs secondaires [105–107]. Le mécanisme est cependant plus complexe que précédemment, et semble notamment impliquer :

(a) l'inflammation et lésion chronique des épithéliums dues à la RGH ; (b) l'immunodépression secondaire au traitement prolongé de la RGH ; (c) un effet carcinogène direct des traitements effectués avant ou après la greffe (irradiation, chimiothérapie cytotoxique, azathioprine, cyclosporine ...) [105,108]. L'immunodépression en particulier pourrait faciliter l'infection cutanée par HPV et la survenue de carcinomes cutanés [109]. Pour la cavité orale cependant, l'ADN d'HPV n'a pas été retrouvé dans une série de cinq patients avec RGH chronique et OSCC secondaire [107].

Bien que la survenue des OSCC chez le chien immunodéprimé n'ait pas été spécifiquement étudiée, plusieurs publications rapportent la survenue de carcinomes épidermoïdes cutanés, chez un chien ayant reçu de la prednisone et cyclosporine de manière prolongée [110], ainsi que dans une série de chiens avec un déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (X-SCID) [111]. Dans les deux cas les carcinomes étaient multiples et révélaient la présence de papillomavirus, suggérant l'importance de l'immunodépression et susceptibilité à l'infection dans la survenue de ces carcinomes. Dans le cas du chien recevant prednisone et cyclosporine, il a été suggéré que la cyclosporine puisse favoriser la carcinogenèse au-delà de ses effets immunosuppresseurs en potentialisant les effets néfastes des UV sur la peau [112,113]. Les résultats en médecine humaine sont cependant contradictoires quant à si la cyclosporine augmente plus le risque de carcinome cutané que d'autres molécules immunosuppressives [114], ces dernières pouvant elle-même ne pas avoir qu'un rôle strictement immunosuppresseur.

C.6. Autres facteurs de risque environnementaux chez l'Homme

Bien que non rapportés chez le Chien, d'autres facteurs de risque pour les OSCC ont été mis en évidence chez l'Homme au cours des dernières années. Ils comprennent l'alimentation [1,46], une pauvre hygiène de la cavité orale [115], la taille [116], l'indice de masse corporelle [117–119], une faible activité physique [120], l'éducation et statut socio-économique [121], ou encore l'occupation professionnelle [122].

Leur impact semble moindre en comparaison des facteurs de risque majeurs que sont le tabac et l'alcool, et leur mécanisme d'action nécessite d'être approfondi pour certains d'entre eux. En particulier la présence de facteurs de confusion ou d'interactions entre différents facteurs de risques potentiels n'a pas toujours été exclue. Un bas niveau d'éducation par exemple, est associé à un risque additionnel important pour les HNSCC (OR = 2,5 ; IC₉₅ : 2,02–3,09) en analyse univariée. Il a cependant été estimé que 77 % de ce risque additionnel s'expliquait par les facteurs de confusion que sont le tabac (fumé ou non), l'alcool et le régime alimentaire [121]. Une proportion supérieure est par ailleurs susceptible d'être expliquée par d'autres facteurs de confusion non explorés [121].

Chez l'Homme, les facteurs de risques environnementaux majeurs pour les OSCC sont la consommation de tabac (sous toutes ses formes), la consommation d'alcool, et la mastication de chique de Bétel en Asie.

Chez le Chien, les facteurs de risque environnementaux et leur importance relative sont peu connus. Ils sont susceptibles d'inclure l'infection orale par certains CPV, l'immunodépression, voire l'exposition à la fumée de cigarette.

II. Pathogénie et comportement biologique : localisation, aspect, invasion locale, métastases et stade clinique

A. Localisation des tumeurs primaires

Les OSCC chez l'Homme et le Chien peuvent survenir au niveau de l'ensemble des muqueuses de la cavité orale, telle que définie dans le tableau I : sur la face interne des lèvres (codes ICD C00.3-4), les 2/3 antérieurs de la langue (C02), le plancher buccal (C03), les gencives (C04), le palais dur (C05) et sur les surfaces muqueuses autres de la cavité orale (C06 : vestibule buccal, joues, zone rétromolaire). Ces différentes localisations ne sont cependant pas aussi fréquentes les unes que les autres.

Chez l'Homme, les OSCC surviennent notamment au niveau de la langue, du plancher buccal et des gencives mandibulaires [123–127]. Ces localisations préférentielles varient subtilement selon la population étudiée. Le plancher de la bouche est une localisation relativement plus fréquente chez les individus fumeurs-buveurs (FB), tandis que les localisations linguales et gingivales maxillaires le sont plus chez les individus non-fumeurs et non-buveurs (NFNB) [32,34,35,123]. Ces observations pourraient traduire une exposition supérieure des muqueuses en position déclive aux substances carcinogènes contenues dans l'alcool et le tabac [128]. Enfin les femmes semblent plus à risque d'avoir un OSCC lingual (notamment la femme jeune) ou gingival (notamment la femme de plus de 70 ans), indépendamment du statut NFNB [32,123,127].

Chez le Chien, les OSCC surviennent notamment au niveau des gencives (plus de 50 % des cas) ou de la langue [2,3,30]. Une publication récente se distingue en rapportant une proportion relativement élevée (23 % des OSCC) au niveau du plancher buccal, soit discrètement plus qu'au niveau de la langue (19 % des OSCC) dans la même série de cas [30].

B. Aspect macroscopique des lésions primaires et invasion locale

B.1. Aspect macroscopique des lésions pré-cancéreuses chez l'Homme

Chez l'Homme, une lésion pré-cancéreuse peut éventuellement être observée avant l'apparition du carcinome épidermoïde *per se*. Une lésion pré-cancéreuse se définit par un tissu morphologiquement altéré et plus à risque de transformation maligne que le tissu normal. Au sein de la cavité orale, il s'agit majoritairement des leucoplasies et dans une moindre mesure des érythroplasies [129,130]. Ces lésions correspondent respectivement à des plages ou plaques blanches (leucoplasie) ou rouges (érythroplasie), non détachables (fig 1), pour lesquelles les autres causes de coloration de la muqueuse orale ont été exclues [129]. Elles peuvent être divisées en de nombreux sous-types associés à différents risques de transformation maligne chez l'Homme [130].

A notre connaissance, les lésions pré-malignes de la cavité orale ne sont pas décrites dans la littérature scientifique chez le Chien.



Figure 1 : Cas de leucoplasie linguale chez l'Homme (D'après le Dr. Franceschini [131])

B.2. Aspect macroscopique des OSCC et invasion locale

L'aspect macroscopique des OSCC est variable chez l'Homme et le Chien, pouvant aller d'une forme exophytique bourgeonnante et ferme à une forme essentiellement térébrante (fig 2). Certains OSCC peuvent simplement se manifester par un ulcère chronique [132]. Une majorité d'OSCC est cependant macroscopiquement prolifératif chez le Chien (78,1 % dans une série de Nemeč *et al.* [2]). Quel que soit l'aspect global, les ulcérations de surface sont fréquentes [2,133] et peuvent se compliquer de saignements et infections.

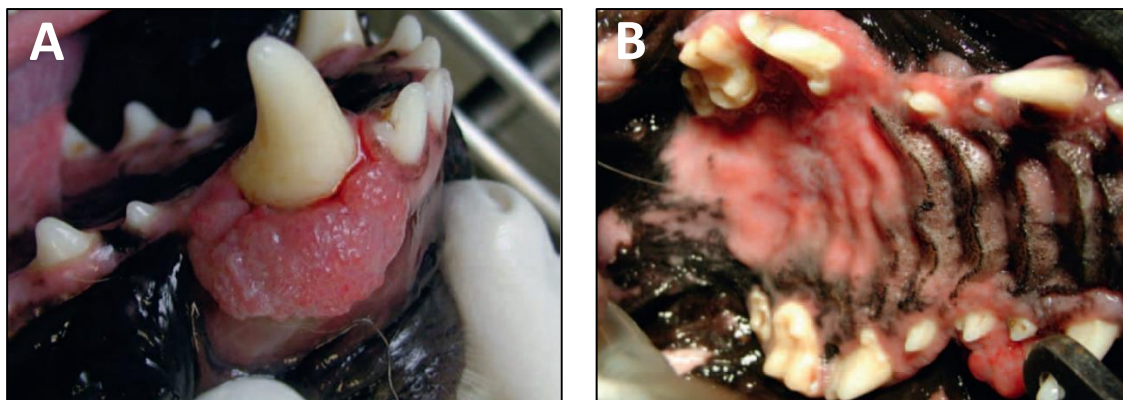


Figure 2 : Les carcinomes épidermoïdes oraux adoptent des aspects macroscopiques variés (D'après le Dr. Vét. Verhaert [134]). (A) OSCC canin exophytique. (B) OSCC canin térébrant ; absence de masse visible mais dépigmentation, ulcérations et perte de structure du palais dur.

Que ce soit chez l'Homme ou le Chien, les OSCC sont très invasifs localement, avec des conséquences variables selon la localisation primaire [133,135]. Pour les OSCC linguaux, l'invasion se fait d'abord dans les muscles de la langue. Pour les autres localisations préférentielles (plancher de la bouche, gencives, palais dur ...) une invasion de l'os sous-jacent est fréquente chez l'Homme et le Chien [136,137]. Dans ce cas, l'examen clinique pourra mettre en évidence des dents instables ou manquantes. L'ensemble des tissus mous adjacents aux lésions sont susceptibles d'être envahis, à l'origine de possibles déformations de la face et/ou de signes neurologiques .

C. Comportement métastatique

Chez l'Homme, les métastases loco-régionales aux nœuds lymphatiques (NLs) de la tête et du cou sont fréquentes [135]. L'examen histopathologique met ainsi en évidence une infiltration néoplasique d'un ou plusieurs NLs chez environ 20 à 30 % des patients avec OSCC au moment de la prise en charge initiale [125,126,138,139]. Les métastases à distance sont en revanche peu fréquentes, présentes chez environ 2 à 4 % des patients [138,140,141]. Les sites les plus concernés par le développement de métastases sont dans l'ordre les poumons, les os et le foie [142]. De nombreux autres sites sont susceptibles d'être touchés moins fréquemment (cerveau, peau, tissus mous, NLs non drainants, péritoine, *etc.*) [140,142].

Chez le Chien, les métastases loco-régionales et à distance d'OSCC sont peu fréquentes. Elles sont respectivement rapportées dans 5 à 23 % des cas pour les métastases loco-régionales, et dans 3 à 36 % des cas pour les métastases à distance [133,143,144]. Les métastases à distance sont principalement pulmonaires, bien que des métastases osseuses [145], hépatiques, rénales et ganglionnaires [146] soient également rapportées. Selon les examens réalisés au cours du bilan d'extension, il est possible que la prévalence des métastases loco-régionales soit sous-estimée dans certaines publications chez le Chien. A titre d'exemple, les NLs mandibulaires sont parfois les seuls évalués [147], ce qui s'explique par la mauvaise accessibilité des autres NLs drainants. Or des métastases loco-régionales peuvent être présentes sans affecter les NLs mandibulaires [148–150]. Les examens d'imagerie tomodensitométriques, par résonance magnétique ou échographiques peuvent participer à estimer le statut des nœuds lymphatiques profonds en préopératoire [3]. En cas de métastases loco-régionales, une proportion élevée des cas est par ailleurs susceptibles de présenter des métastases controlatérales, y compris en cas de tumeur latéralisée de la cavité orale [149,151].

Aussi bien chez l'Homme que chez le Chien, ce comportement métastatique des OSCC est à différencier de celui des autres carcinomes épidermoïdes tête et cou. Dans l'oropharynx en particulier les carcinomes épidermoïdes survenant au niveau des tonsilles (palatines ou linguales) métastasent plus fréquemment et précocement, l'adénopathie cervicale pouvant constituer un signe d'appel [133,135].

D. Classification en stades cliniques des cancers de la cavité orale

La classification en stades cliniques consiste à regrouper les patients ou animaux malades en groupes permettant de prédire leur survie ou évolution clinique. Groome *et al.* ont défini en 2001 quatre qualités devant être possédées par une méthode de classification idéale [152] :

1. Les individus au sein d'un même groupe (ou stade) ont des taux de survie similaires.
2. Les groupes diffèrent entre eux en termes de composition et taux de survie.
3. Cela confère à la classification un pouvoir prédictif vis-à-vis d'un ou plusieurs critères d'évaluation (survie totale, survie sans récurrence ...).
4. Les groupes sont équilibrés, ils comportent des nombres similaires d'individus.

Un critère que l'on pourrait ajouter est la (relative) simplicité d'utilisation pour le clinicien, qui est nécessaire à la pertinence clinique de la classification.

Une des méthodes de classification les plus répandues est la classification TNM de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC). Historiquement basée sur des critères « anatomiques » au niveau des trois sites que sont la tumeur primaire (T), les nœuds lymphatiques drainants (N)

et les métastases à distance (M), cette classification inclut progressivement d'autres types de critères selon l'avancée des connaissances. Le statut « p16-positif » en IHC des carcinomes épidermoïdes oropharyngés a ainsi récemment été pris en compte pour la classification des patients avec ce type de cancer [153], afin de refléter le meilleur pronostic qui leur est associé.

Pour la cavité orale chez l'Homme, la classification TNM de l'UICC a connu une mise à jour significative avec sa 8^{ème} édition en 2017 [18], suivie de corrections mineures en 2020 [154]. Par souci de clarté et pour l'interprétation des publications selon leur date de parution, les trois dernières classifications de l'UICC ont été synthétisées dans le tableau III, tandis que l'attribution du stade correspondant peut être trouvée dans le tableau IV. Une conséquence intéressante de ces modifications, mais source d'interrogations, est qu'il n'est pas toujours possible d'attribuer un stade définitif avant résection chirurgicale et examen histopathologique. La profondeur d'invasion maximale sous la lame basale (DOI, 'Depth of Invasion') n'a en effet démontré son importance pronostique que lorsque déterminée via examen histopathologique [155]. Le nouveau critère d'envahissement extra-capsulaire d'un nœud lymphatique (ENE, 'Extra-Nodal Extension') a également été démontré comme pronostic lorsque déterminé par histopathologie [156]. Il peut cependant être estimé cliniquement via l'adhérence du nœud lymphatique aux structures adjacentes, ou via la présence de signes neurologiques traduisant l'atteinte d'un nerf adjacent. Les études réalisées depuis sur des cohortes de patients avec OSCC semblent confirmer une amélioration du caractère pronostic de la classification avec cette 8^{ème} édition [157,158].

Tableau III : Classification TNM de l'UICC des cancers de la cavité orale chez l'Homme [18]

UICC 7 ^{ème} édition (2009)		UICC 8 ^{ème} édition (2017) (Corrections, 2020)	
T1	GD ≤ 2cm	GD ≤ 2cm <u>ET</u> DOI ≤ 5mm	
T2	2 < GD ≤ 4cm	2cm < GD ≤ 4cm <u>ET</u> DOI ≤ 10mm <u>ET/OU</u> 5 < DOI ≤ 10mm	
T3	GD > 4cm	GD > 4cm <u>ET/OU</u> DOI > 10mm	GD > 4cm <u>OU</u> DOI > 10mm
T4a	Invasion : corticale osseuse, sinus maxillaire, peau de la face, ou un muscle profond extrinsèque de la langue	Invasion : corticale osseuse, sinus maxillaire ou peau de la face	[GD > 4cm <u>ET</u> DOI > 10mm] <u>ET/OU</u> invasion telle que décrite en 2017
T4b	Invasion : espace de mastication, lames du processus ptérygoïde, base du crâne ou recouvrement de la carotide interne	“	
N0	Aucun signe de métastase ganglionnaire loco-régionale	“	
N1	Un seul NL ipsilatéral, GD ≤ 3cm	Un seul NL ipsilatéral, GD ≤ 3cm <u>ET</u> ENE-	
N2a	Un seul NL ipsilatéral, 3 < GD ≤ 6cm	Un seul NL ipsilatéral, 3 < GD ≤ 6cm <u>ET</u> ENE-	
N2b	plusieurs NL ipsilatéraux, GD ≤ 6cm	plusieurs NL ipsilatéraux, GD ≤ 6cm <u>ET</u> ENE-	
N2c	Bilatéral et/ou controlatéral, GD ≤ 6cm	N Bilatéral et/ou controlatéral, GD ≤ 6cm <u>ET</u> ENE-	
N3	Au moins un NL avec GD > 6cm	N3a : Au moins un NL de GD > 6cm <u>ET</u> ENE- N3b : ENE+ pour au moins un NL	
M0	Aucun signe de métastase à distance	“	
M1	Métastase à distance	“	

DOI = Depth of Invasion, i.e. profondeur maximale d'invasion sous la lame basale ; ENE = Extra-Nodal Extension, i.e. invasion extra-capsulaire ; GD = Greater Diameter, i.e. plus grand diamètre ; NL = Nœud Lymphatique ; “ = définition identique à celle de l'édition précédente.

Tableau IV : Attribution du stade clinique chez l'Homme, selon la classification TNM de l'UICC [18]

	T	N	M
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1	N0	M0
Stade II	T2	N0	M0
Stade III	T3 T1/T2/T3	N0 N1	M0
Stade IVa	T4a T1/T2/T3/T4a	N0/N1 N2	M0
Stade IVb	tout T4b	N3 tout	M0
Stade IVc	Tout	Tout	M1

Tis = carcinome in situ.

Chez le Chien la classification la plus répandue pour les cancers de la cavité orale est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) établie en 1980 (tab V et VI) [159].

Tableau V : Classification TNM de l'OMS des cancers oraux chez le Chien [159]

T1	GD ≤ 2cm	T1a : Sans invasion osseuse T1b : Avec invasion osseuse
T2	2 < GD ≤ 4cm	T2a : Sans invasion osseuse T2b : Avec invasion osseuse
T3	GD > 4cm	T3a : Sans invasion osseuse T3b : Avec invasion osseuse
N0	Aucun signe de métastase ganglionnaire loco-régionale	
N1	Un ou plusieurs NLs ipsilatéraux de taille augmentés mais mobiles	N1a/N1(-) : Histologie négative N1b/N1(+) : Histologie positive
N2	Un ou plusieurs NLs bilatéraux ou controlatéraux de taille augmentée mais mobiles	N2a/N2(-) : Histologie négative N2b/N2(+) : Histologie positive
N3	Un ou plusieurs NLs adhérents aux structures adjacentes	
M0	Aucun signe de métastase à distance	
M1	Métastase à distance	

GD = Greater Diameter, plus grand diamètre d'une tumeur primaire ; NL = Nœud Lymphatique.

Tableau VI : Attribution du stade clinique chez le Chien, selon la classification TNM de l'OMS [159]

	T	N	M
Stade I	T1a	N0/N1a/N2a	M0
Stade II	T2a	N0/N1a/N2a	M0
Stade III	T1b/T2b/T3	N0/N1a/N2a	M0
	Tout	N1b	
Stade IV	Tout	N2b/N3	M0
		Tout	M1

III. Apports de l'histologie et immunohistochimie au diagnostic et au pronostic

L'examen histologique, réalisé sur biopsie ou pièce d'exérèse, permet d'apporter plusieurs informations essentielles au diagnostic et à la prise en charge thérapeutique.

A. L'histologie, méthode de référence pour le diagnostic de certitude

L'examen histologique permet en premier lieu d'établir le diagnostic de certitude de carcinome épidermoïde, en mettant en évidence ses caractéristiques histologiques principales : différenciation épithéliale et invasion [135].

La différenciation épithéliale est présente à un degré variable selon la tumeur, et correspond notamment à la présence de kératinisation (avec formation fréquente de perles cornées dans les OSCC bien différenciés) et/ou de ponts intercellulaires (fig 3). Dans les OSCC peu différenciés – minoritaires chez l'Homme et le Chien [2,135] – l'absence de différenciation épithéliale évidente peut rendre l'immunohistochimie (IHC) nécessaire pour le diagnostic de certitude. Les marqueurs pouvant être utilisés incluent les cytokératines AE1/AE3 et CK5/6, le facteur de transcription p63, ainsi que son isoforme p40 [2,135].

Le caractère invasif se manifeste histologiquement par une interruption de la membrane basale de l'épithélium, et la propagation de cellules néoplasiques dans le tissu sous-jacent. Des cellules néoplasiques peuvent éventuellement être visualisées au sein des vaisseaux sanguins ou lymphatiques, ou encore en péri-nerveux [135].

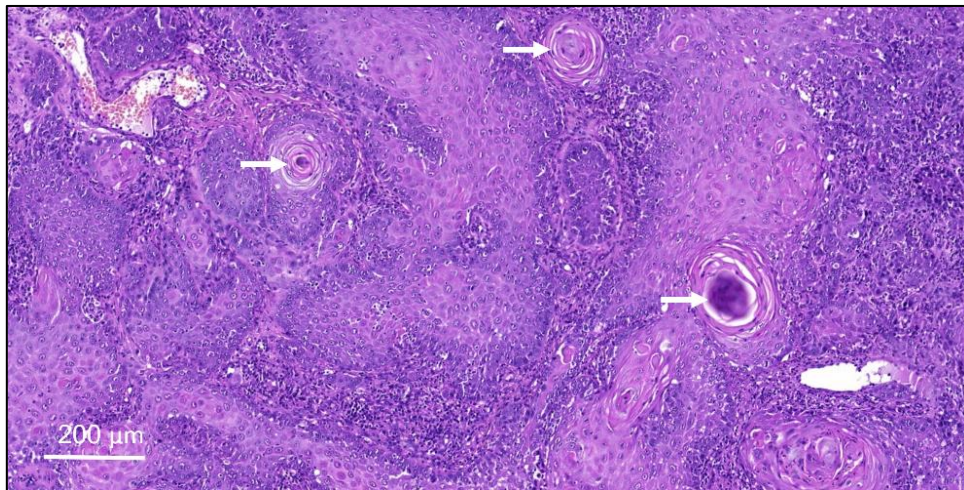


Figure 3 : Coupe histologique d'un carcinome épidermoïde lingual canin, de sous-type histologique 'conventionnel' et bien différencié. Plusieurs perles cornées peuvent être visualisées (flèches blanches). Coloration Hémalun-Eosine, échelle = 200 µm. Source : Queffeuou Alexis.

L'examen histologique permet également de classifier les échantillons en différents sous-types histologiques, précisant ainsi le type de carcinome épidermoïde. Chez l'Homme comme chez le Chien, le sous-type histologique majoritaire au niveau de la muqueuse orale est le

carcinome épidermoïde conventionnel (cOSCC, ‘conventional OSCC’) [2,3,135,144]. Selon les publications, le sous-type conventionnel représente ainsi de 77 à 99 % des cas d’OSCC canins [2,3,144].

Hormis les OSCC conventionnels, la classification de l’OMS chez l’Homme inclut huit sous-types histologiques : basaloïde, à cellules fusiformes (ou sarcomatoïde), adénosquameux, *carcinoma cuniculatum*, verruqueux, lympho-épithélial, papillaire et acantholytique (tab VII) [135,160]. La plupart sont rares au sein de la cavité orale chez l’Homme [160].

Les sous-types basaloïde, à cellules fusiformes, adénosquameux, verruqueux, papillaire et pseudoangiomateux (un variant d’acantholytique) ont été rapportés chez le Chien [2,161,162] et représentent une faible proportion des OSCC dans cette espèce également (tab VII) [2]. Les OSCC papillaires pourraient être relativement plus fréquents chez le très jeune chien (moins de 12 mois) [2,38,39], quoique minoritaires même dans cette sous-population [37]. Par ailleurs ils sont également rapportés chez le chien âgé [2,163].

Tableau VII : Spécificités histologiques des sous-types de carcinome épidermoïde oraux chez l’Homme, et prévalence des lésions analogues chez le Chien

Sous-types chez l’Homme [135]	Spécificités histologiques	Prévalence parmi les OSCC canins (<i>Nemec et al.</i>) [2]
Basaloïde	Prédominance de cellules basophiles de taille petite à moyenne, très rapprochées les unes des autres. Association avec quelques kératinocytes hyalinisés [2]	5,95 %
A cellules fusiformes	Tumeur biphasique, avec un contingent néoplasique fusiforme d’origine épithéliale, et un contingent néoplasique épithélial conventionnel [2]	2,4 %
Adénosquameux	Adénocarcinome et OSCC à proximité [2]	3,6 %
<i>Carcinoma cuniculatum</i>	Bien différencié, avec présence de galeries (<i>cuniculi</i>) proliférant en profondeur [164]	Non observé par <i>Nemec et al.</i>
Verruqueux	Bien différencié, avec pas ou peu de critères cytologiques de malignité [135]	Non observé par <i>Nemec et al.</i>
Lympho-épithélial	Massifs néoplasiques d’architecture variée, entremêlés avec une quantité variable de lymphocytes et plasmocytes [135]	Non observé par <i>Nemec et al.</i>
Papillaire	Croissance majoritairement papillaire. Présence de fins cordons fibro-vasculaires recouverts par des cellules néoplasiques basales immatures à faible index mitotique [2]	5,95 %
Acantholytique	Bien différencié, acantholyse marquée [165]	Non observé par <i>Nemec et al.</i>

OSCC = carcinome épidermoïde de la cavité orale.

B. Intérêts pronostics de l’histologie et immunohistochimie

Une fois le diagnostic de certitude d’OSCC établi, les examens histologique et/ou immunohistochimique permettent d’acquérir des informations susceptibles de prédire le comportement biologique de la tumeur et donc le pronostic du patient ou de l’animal malade.

B.1. Histologie et estimation du pronostic associé aux OSCC conventionnels

Dans le cas des OSCC conventionnels, le grade histologique permet de synthétiser un ensemble d'observations, à visée d'estimation du pronostic. Dans sa quatrième édition du *Classification of Head and Neck Tumors* (2017), l'OMS soutient un système en trois grades pour les cOSCC (bien, moyennement, et peu différencié) selon le degré de différenciation, le pléomorphisme cellulaire et l'activité mitotique [135].

Ce système de grade est cependant mal corrélé avec le pronostic des patients, notamment aux stades précoces d'OSCC [166,167], ce qui est reconnu dans la même publication de l'OMS [135]. De ce fait le système de grade actuel de l'OMS est critiqué [168] et de nombreux autres paramètres histologiques ont été suggéré pour s'ajouter au système actuel. Parmi ceux-ci, la profondeur d'invasion sous la lame basale, l'invasion osseuse et l'extension extra-nodale ont démontré leur caractère pronostic [156,169] et rentrent en jeu dans la 8^{ème} édition de la classification TNM de l'UICC [18] (voir sous-partie « II.D. Classification en stades cliniques »). D'autres paramètres histologiques ayant démontré leur intérêt pronostic chez les patients avec un OSCC incluent le pattern d'invasion (cohésif, non cohésif, dispersé), l'invasion péri-nerveuse ou lympho-vasculaire et bien sûr le statut des marges chirurgicales [170]. La présence de bourgeonnement tumoral et les caractéristiques histologiques du stroma péri-tumoral pourraient également être pertinentes à prendre en compte pour le pronostic des patients [168].

Chez le Chien, le système en trois grades de l'OMS est le plus répandu pour les cOSCC [2,3,144]. Peu de publications ont évalué son caractère prédictif sur le pronostic des chiens atteints d'OSCC, et elles rapportent des résultats contradictoires [144,171]. D'autres paramètres histologiques tels que l'invasion péri-nerveuse ou l'invasion lympho-vasculaire sont fréquemment recherchés dans les OSCC canins également [2,3], mais leur impact sur le pronostic des chiens malades est peu connu.

Chez l'Homme comme chez le Chien, une majorité d'OSCC conventionnels sont de grade OMS moyennement ou bien différencié [2,3,135,144].

B.2. Histologie et estimation du pronostic associé aux autres sous-types histologiques

Pour les autres sous-types histologiques d'OSCC, aucun grade n'est attribué chez l'Homme selon les recommandations de l'OMS [135,170]. Ces sous-types sont cependant associés à des comportements biologiques distincts renseignant sur le pronostic du patient. Les OSCC à cellules fusiformes ou adénosquameux sont ainsi associés à un moins bon pronostic que les cOSCC, tandis que les OSCC verruqueux ou papillaires sont associés à un meilleur pronostic [135,160]. Par ailleurs, les critères histologiques supplémentaires mentionnés précédemment (invasion péri-nerveuse, *etc.*) peuvent là-aussi être pris en compte par le clinicien.

L'approche est similaire pour les autres sous-types histologiques d'OSCC chez le Chien [2,3]. Le manque de données publiées rend cependant difficile l'évaluation du pronostic associé à ces sous-types minoritaires.

B.3. Autres marqueurs en immunohistochimie et estimation du pronostic associé aux carcinomes épidermoïdes oraux

L'immunohistochimie (IHC) permet d'évaluer l'expression et/ou la localisation d'antigènes spécifiques au sein des échantillons analysés. Selon l'antigène ciblé, cette information peut permettre l'identification de sous-populations cellulaires (cas des 'cluster of differentiation' pour l'identification des différentes populations immunitaires notamment).

Chez l'Homme de très nombreux paramètres ont été évalués sur leur capacité à prédire le pronostic des patients avec OSCC et/ou leur réponse au traitement [172,173]. Les niveaux de preuve sont cependant inégaux, souvent affectés négativement par la méthodologie utilisée [174]. Par ailleurs la validation et translation des résultats de la recherche vers l'utilisation clinique est particulièrement lente et difficile pour les biomarqueurs potentiels mis en évidence [172,175]. L'expression de PD-L1 au sein des OSCC (par les cellules néoplasiques et/ou immunitaires) semble par exemple être un critère intéressant pour prédire la réponse aux inhibiteurs des points de contrôle immunitaires chez l'Homme [176], et pourrait constituer un biomarqueur cliniquement pertinent dans un futur proche.

Parmi les paramètres évaluables par IHC, il est important de noter que le statut « HPV-positif » des OSCC n'est pas associé à un meilleur pronostic chez l'Homme, contrairement aux OPSCC [177]. Indépendamment du statut HPV, il a été suggéré par Chung *et al.* que le statut p16 puisse être utilisé comme critère pronostic pour les SCC non oropharyngés, après avoir observé une association entre statut « p16-positif » et meilleur pronostic pour ces tumeurs. Les résultats étaient cependant non-significatifs une fois restreints à la cavité orale, ce qui pourrait refléter un manque de puissance statistique [177].

Chez le Chien, les études publiées à ce jour permettent difficilement de relier le pronostic des animaux malades à un marqueur en IHC, du fait d'effectifs limités et hétérogènes. Mestrinho *et al.* ont rapporté une association négative entre le pourcentage de cellules exprimant PCNA ('Proliferating Cell Nuclear Antigen') et la survie chez 13 chiens avec un OSCC non métastatique [171]. L'impact des facteurs de confusion potentiels dans cette étude (grade, localisation, *etc.*) est cependant difficile à évaluer au vu de l'effectif. Quelques publications rapportent par ailleurs des marqueurs dont l'expression en IHC était associée positivement (p63, VEGF, *etc.*) ou négativement (E-cadhérine, β -caténine, desmogléine, *etc.*) au grade des OSCC canins analysés [178–180], ce qui est cohérent avec les fonctions connues de ces protéines au sein des cancers épithéliaux.

IV. Données transcriptomiques

Les cancers sont fondamentalement des maladies génétiques, secondaires à des altérations génomiques permettant à des cellules de l'organisme d'acquérir les caractéristiques phénotypiques associées au cancer [181]. Se cantonner à une étude génomique n'apporte cependant qu'une vision partielle de ces maladies. En particulier, les cellules néoplasiques sont associées à un transcriptome ou profil d'expression génétique particulier, distinct des cellules normales, et qui ne dépend pas uniquement des altérations génomiques présentes. Le transcriptome des cellules néoplasiques est ainsi dépendant de facteurs intrinsèques à ces cellules (dont le génome de l'individu, les altérations génomiques présentes, et le type cellulaire d'origine) et extrinsèques (selon les caractéristiques du micro-environnement tumoral en particulier). Ce sont autant d'éléments sur lesquels l'étude du transcriptome est susceptible d'apporter des informations.

Parmi les différentes techniques d'étude du transcriptome, le séquençage ARN consiste à accéder à la séquence d'une partie des molécules d'ARN extraites d'un échantillon donné, permettant ainsi l'identification de ces transcrits. Le récent engouement pour cette technologie s'explique par des raisons économiques – l'évolution des technologies permettant une diminution des coûts de séquençage – mais également par sa pertinence pour répondre à certaines questions scientifiques. En effet, le séquençage ARN se distingue d'autres techniques entre autres par sa capacité à générer une vue d'ensemble du transcriptome – au contraire des techniques de RT-PCR ciblées en particulier –, ainsi que par sa capacité à obtenir des données sans nécessité de connaissance préalable des transcrits – au contraire des techniques de puces d'hybridation en particulier [182].

Dans cette sous-partie nous verrons comment le séquençage ARN a contribué à approfondir notre connaissance des OSCC chez le Chien, en relation avec nos connaissances de ces tumeurs chez l'Homme. Nous verrons également comment le développement des technologies de séquençage ARN permet un meilleur accès à l'hétérogénéité intra-tumorale de ces tumeurs.

A. Etude comparée des carcinomes épidermoïdes oraux chez l'Homme et le Chien par séquençage ARN 'bulk'

Les données de séquençage ARN sur les OSCC chez le Chien sont à ce jour limitées, avec seulement deux cohortes ayant fait l'objet de publications entre 2015 et Juin 2021 [4,5]. Dans ces deux cohortes, le séquençage s'est fait à l'échelle 'bulk', c'est-à-dire en séquençant les molécules d'ARN contenues dans un mélange de nombreuses cellules. Des procédures de microdissection ont toutefois permis d'enrichir les échantillons analysés en cellules néoplasiques. Par conséquent, seuls les aspects concernant les cellules néoplasiques, et non le micro-environnement tumoral, seront discutés ici.

Une caractérisation épidémiologique et clinique des échantillons et cas inclus peut être trouvée dans les tableaux VIII (cohorte de Liu *et al.*) et IX (cohorte de Guscetti *et al.*).

Tableau VIII : Informations sur les cas de la cohorte de Liu *et al.* [4]

Identifiant de l'échantillon	Race	Sexe ^a	Age au prélèvement (en années) ^b	Localisation du prélèvement	Histologie
240T	Croisé	Femelle	12	Muqueuse buccale	SCC bien différencié Peu organisé, mais kératinisation centrale
240N				Muqueuse normale adjacente	/
251T	Labrador Retriever	Femelle	10	Gencive mandibulaire	SCC bien différencié Bien organisé, kératinisation centrale, acantholyse
251N				Muqueuse normale adjacente	/
404T	Airedale terrier	Mâle	4	Gencive mandibulaire	SCC bien différencié Organisation et kératinisation hétérogènes selon région
419T	Caniche	Mâle	7,5	Gencive maxillaire	SCC bien différencié Kératinisation proéminente mais désorganisée
465T	Border Collie	Mâle	9	Gencive mandibulaire	SCC bien différencié Bien organisé, kératinisation mineure
465N				Muqueuse normale adjacente	/
938T	Croisé Labrador Retriever	Mâle	11	Langue	SCC bien différencié Kératinisation proéminente mais désorganisée
1172T	Golden Retriever	Femelle	13,5	Langue	SCC bien différencié Présence de perles cornées

Les identifiants des échantillons correspondent à l'identifiant du chien suivi de la lettre « N » (pour échantillon normal) ou « T » (pour échantillon tumoral). ^a Tous les chiens de la cohorte étaient stérilisés au moment de la prise en charge ; ^b âge arrondi au semestre le plus proche ; SCC = carcinome épidermoïde (Squamous cell carcinoma).

Tableau IX : Informations sur les cas de la cohorte de Guscelli *et al.* [5]

Identifiant de l'échantillon	Race	Sexe	Age au prélèvement (en années)	Localisation du prélèvement	Histologie
1T	Bolonka Zwetna	Femelle	5	Gencive	SCC modérément différencié
1N				Muqueuse normale adjacente	/
2T	Colley	Mâle	10	Gencive	SCC modérément différencié
2N				Muqueuse normale adjacente	/
3T	Caniche	Mâle	10	Gencive	SCC modérément différencié
3N				Muqueuse normale adjacente	/
4T	Cocker américain	Mâle	6	Langue	SCC modérément différencié
4N				Muqueuse normale adjacente	/
5T	West Highland White Terrier	Mâle	14	Cavité orale	SCC bien différencié
5N				Muqueuse normale adjacente	/
6T	West Highland White Terrier	Femelle	14	Cavité orale	SCC modérément différencié
6N				Muqueuse normale adjacente	/
7T	Colley à poils longs	Femelle	7	Gencive	SCC mal différencié
7N				Muqueuse normale adjacente	/
8T	West Highland White Terrier	Femelle	15	Gencive	SCC modérément différencié
8N				Muqueuse normale adjacente	/
9T	Cairn Terrier	Mâle	12	Gencive	SCC modérément différencié
9N				Muqueuse normale adjacente	/
10T	n.d.	Mâle	10	Gencive	SCC modérément différencié
10N				Muqueuse normale adjacente	/

Les identifiants des échantillons correspondent à l'identifiant du chien suivi de la lettre « N » (pour échantillon normal) ou « T » (pour échantillon tumoral). n.d. = non déterminé ; SCC = carcinome épidermoïde (Squamous cell carcinoma).

A.1. Le processus de carcinogénèse est associé à des modifications communes des profils d'expression chez le Chien et l'Homme

Dans ces deux études, les auteurs ont pu comparer le transcriptome des échantillons néoplasiques à celui de l'épithélium buccal normal. Dans les deux cohortes, le processus de carcinogénèse était associé à une grande partie de la variation entre les échantillons inclus, permettant ainsi de distinguer clairement les échantillons néoplasiques et normaux par leur profil d'expression global [4,5]. Pour ce qui est de l'étude globale des gènes différentiellement exprimés entre échantillons néoplasiques et normaux, Guscetti *et al.* ont par ailleurs mis en évidence une grande concordance entre leur cohorte canine, et une cohorte du The Cancer Genome Atlas (TCGA) chez l'Homme [5].

L'analyse fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés entre les échantillons néoplasiques et normaux a mis en évidence la dérégulation de processus généraux de la carcinogénèse, retrouvée dans de nombreux types de cancers chez l'Homme et dans de nombreuses espèces [181,183]. Ces modifications comprennent l'enrichissement dans les tumeurs de processus comme la division cellulaire, l'angiogénèse, et la réponse immunitaire, ainsi que la dérégulation de différentes voies métaboliques [4,5]. Parmi ces processus fréquemment altérés dans les cancers, il est intéressant de noter que tandis que Liu *et al.* rapportent un appauvrissement des fonctions en lien avec l'apoptose [4], Guscetti *et al.* rapportent au contraire un enrichissement de ce processus au sein des tumeurs [5].

L'analyse fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés entre les échantillons néoplasiques et normaux a également mis en évidence l'altération de fonctions et voies de régulation plus spécifiques, de façon concordante avec les altérations observées dans les HNSCC chez l'Homme [183–185]. Ces modifications comprennent la surexpression dans les tumeurs de gènes associés à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), au remaniement de la matrice extra-cellulaire, à la voie PI3K/AKT, et à la voie du TGF β . Au contraire, on observe une répression des gènes en lien avec la différenciation épithéliale [4,5].

Le processus de TEM en particulier ressort clairement dans les profils d'expression de ces deux cohortes canines. Une observation intéressante en lien avec ce processus, est que différents facteurs de transcription (FT) régulateurs sont surexprimés dans les tumeurs de ces deux cohortes. En particulier, parmi les six FT majeurs de la TEM (ZEB1/2, SNAI1/2, TWIST1/2), Liu *et al.* rapportent une surexpression des seuls TWIST1 et SNAI1 [4], tandis que Guscetti *et al.* rapportent une surexpression de ZEB2 uniquement. Ces derniers émettent d'ailleurs l'hypothèse que cette observation, combinée à celle de profils d'expression en faveur d'un processus de TEM, pourrait indiquer une TEM partielle [5]. Différents éléments poussent cependant à prendre ces observations avec prudence. Tout d'abord, la présence des transcrits de FT est souvent transitoire au sein d'une même cellule, tandis que les technologies de séquençage ARN manquent souvent de sensibilité pour la détection d'un transcrit défini. Ces deux éléments font qu'il peut être délicat de conclure quand à la surexpression ou non d'un FT donné quand l'effectif de l'étude est réduit. Par ailleurs, on considère le plus souvent la TEM partielle comme la présence simultanée de caractéristiques phénotypiques épithéliales et mésenchymateuses chez une cellule d'origine épithéliale [186–188]. Or ce phénotype n'est pas toujours corrélé à l'expression des différents gènes induisant et régulant la TEM. En particulier, si les FT majeurs de la TEM sont souvent exprimés de façon associée, ce n'est pas toujours le cas, et chacun d'eux est susceptible d'induire une TEM « complète » [186,189]. Des analyses plus poussées sont donc nécessaires afin de répondre aux questions sur la régulation de la TEM,

et sur les potentiels états intermédiaires ou partiels de TEM. Nous aurons l'occasion d'y revenir dans la seconde partie de cette thèse.

Deux échantillons de la cohorte de Liu *et al.* présentaient un certain nombre de séquences s'alignant sur le génome de Papillomavirus [4]. Le nombre de séquences détectées était cependant faible en comparaison de ce que l'on peut voir avec certains carcinomes épidermoïdes tête et cou HPV+ chez l'Homme, rendant incertain un lien de causalité dans ces cas précis. Cette observation reste intéressante compte tenu du fait que ces deux échantillons présentent un profil d'expression global nettement distinct des autres tumeurs [4], ce qui rappelle les différents profils moléculaires observés selon le statut HPV chez l'Homme [190–192]. En particulier, une de ces deux tumeurs ne semble pas présenter de profil de TEM significatif [4].

Pour conclure les données de séquençage ARN des carcinomes épidermoïdes de la cavité orale suggèrent une similarité importante entre l'Homme et le Chien dans les variations de profil d'expression associées à la carcinogénèse.

A.2. Homologie dans le panorama mutationnel chez le Chien et chez l'Homme

Le panorama mutationnel peut être défini comme l'ensemble des altérations de la séquence d'ADN retrouvées au sein d'une tumeur ou d'un type de cancer donné. Son étude présente un intérêt pronostique et thérapeutique, puisque la présence de certaines altérations peut être associée à une meilleure réponse à un traitement donné. A l'échelle de l'exome, la charge mutationnelle (en nombre de mutations somatiques par mégabase d'ADN) est ainsi positivement associée dans de nombreux types de cancers à une meilleure réponse au traitement et survie chez les patients traités avec des inhibiteurs des points de contrôle immunitaires (ICI, 'Immune Checkpoint Inhibitors') [193]. Cette association ne semble cependant pas aussi franche dans le cas des carcinomes épidermoïdes tête et cou [194]. A l'échelle du gène, la présence de mutations activatrices ou inhibitrices peut prédire la réponse à une thérapie ciblée. Un bon exemple d'application thérapeutique est ainsi l'utilisation des anticorps anti-BRAF chez les patients atteints d'un mélanome avec mutation V600E de BRAF [195].

Bien que ne ciblant pas la molécule d'ADN, le séquençage du transcriptome peut être utilisé pour acquérir des informations indirectes sur le panorama mutationnel des tumeurs. Parmi les différentes mutations identifiables, on peut distinguer les altérations chromosomiques, où une large région du génome est altérée, et les mutations ponctuelles, n'affectant qu'une seule paire de bases nucléiques.

A.2.1. Altérations chromosomiques

Parmi les différentes altérations chromosomiques retrouvées dans les tumeurs, les événements de délétion et amplification de régions chromosomiques peuvent être identifiés par l'observation d'anomalies du nombre de copies de gènes (ANC) correspondant à ces régions chromosomiques.

L'étude directe du génome par des techniques d'hybridation avait ainsi déjà permis d'identifier des ANC au sein d'échantillons de OSCC chez le Chien, dont certaines altérations concordantes avec celles observées au sein des HNSCC chez l'Homme. Celles-ci incluent notamment l'amplification récurrente du chromosome canin 13 [4], qui présente une relation d'homologie partielle avec le chromosome humain 8q fréquemment amplifié chez l'Homme [184]. D'une façon similaire, l'identification de variations du nombre de transcrits moyen le long d'une région chromosomique permet d'identifier indirectement des ANC et donc des altérations chromosomiques, confirmant ainsi les résultats mentionnés précédemment [4].

Le séquençage ARN peut également être appliqué à l'approche comparée des ANC chez l'Homme et le Chien, de façon à faciliter la différenciation des gènes « pilotes » et « passagers » impliqués dans ces altérations chromosomiques [196]. Au sein d'une région chromosomique amplifiée par exemple, les gènes « pilotes » correspondent aux gènes dont l'amplification a un effet pro-tumoral, et qui font donc l'objet d'une sélection positive à l'échelle de la tumeur. Au contraire, les gènes « passagers » n'ont pas d'effet pro-tumoral. L'intérêt de l'approche comparée des espèces dans la différenciation entre ces deux types de gènes réside dans les différences d'organisation des chromosomes, malgré une homologie importante des gènes et régions chromosomiques. En effet, du fait de réarrangements génomiques postérieurs à la divergence d'espèces, une portion génomique continue chez l'Homme peut avoir son homologue canin fractionné en plusieurs portions, ou inversement. En faisant l'hypothèse que les mécanismes pathologiques soient similaires entre les deux espèces, on s'attend alors à ce que les gènes « pilotes » soient inclus dans des régions amplifiées de manière récurrente à la fois chez l'Homme et le Chien. La comparaison des altérations chromosomiques permet ainsi d'obtenir une liste de gènes pilotes candidats réduite, à étudier en priorité.

Liu *et al.* ont appliqué cette approche à leur cohorte canine et au chromosome humain 8q, amplifié de manière récurrente dans les HNSCC chez l'Homme [184]. Sur les deux portions correspondant au chromosome humain 8q, seule une portion, portée par le chromosome canin 13, était ainsi amplifiée de manière récurrente [4]. Cela suggère que le(s) gène(s) pilote(s) impliqué(s) dans l'amplification du chromosome humain 8q fait ou font partie des homologues des gènes amplifiés portés par la région correspondante du chromosome canin 13.

Pour conclure, l'étude des altérations chromosomiques au sein des OSCC chez l'Homme et le Chien, suggère une similarité des mécanismes impliqués dans la carcinogenèse, ainsi que la possibilité d'accélérer l'étude de ces altérations par une approche comparée. L'analyse de plus d'échantillons canins est cependant nécessaire afin de confirmer ces résultats et étudier les altérations chromosomiques de fréquence inférieure.

A.2.2. Mutations ponctuelles

Il est important de rappeler que le séquençage ARN sur échantillon FFPE n'est pas la technique privilégiée pour étudier les mutations de séquence de l'ADN. En effet, en plus des artefacts inhérents à tout protocole de séquençage, le processus de fixation est susceptible d'introduire des artefacts de séquence supplémentaires [197]. Il peut être particulièrement complexe de distinguer ces artefacts de vraies mutations somatiques, en particulier en cas d'hétérogénéité intra-tumorale. Pour cette raison, il est conseillé plus vivement qu'à l'habitude que les mutations de séquence mises en évidence dans ce contexte soient validées par d'autres

approches et/ou par l'étude d'autres tumeurs. Afin d'augmenter la fiabilité de leur analyse, Liu *et al* ont par ailleurs limité l'étude des mutations ponctuelles aux régions du génome avec une profondeur de séquençage comprise entre 30 et 300X (c'est-à-dire que chaque paire de base de ces régions a été séquencée entre 30 et 300 fois) [4].

Liu *et al.* ont identifié dans leur cohorte des mutations ponctuelles de TP53 et FAT1, également fréquemment mutés au sein des HNSCC chez l'Homme [184,185]. Liu *et al.* rapportent également des mutations ponctuelles de gènes qui, bien que ne faisant pas partie des gènes fréquemment mutés au sein des HNSCC chez l'Homme, sont également rapportés comme mutés ou altérés dans différents cancers dont des carcinomes des voies aéro-digestives supérieures. Les gènes rapportés comprennent les gènes FAT2 [198,199], UBR5 [199,200], TNC [199,201,202] et RELN [199,203].

Tableau X : Gènes retrouvés mutés à la fois dans les HNSCC canins et humains d'après les données de séquençage ARN de Liu *et al.* [4]

	Gènes faisant l'objet de mutations de séquences dans des OSCC canins de Liu <i>et al.</i> [4]
Gènes fréquemment mutés au sein des HNSCC chez l'Homme	TP53 ; FAT1
Gènes occasionnellement mutés au sein des HNSCC chez l'Homme	FAT2 ; UBR5 ; TNC ; RELN

HNSCC = carcinome épidermoïde tête et cou ; OSCC = carcinome épidermoïde de la cavité orale.

L'étude des mutations ponctuelles dans la cohorte de Liu *et al.* a donc mis en évidence des mutations au sein de gènes également fréquemment mutés au sein des HNSCC chez l'Homme. Certains résultats sont cependant plus étonnants par comparaison avec l'Homme. Globalement, ces résultats restent fragiles au vu de la technologie employée et du faible effectif de l'étude, et nécessitent d'être confirmés.

B. Le séquençage ARN 'single-cell' chez l'Homme permet un meilleur accès à l'hétérogénéité intra-tumorale des HNSCC

Comme on a pu le voir, le séquençage ARN 'bulk' a permis d'obtenir de précieuses informations sur les carcinomes épidermoïdes de la cavité orale chez l'Homme et le Chien. Cette approche, appliquée à des échantillons contenant plusieurs milliers voire millions de cellules, présente cependant l'inconvénient de moyenniser les profils d'expression de l'ensemble de ces cellules. Cela limite par conséquent les possibilités d'identifier des populations cellulaires rares, ainsi que la diversité des cellules en général.

Au contraire, l'émergence récente des techniques de séquençage ARN « cellule unique » ou 'single-cell' (scRNAseq) a permis un meilleur accès à l'hétérogénéité transcriptomique intra-tumorale. Plusieurs jeux de données de scRNAseq ont ainsi été publiés au cours des dernières années, incluant différents types de cancers chez l'Homme comme le mélanome [204], et le gliome [205]. En comparaison des cancers cités précédemment, les carcinomes épidermoïdes tête et cou (HNSCC) ont jusque-là été l'objet de relativement peu d'études utilisant cette

technologie, avec trois jeux de données publiés entre 2017 et Juin 2021. Ces derniers comprennent l'analyse de l'ensemble des cellules intra-tumorales dans des carcinomes épidermoïdes de la cavité orale [12,16,206–209] et laryngés [13], ainsi que l'analyse des cellules immunitaires associées aux tumeurs HPV+ ou HPV- [14] (tab XI).

Nous allons ici synthétiser les résultats des études analysant des HNSCC par scRNAseq, en les mettant en perspective avec les données issues d'approches plus classiques comme l'immunohistochimie (IHC) ou le séquençage ARN 'bulk'.

Tableau XI : Articles originaux analysant des données de séquençage ARN 'single-cell' de carcinomes épidermoïdes tête et cou chez l'Homme

Publications	Date de publication	Caractéristiques du jeu de données		
		Patients	Cellules analysées	Objectif spécifique
Puram <i>et al.</i> [12]	2017	18 patients avec des OSCC HPV-	5 902 cellules (CD45+ et -)	/
Yu <i>et al.</i> [206]	2019	“	5 712 cellules	Cellules immunitaires
Davis-Marcisak <i>et al.</i> [207]	2019	“	5 902 cellules	Variabilité d'expression
Zhang <i>et al.</i> [208]	2019	“	5 902 cellules	Envahissement péri-neural
Xiao <i>et al.</i> [16]	2020	“	5 502 cellules	Gènes métaboliques
Xiang <i>et al.</i> [209]	2020	“	5 902 cellules	Complexe Mediator
Cillo <i>et al.</i> [14]	2020	26 patients avec des HNSCC, 11 individus sains	131 224 cellules (CD45+ des tumeurs, tonsilles, et du sang)	/
Song <i>et al.</i> [13]	2020	2 patients avec des LSCC HPV-	14 411 cellules (CD45+ and -)	/

HNSCC = carcinome épidermoïde tête et cou ; LSCC = carcinome épidermoïde laryngé ; OSCC = carcinome épidermoïde de la cavité orale.

B.1. Hétérogénéité des cellules malignes

Dans deux jeux de données sur les trois disponibles, l'intégralité des tumeurs, incluant cellules malignes et non malignes, a été analysée [12,13]. Les études portant sur ces jeux de données ont notamment mis en évidence que l'hétérogénéité inter-tumorale était plus importante que l'hétérogénéité intra-tumorale des cellules malignes [12,16,206]. Cela se traduit par un regroupement des cellules malignes par tumeur d'origine au cours de l'application de méthodes de réduction de dimensionnalité (fig 4A). De manière intéressante, des résultats similaires sont obtenus même en restreignant le nombre de gènes étudiés, comme avec le groupe de gènes métaboliques analysé par Xiao *et al.* [16]. Cette observation est cohérente avec les études réalisées sur d'autres types de cancer [204,210,211]. De plus, des résultats similaires ont pu être obtenus *ex vivo* avec des lignées cellulaires de carcinomes épidermoïdes [212]. Par conséquent, ces résultats suggèrent qu'il est préférable que les études s'intéressent aux cellules malignes

portent sur plus de quelques tumeurs ou lignées cellulaires afin de fournir des résultats plus solides et susceptibles d'être généralisables.

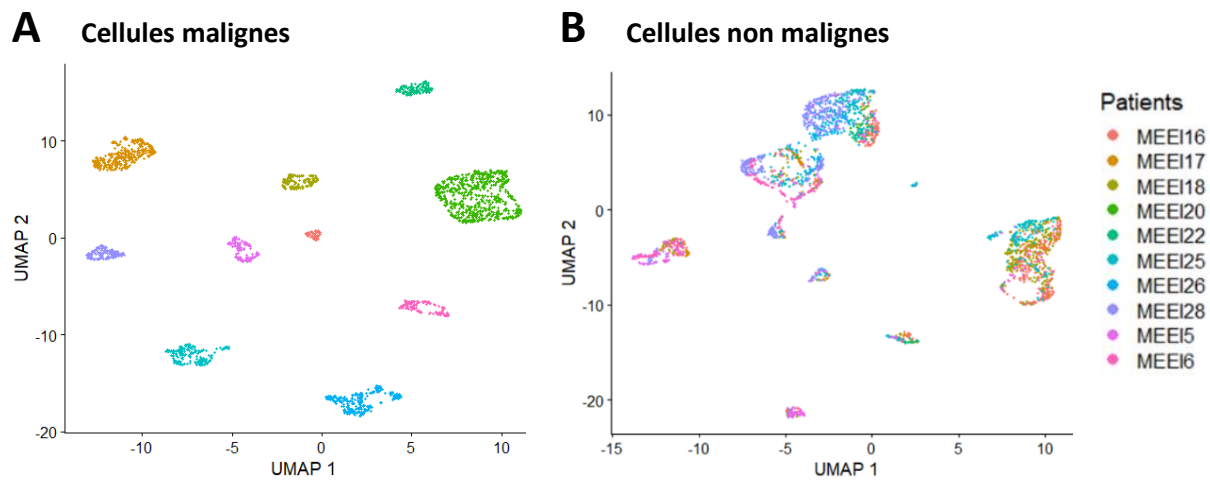


Figure 4 : Hétérogénéité des profils d'expression des cellules malignes et non malignes au sein de carcinomes épidermoïdes oraux chez l'Homme. (A) 'Uniform Manifold Approximation and Projection' (UMAP) réalisée après Analyse en Composantes Principales (ACP) de la matrice d'expression des cellules malignes issues de 10 carcinomes épidermoïdes de la cavité orale (OSCC). La UMAP permet la visualisation de cluster patient-spécifiques de cellules malignes. (B) UMAP réalisée après ACP de la matrice d'expression des cellules non malignes issues de 10 OSCC. Au contraire de la figure A, on n'observe pas de cluster patient-spécifique. Une analyse des gènes exprimés par les différents clusters permet de plus de les attribuer à des types cellulaires distincts (données non montrées ici). Les données d'expression utilisées pour construire cette figure sont issues de la transformation des données brutes de Puram *et al.* par Xiao *et al.* [16].

B.1.1. Différentes sous-populations de cellules malignes

Bien que l'hétérogénéité inter-tumorale des cellules malignes soit importante, des profils communs d'hétérogénéité intra-tumorale peuvent tout de même être observés entre tumeurs de différents patients.

Il devrait tout d'abord être noté que les approches utilisées pour identifier des sous-populations de cellules malignes différaient entre les auteurs des deux jeux de données. Puram *et al.* ont identifié sept programmes d'expression génétique (ou signatures) préférentiellement exprimés par des sous-populations de cellules malignes dans plusieurs tumeurs [12]. Song *et al.* ont de leur côté identifié cinq populations de cellules malignes sur la base du transcriptome complet [13]. Une conséquence importante est que les sous-populations de Song *et al.* sont mutuellement exclusives, ce qui n'est pas nécessairement le cas pour les signatures de Puram *et al.*

Parmi les signatures identifiées par Puram *et al.*, la signature « cycle cellulaire » présentait quelques similarités (comme une expression élevée de TK1 et HMGB2) avec le profil d'expression de la population de « cellules tumorales prolifératives » identifiée par Song *et al.* [12,13]. Une analyse immunohistochimique (IHC) complémentaire dirigée contre le marqueur Ki-67 a permis de montrer que les cellules tumorales prolifératives étaient localisées sur les bords des tumeurs [13]. De plus, cette population exprimait spécifiquement des gènes dont le

niveau d'expression dans les HNSCC du The Cancer Genome Atlas (TCGA) était positivement corrélé au grade des tumeurs, et tendait à corrélérer avec un mauvais pronostic [13]. Le niveau d'expression de ces gènes pouvant indiquer l'importance relative de cette population cellulaire dans les tumeurs, cela est ainsi en faveur de l'impact clinique défavorable de cette population.

De même, la signature « différenciation épithéliale » de Puram *et al.*, présentait quelques similarités (comme une expression élevée de SPRR1B et S100A9) avec le profil d'expression de la population de cellules malignes « kératinocyte-like » identifiée par Song *et al.* Dans les deux études, une analyse IHC complémentaire – dirigée contre des marqueurs de différenciation des kératinocytes (SPRR1B ou SPRR3) – a montré que les cellules identifiées étaient localisées au centre de la tumeur [12,13]. La signature « différenciation épithéliale » était négativement corrélée à la présence de métastases dans les données du TCGA [12]. Il y avait de plus une corrélation positive entre l'expression de certains gènes hautement exprimés dans la population de cellules « kératinocyte-like » et une diminution du grade, ainsi qu'un meilleur pronostic [13].

Une autre signature importante identifiée dans le jeu de données de Puram *et al.* comprenait des gènes en lien avec la matrice extra-cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (comme VIM, MMP10, ITGA5, et TGFB1). Cependant, cette signature était également caractérisée par le maintien de l'expression de la plupart des marqueurs épithéliaux, et l'absence de certaines caractéristiques typiques de la TEM comme l'expression de certains facteurs de transcription (dont ZEB1/2, TWIST1/2 et SNAI1). Cette observation a conduit les auteurs à faire l'hypothèse d'une transition épithélio-mésenchymateuse partielle (TEM-p). En étudiant plusieurs lignées cellulaires de carcinome épidermoïde (lignées SCC9, Cal-27, SCC4, SCC25 et JHU-006), un tel programme « TEM-p » n'a pu être retrouvé que dans une partie des cellules de la lignée SCC9. Dans les cellules SCC9, l'expression du programme TEM-p corrélait avec une augmentation des capacités d'invasion et une diminution du taux de prolifération. Cette observation était cohérente avec le jeu de données cellules uniques, dans lequel l'expression du programme TEM-p corrélait avec une diminution de l'expression des gènes du cycle cellulaire. Une analyse IHC complémentaire réalisée sur les principaux marqueurs du programme TEM-p a montré que les cellules marquées étaient localisées sur les bords des tumeurs, adjacents aux fibroblastes associés au cancer (CAF, 'cancer-associated fibroblasts'). De plus, une analyse des relations ligand-récepteur, ainsi que des manipulations *in vitro*, suggéraient que les CAF pourraient participer à l'induction du programme TEM-p *in vivo*, via plusieurs mécanismes dont la sécrétion de TGF β [12]. Dans les données du TCGA, l'expression du programme TEM-p était plus importante dans les tumeurs du sous-type 'malignant-basal', et était associée aux phénomènes d'envahissement local et de métastase, ainsi qu'à un grade plus élevé [12,208].

Les autres signatures identifiées par Puram *et al.* étaient en lien avec la réponse aux stress et la réponse à l'hypoxie [12]. Les autres populations de cellules malignes identifiées par Song *et al.* ont été qualifiées de « type immortel », « type métastatique » et « type immunitaire » sur la base des gènes différentiellement exprimés [13]. Leur pertinence clinique et physiopathologique n'est pas claire pour le moment. En effet, l'expression des gènes marqueurs de ces populations ne présentait pas de corrélation avec le pronostic dans les données du TCGA [13]. De plus, la population maligne de « type immunitaire » était non seulement une population de très faible importance relative (environ 1 % des cellules malignes) mais exprimait également de manière déconcertante des gènes typiquement associés aux cellules immunitaires (comme les gènes IL32 et CD2). Finalement, Song *et al.* semblent avoir utilisé des critères d'inclusion moins stricts sur la qualité des cellules (données non montrées). Une confirmation dans des jeux de données indépendants est donc nécessaire.

En résumé, les jeux de données cellules uniques ont permis l'identification de différentes sous-populations de cellules malignes. Certaines signatures identifiées étaient des programmes génériques retrouvés dans de nombreux types de cancer, comme ceux en lien avec la prolifération/le cycle cellulaire, la réponse à l'hypoxie, et la réponse aux stress. D'autres signatures étaient plus spécifiques des HNSCC, comme ceux en lien avec la différenciation épithéliale et la TEM.

B.1.2. Métabolisme des cellules malignes

La dérégulation du métabolisme cellulaire a été bien établi comme une des caractéristiques principales du cancer [181], avec des implications pour la physiologie du cancer, le pronostic, et le traitement. La pertinence du séquençage ARN dans l'étude des caractéristiques métaboliques du cancer a de plus été démontrée [213].

Xiao *et al.* ont réanalysé le jeu de données de Puram en se focalisant sur une sélection de 1 566 gènes métaboliques. En comparant toutes les cellules tumorales entre elles (à la fois malignes et non malignes), les cellules malignes présentaient le plus grand nombre de voies métaboliques positivement régulés. Cet accroissement concernait des aspects très divers du métabolisme énergétique, en faveur d'une régulation positive globale du métabolisme des cellules malignes [16]. Une telle association entre la régulation positive d'aspects distincts du métabolisme avait déjà pu être observée dans les données du TCGA, et pourrait être le reflet d'interactions entre voies métaboliques [213]. De manière intéressante, seule une fraction de ces voies métaboliques positivement régulées dans le jeu de données cellule unique pouvait être identifiée en comparant les profils d'expression 'bulk' de tumeurs et tissu adjacent sain issus du TCGA [16]. Cela soutient l'idée que l'analyse 'bulk' minimise les différences entre tissu tumoral et tissu sain, en masquant l'importante complexité et hétérogénéité des échantillons. Cependant, certaines différences observées pourraient également être dues au fait de comparer différents types cellulaires. En effet, Xiao *et al.* ont comparé les profils métaboliques de cellules malignes aux profils de cellules non malignes – soit essentiellement des fibroblastes et cellules immunitaires. Une approche complémentaire pourrait être de comparer le profil cellule unique des cellules malignes au profil cellule unique de cellules épithéliales normales, ou bien au profil bulk d'un épithélium normal après enrichissement en cellules épithéliales par microdissection [5,214].

Bien que globalement positivement régulé, le métabolisme des cellules malignes était également caractérisé par une importante variabilité inter- et intra-tumorale. Les variations dans les voies métaboliques mitochondriales (comme celles de la phosphorylation oxydative et du cycle de l'acide tricarboxylique) contribuaient le plus à l'hétérogénéité métabolique intra-tumorale. Les profils d'expression des cellules malignes présentaient également une corrélation entre l'expression des voies de la glycolyse, de la phosphorylation oxydative, et de la réponse à l'hypoxie [16]. L'association entre glycolyse et réponse à l'hypoxie était attendue sur la base d'études précédentes [215]. En particulier, la pertinence clinique de la voie de la glycolyse en oncologie est de plus en plus claire. Ainsi, il a été observé dans les données du TCGA que la régulation positive du métabolisme des carbohydrates était significativement associée avec un mauvais pronostic clinique chez les patients souffrant de HNSCC, de même que dans d'autres types de cancer [213]. De plus, le métabolisme des carbohydrates pourrait être une cible

thérapeutique comme le suggèrent les effets de l'inhibition de SNAI1 et RUNX1 (également identifiés comme des régulateurs majeurs dans les HNSCC) dans des lignées cellulaires de sarcome et d'adénocarcinome pulmonaire [213]. La corrélation entre réponse à l'hypoxie et la voie de la phosphorylation oxydative était plus surprenante [215], et n'a pas été retrouvée dans des lignées de culture cellulaire [16], nécessitant donc confirmation.

En résumé, les données 'single-cell' ont confirmé la régulation positive globale du métabolisme des cellules malignes, qui était vraisemblablement sous-estimée par les données de séquençage ARN 'bulk'. L'identification de nouvelles voies métaboliques dérégulées, non détectées par comparaison d'échantillons 'bulk', pourrait se révéler pertinente à la fois pour l'évaluation du pronostic et pour le traitement des carcinomes épidermoïdes tête et cou.

B.1.3. Différences entre tumeurs primaires et métastases

Puram *et al.* ont comparé les tumeurs primaires et métastases ganglionnaires associées de 5 patients de leur cohorte. Concernant les cellules malignes, celles-ci montraient peu de différences récurrentes et significatives dans leurs profils d'expression entre tumeurs primaires et métastases, y compris dans l'expression du programme TEM-p [12]. Davis-Marcisak *et al.* ont appliqué le programme 'Expression Variation Analysis' (EVA) au même jeu de données, et ont identifié une plus faible variabilité dans les profils d'expression des cellules métastatiques par rapport aux cellules malignes de la tumeur primaire chez deux patients, tandis qu'il n'y avait pas de différence significative chez les autres patients [207]. Ces observations, montrant une forte similarité entre les profils d'expression des cellules malignes de la tumeur primaire et des métastases, viennent renforcer des observations similaires faites à partir d'analyses 'bulk' [216].

Cette notion est assez surprenante lorsque l'on considère le modèle de dissémination tumorale par migration d'une cellule néoplasique unique (modèle de 'single-cell dissemination'). En effet, dans le cadre de ce modèle on s'attendrait à ce que les cellules métastatiques soient représentatives d'une petite sous-population de cellules de la tumeur primaire, ayant acquis les caractéristiques nécessaires à la migration. D'après ce postulat, les cellules métastatiques devraient alors exprimer de manière plus importante des facteurs favorisant la migration (comme le programme de TEM) et présenter une hétérogénéité moindre de manière générale. Comme on l'a vu dans la cohorte étudiée, ceci n'est cependant pas le cas général.

Cette observation est cependant compatible avec d'autres modèles et/ou phénomènes, comme la plasticité des cellules métastatiques, qui leur permettrait de « récapituler » la diversité des profils d'expression au sein des tumeurs primaires après un certain temps. Dans le cas du programme TEM-p, cette idée est soutenue par des études *in vitro* sur la lignée de cellules SCC9 [12]. Une explication alternative ou additionnelle pourrait venir du modèle de dissémination tumorale par migration collective (fig 5). Dans ce modèle, il ne s'agit plus d'une cellule mais d'un groupe de cellules, potentiellement hétérogène, qui se détache de la tumeur primaire et migre. Bien que n'ayant pas encore été appliquées à la thématique des HNSCC, des études cellule-unique sur des cellules tumorales circulantes (CTCs) ont ainsi déjà pu mettre en avant des arguments en faveur de l'importance du mécanisme de migration collective dans la

dissémination tumorale [217–219]. Pour clarifier le processus métastatique associé aux HNSCC, il sera important de réaliser de telles études chez les patients touchés par ce cancer.

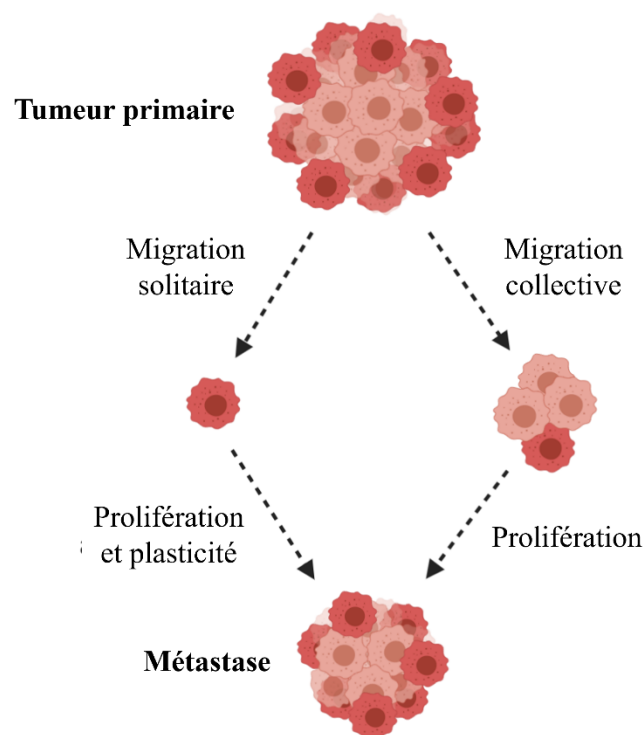


Figure 5 : Modèles alternatifs ou complémentaires de dissémination tumorale, à la lumière de la grande similarité entre HNSCC primaire et métastase ganglionnaire correspondante. Les différences de couleur illustrent des différences de profil d'expression génétique.

B.2. Populations intra-tumorales de cellules non malignes

Comparées aux cellules malignes, les cellules tumorales non malignes présentent bien plus de similarités inter-tumorales [12,14,16,206]. Ceci peut être illustré par le regroupement des cellules par type cellulaire au cours de l'application de méthodes de réduction de dimensionnalité (fig 4). Cela suggère que les études et stratégies thérapeutiques ciblant ces populations non malignes pourraient être plus facilement généralisables que celles ciblant les cellules malignes.

B.2.1. Fibroblastes

Dans le jeu de données de Puram, les fibroblastes pouvaient être répartis en deux sous-populations principales, correspondant respectivement à des myofibroblastes et des fibroblastes associés au cancer (CAF). Une troisième sous-population mineure pourrait correspondre à des fibroblastes quiescents/au repos [12]. Comme déjà mentionné, une analyse IHC complémentaire a permis de montrer que les CAF étaient localisés au niveau des marges de la tumeur, à proximité des cellules malignes exprimant le programme TEM-p. De plus, une analyse des interactions inter-cellulaires potentielles était en faveur d'interactions particulièrement fréquentes entre CAF et cellules malignes, dont certaines susceptibles de promouvoir le programme de TEM-p (comme la sécrétion de TGF β et FGF) [12].

En comparant les profils d'expression métaboliques des CAF et myofibroblastes, Xiao *et al.* ont rapporté une régulation positive relative de 15 voies métaboliques chez les CAF (dont les voies de la glycolyse, et du métabolisme des acides arachidonique et linoléique), tandis que

seule la voie du métabolisme du phosphate inositol était comparativement positivement régulée chez les myofibroblastes [16]. Cette observation était en faveur d'une activité métabolique plus intense des CAF par rapport aux myofibroblastes, et était cohérente avec une reprogrammation métabolique des CAF [220–222]. Une telle reprogrammation stimule vraisemblablement la croissance tumorale et inhibe la réponse immunitaire antitumorale. Par exemple, une activité de glycolyse intense peut conduire à une déplétion du glucose et au relargage de lactate dans le micro-environnement, conduisant à la « nutrition » des cellules tumorales [223], la stimulation de la néo-angiogenèse [224,225], et une immuno-modulation pro-tumorale [226,227].

Ces données soutiennent l'idée que les CAF sont une population importante et active au sein des HNSCC, dont les sécrétions et l'activité métabolique pourraient contribuer à la croissance et à l'invasion tumorale. Cependant, les interactions entre les CAF et les cellules malignes sont fortement dépendantes du contexte tissulaire [218], et des études plus approfondies sont donc nécessaires pour évaluer le rôle des CAF spécifiquement dans les HNSCC.

B.2.2. Cellules immunitaires

Les études de RNAseq 'single-cell' des HNSCC ont permis d'identifier différentes populations de leucocytes intra-tumoraux (LIT). Ces populations incluent les lymphocytes T, les lymphocytes B, et les macrophages associés aux tumeurs (MAT) [12–14,206], ainsi que les cellules dendritiques [12,14,206] et les mastocytes [12,206], certaines pouvant par ailleurs être subdivisées en sous-populations. En particulier, Cillo *et al.* ont focalisé leur étude sur les cellules CD45+ (marqueur des leucocytes), ce qui leur a permis d'analyser un grand nombre de cellules immunitaires. Grâce à cela, une analyse par 'clustering', couplée à l'identification des gènes distinguant les différents clusters dans leur jeu de données, a permis l'identification d'états cellulaires particuliers au sein même des sous-populations immunitaires [14].

1) Population lymphoïde T

De manière récurrente, les cellules T étaient l'une des principales populations de LIT, avec 4 sous-populations identifiées : les CD4+ T régulateurs (Tregs) ; les CD4+ conventionnels (Tconv) ; les CD8+ « épuisés » ; et les autres lymphocytes CD8+ [12–14,206] (fig 6).

Parmi les CD8+, les CD8+ « épuisés » ont été identifiés sur la base de l'expression de récepteurs co-inhibiteurs et d'autres molécules associées à l'épuisement (comme PD1, CTLA4, TIM3, and LAG3) et correspondaient à des lymphocytes T CD8+ maximalement différenciés [14]. Leur proportion parmi les CD8+ – et plus généralement parmi les lymphocytes – variait significativement entre patients [12,206]. Cela est particulièrement pertinent comme cela pourrait prédire la réponse aux inhibiteurs des points de contrôles immunitaires (ICI). De plus, les CD8+ « épuisés » exprimaient de hauts niveaux de CXCL13 en comparaison des autres lymphocytes T [12,14], d'où un rôle potentiel dans le recrutement des lymphocytes B. Point intéressant, Cillo *et al.* ont identifié deux clusters distincts de CD8+ « épuisés » dans leur jeu de données : le premier présentait une régulation positive de la costimulation, tandis que le second présentait une régulation positive des voies de signalisation de l'hypoxie et de l'IFN [14]. Ce second cluster pourrait constituer une sous-population encore plus dysfonctionnelle de

CD8+. En effet, tandis que la stimulation des voies de réponse à l'hypoxie en tant que telle semble stimuler la fonction cytotoxique [228,229], différentes caractéristiques du micro-environnement tumoral hypoxique comme une haute concentration en lactates et l'hypoxie elle-même, ont été reliées à une fonction effectrice T altérée [227,230] ainsi qu'à une augmentation de l'expression de PD-L1 par les cellules malignes, MAT, et les cellules myéloïdes suppressives (CMS) [231].

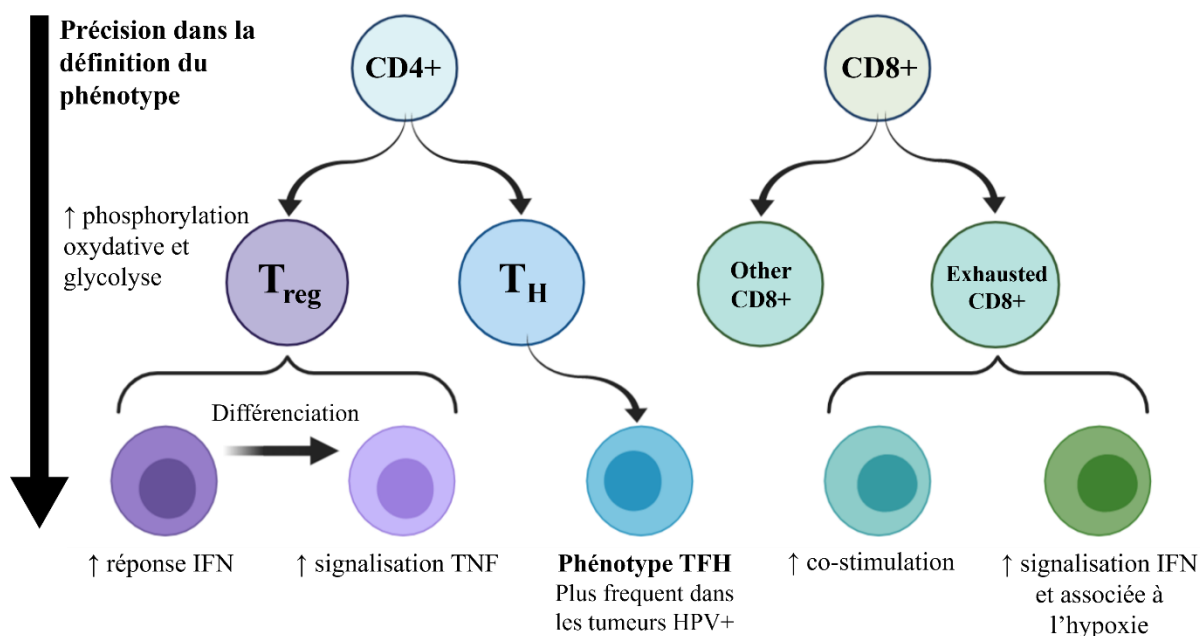


Figure 6 : Populations et sous-populations de cellules T au sein de carcinomes épidermoïdes tête et cou d'après les données de séquençage ARN 'single-cell' [12–14]. Les trois jeux de données ont confirmé la présence de Treg, T helpers, CD8+ « épuisés », et d'autres CD8+. L'analyse détaillée du jeu de données de Cillo a permis l'identification d'états cellulaires supplémentaires. *IFN* = Interféron ; *TFH* = lymphocyte T Folliculaire Helper ; *TH* = Lymphocyte T helper ; *TNF* = Tumor Necrosis Factor ; *Treg* = lymphocyte T CD4+ régulateur.

Différentes sous-populations de Tregs ont également été rapportées par Cillo *et al.* et semblaient corrélées avec le statut de différenciation. En effet, les sous-populations de Tregs avec une régulation positive des gènes de réponse à l'IFN α (comme IFITM1 et IFIT1) correspondaient également à des Tregs activés depuis peu, tandis que les sous-populations avec une régulation positive des gènes de la voie de signalisation du TNF (comme TNFRSF18 et TNFRSF9) correspondaient à des Tregs bien différenciés [14]. Ceci suggère que les voies de l'IFN et du TNF pourraient toutes deux être des cibles thérapeutiques potentielles pour augmenter la réponse immunitaire antitumorale.

2) Cellules myéloïdes

De nombreuses sous-populations de cellules myéloïdes ont également été identifiées dans les différents jeux de données [13,14]. En particulier, certaines de ces populations pourraient exercer une action pro-tumorale et/ou immunosuppressive, comme les cellules dendritiques IDO1+ et les macrophages de sous-type M2 [14], qui était également le sous-type de

macrophage le plus fréquent dans le jeu de données de Song [13]. Au-delà de la dichotomie M1/M2, Cillo *et al.* ont également identifié de nombreux clusters de MAT et cellules dendritiques. Une analyse complémentaire des trajectoires de différenciation a permis de mettre en valeur un continuum avec des transitions progressives entre ces différents clusters [14]. Ces observations reflètent vraisemblablement la complexité et plasticité des cellules immunitaires myéloïdes. De plus, bien que les CMS aient été décrites comme une importante population au sein des HNSCC [232], Cillo *et al.* n'ont pas identifié de cellule avec un phénotype correspondant dans leur jeu de données [14], tandis que les CMS n'étaient pas un point d'intérêt des autres études et n'ont pas été mentionnées [12,13,206]. Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires quant au rôle des CMS dans les HNSCC.

En résumé, les techniques de RNAseq 'single-cell' ont permis de préciser notre compréhension des états des cellules immunitaires au sein des HNSCC, en permettant l'identification de nouvelles sous-populations. Une partie de ces sous-populations pourrait inhiber la réponse immunitaire antitumorale, et constituent donc des cibles thérapeutiques potentielles.

B.2.3. Métabolisme des cellules immunitaires

Comme déjà introduit en présentant les données sur les fibroblastes, le micro-environnement tumoral présente souvent des caractéristiques métaboliques susceptibles de mener à une immuno-modulation pro-tumorale [226,227], ce qui a conduit à un intérêt grandissant pour l'étude du métabolisme des leucocytes intra-tumoraux (LIT).

Dans le jeu de données de Puram, la variabilité dans les voies reliées au métabolisme mitochondrial (comme les voies de la phosphorylation oxydative et du cycle de l'acide tricarboxylique) était la principale contributrice à l'hétérogénéité métabolique au sein de chaque type cellulaire immunitaire. Dans l'ensemble des LIT à l'exception des macrophages, il y avait de plus une corrélation significative entre l'activité de la glycolyse, de la signature de l'hypoxie, et de la voie de la phosphorylation oxydative [16]. Tout comme pour les cellules malignes, cette corrélation entre voie de la phosphorylation oxydative et signature de l'hypoxie était inattendue [215].

En comparant les CD4+ Tregs et les T helpers, Xiao *et al.* rapportent de plus que les voies de la phosphorylation oxydative et de la glycolyse étaient comparativement sur-exprimées chez les Tregs [16]. Cette observation n'est que partiellement cohérente avec la notion fréquemment rencontrée que les Tregs reposent principalement sur la phosphorylation oxydative et peu sur la glycolyse, et qui est une des explications proposées au fait que le MET favorise les Tregs par rapport aux autres lymphocytes T [227,233,234]. Cependant, l'activité métabolique des populations de lymphocytes T est susceptible de changer drastiquement selon leur localisation, statut d'activation, et statut de différenciation [227,235]. Une analyse plus détaillée est donc nécessaire pour déterminer les caractéristiques précises des cellules immunitaires étudiées ici.

Les données de séquençage ARN cellule-unique ont donc fourni des résultats étonnants quant au métabolisme des LIT. Ces observations pourraient se révéler pertinentes pour mieux comprendre les phénomènes d'échappement tumoral, mais doivent d'abord être confirmées et détaillées.

B.2.4. Différences entre tumeurs HPV+ et HPV- concernant les populations immunitaires

En comparant les Leucocytes Intra-Tumoraux (LIT) des tumeurs HPV+ et HPV-, Cillo *et al.* rapportent que les populations de CD4+ conventionnels (Tconv), cellules B, et cellules myéloïdes diffèrent le plus dans leurs profils d'expression [14].

Les Tconv issus de tumeurs HPV+ étaient enrichis en cellules avec un phénotype de T Folliculaire Helper (TFH), tandis que les cellules B des tumeurs HPV+ étaient enrichies en cellules avec un phénotype de lymphocyte B du Centre Germinatif (CG). L'analyse des interactions inter-cellulaires basée sur l'expression de couples ligands-récepteurs était cohérente avec cette observation, avec les seuls TIL des tumeurs HPV+ montrant des interactions potentielles entre TFH et lymphocyte B du CG. De plus, une analyse immunohistochimique suggérait que certaines de ces interactions pourraient mener à la formation de structures lymphoïdes tertiaires (SLT) [14].

Concernant les cellules myéloïdes, les tumeurs HPV- étaient enrichies en cellules présentant un phénotype immuno-suppresseur : cellules dendritiques IDO1+, et macrophages du sous-type M2 [14]. Cette observation confirme une étude rapportant, sur la base d'une analyse IHC, que la proportion de macrophages M2 parmi tous les macrophages était significativement supérieure dans les tumeurs HPV- par rapport aux tumeurs HPV+ [236].

En résumé, le jeu de données de Cillo a mis en évidence des différences qualitatives dans l'infiltrat immunitaire entre tumeurs HPV- et HPV+. Les caractéristiques immunitaires des tumeurs HPV+, incluant une forte signature TFH, la présence de SLT, et une moindre proportion de macrophages M2, sont corrélées à un meilleur pronostic clinique chez les patients atteints de HNSCC [192,220,221]. Certaines ou toutes ces caractéristiques pourraient correspondre à une réponse immunitaire anti-tumorale plus efficace, et expliquer – partiellement – le meilleur pronostic des patients avec des tumeurs HPV+ [222,223].

Une limite importante du jeu de données de Cillo est l'absence d'évaluation de l'importance de l'infiltrat immunitaire. Par conséquent, certaines populations pourraient ne pas différer qualitativement entre tumeurs HPV- et HPV+, mais tout de même différer quantitativement. En effet, de précédentes études ont montré que les tumeurs HPV+ présentent un plus haut niveau d'infiltration par les lymphocytes T CD8+, CD4+, Tregs, et très probablement par les macrophages CD68+ [237].

V. Prise en charge thérapeutique

Nous présentons ici de façon non exhaustive les principales modalités thérapeutiques actuellement impliquées dans la prise en charge thérapeutique des OSCC chez l'Homme et le Chien, avec un accent sur les données chez le Chien. L'intérêt de la surveillance carcinologique sera également abordé en fin de partie.

A. Prise en charge chirurgicale

Que ce soit chez l'Homme ou chez le Chien, la chirurgie constitue la modalité thérapeutique de première ligne dans une majorité des cas d'OSCC. La prise en charge chirurgicale peut concerner les trois sites que sont la tumeur primaire, les trajets et nœuds lymphatiques (NLs) loco-régionaux, ainsi que les métastases à distance.

Plusieurs stratégies chirurgicales peuvent être envisagées pour chacun de ces sites [238] :

- **Exérèse intra-lésionnelle ou intra-capsulaire** : l'incision se fait au sein du tissu néoplasique, ce qui implique l'absence de marges saines. Dans le cas des OSCC, cela n'est indiqué que si une exérèse plus large est impossible (localisation complexe, choix du patient ou propriétaire ...). En présence de métastases à distance notamment, une exérèse large de la tumeur primaire n'est dans tous les cas pas curative, tandis qu'une exérèse intra-lésionnelle (ou marginale) peut suffire à apporter un soulagement local par réduction du volume tumoral.
- **Exérèse marginale** : l'incision se fait dans le stroma réactionnel adjacent à la tumeur, ce qui augmente fortement le risque de marges non saines. Bien que cette option puisse permettre un contrôle local avec certaines tumeurs bénignes, cela n'est pas recommandé pour les OSCC. Pour ces derniers les indications de l'exérèse marginale sont les mêmes que celles de l'exérèse intra-lésionnelle.
- **Exérèse large** : l'incision se fait dans le tissu sain à distance de la tumeur.
- **Exérèse radicale** : exérèse large avec retrait du « compartiment anatomique » supportant la tumeur : membre thoracique ou pelvien chez le Chien, hémimandibule totale, *etc.*

A.1. Résection de la tumeur primaire

Pour les OSCC chez l'Homme la distance macroscopique recommandée est généralement de plus de 10mm par rapport à la tumeur primaire [239], dans l'objectif d'obtenir des marges histopathologiques supérieures à 5mm [240]. Chez le Chien des marges macroscopiques comprises entre 10 et 20mm sont couramment recommandées [133,238].

Selon la localisation primaire et l'extension locale de l'OSCC, l'exérèse large implique fréquemment le retrait d'un fragment osseux plus ou moins conséquent. Chez le Chien où les localisations gingivales sont majoritaires [2,3,30], la résection concerne essentiellement l'os mandibulaire ou maxillaire. Les résections osseuses peuvent être totales (hémimandibulectomie ou -maxillectomie totale) ou partielles (caudale, centrale, rostrale) [238]. Les différentes techniques de mandibulectomie et maxillectomie chez le Chien ont été revues plus

en détail dans une thèse d'exercice de 2018 [3]. Selon l'étendue de la résection, des techniques de reconstruction peuvent être nécessaires (lambeaux cutanés, prothèses chez l'Homme ...).

L'exérèse large d'une tumeur non métastatique est susceptible d'être curative chez l'Homme et chez le Chien, le principal risque étant celui d'une récurrence locale. Chez les chiens avec OSCC mandibulaire sans signe de métastase loco-régionale ou à distance, le pronostic après mandibulectomie (partielle ou totale) seule est bon, avec un taux de survie à un an compris entre 84 et 91 % [136,147]. Les récurrences locales sont peu fréquentes (5-8,3 % des cas), mais une proportion un peu plus élevée de chiens développent des métastases (11-12,5 %) [136,147]. Ceci suggère la présence d'embolies ou métastases non détectés au moment de la prise en charge initiale chez certains chiens. La présence de métastases non détectées serait en faveur de la réalisation d'un bilan d'extension plus poussé chez le Chien (voir « II.C Comportement métastatique »).

Le pronostic après maxillectomie seule est souvent rapporté comme inférieur sur la base d'une publication de Wallace *et al*, mentionnant un taux de survie à un an de 57 % [241]. Cette série de cas incluait cependant sept chiens avec un OSCC maxillaire, dont un a été perdu de vue, deux sont décédés du fait de maladies concomitantes non reliées au cancer et un seul a été euthanasié du fait d'une récurrence locale. Ces précisions incitent à la prudence quant à l'interprétation des taux de survie « bruts ». Plus récemment Kühnel *et al*. n'ont pas trouvé de différence significative de survie en comparant 15 OSCC maxillaires et 25 OSCC mandibulaires traités par résection osseuse et chimiothérapie adjuvante au besoin (médiane de survie 39 contre 43 mois) [36].

Pour les OSCC linguaux, le pronostic semble plus sombre. Culp *et al*. ont rapporté une médiane de survie de 216 jours pour les chiens traités par glossectomie (partielle ou sub-totale), malgré chimiothérapie ou radiothérapie adjuvante dans certains cas. Bien que le pourcentage de métastases développées dans un second temps (9,7 % ; trois cas sur 31) était similaire à celui observé pour les localisations gingivales dans d'autres études [136,147], le pourcentage de récurrences locales était lui nettement plus élevé (32 % ; 10 cas sur 31), motivant la mise en place de traitements de 2nde ligne. Cela suggère qu'une difficulté majeure associée aux OSCC linguaux réside dans l'obtention de marges saines et/ou le contrôle local. Sur ce point il est intéressant de noter que même les glossectomies totales ou subtotaux chez le Chien sont associées à une fonctionnalité acceptable et une bonne qualité de vie [242].

Outre les complications non spécifiques associées à l'anesthésie et l'intervention chirurgicale (saignements, déhiscence de plaie...) [238,243], le retour à une alimentation et hydratation spontanées suffisantes peut être retardé en post-opératoire [136,238,243]. C'est notamment le cas pour les glossectomies majeures, et peut nécessiter la mise en place d'une sonde de réalimentation. A long terme, la plupart des chiens traités par mandibulectomie présentent une malocclusion dentaire et une instabilité mandibulaire. La malocclusion peut occasionnellement se compliquer de lésions secondaires (ulcérations des muqueuses en regard des dents) [136,238,243], et favorise le dépôt de tartre [238]. Une salivation excessive peut persister chez les chiens traités par mandibulectomie ou glossectomie [238].

A.2. Résection des trajets et nœuds lymphatiques loco-régionaux

L'exérèse des nœuds lymphatiques (NLs) loco-régionaux peut avoir un rôle exploratoire, préventif ou thérapeutique selon le contexte dans lequel elle est réalisée et le rationnel sous-jacent.

L'examen clinique, l'imagerie, et la cytoponction sont les principaux outils permettant d'évaluer la présence de métastases loco-régionales en préopératoire [3,244]. Chez le patient ou le chien avec OSCC et présentant une anomalie évocatrice ou spécifique d'un processus métastatique loco-régional (i.e. de stade cN+), il est largement recommandé de procéder à une exérèse des nœuds lymphatiques loco-régionaux [244–246]. L'étendue de la dissection cervicale à réaliser, ainsi que la manière de traiter les cas ne présentant pas d'anomalie (i.e. de stade cN0) restent cependant controversées même chez l'Homme [246]. La dissection cervicale présente en effet des inconvénients en termes de risque chirurgical, de dommage esthétique et de morbidité à long terme, et ce d'autant plus qu'elle est étendue. D'un autre côté, le statut cN0 au moment de la prise en charge initiale n'implique pas l'absence de développement métastatique ultérieur.

Chez les patients avec un OSCC de stade cN0, des études comparatives entre les approches « exérèse optionnelle des NLs » (END, Elective Neck Dissection) et « surveillance et exérèse thérapeutique » ont montré un bénéfice de l'END sur la survie et le taux de métastases ultérieures, y compris dans des stades relativement précoces [247,248]. Il devrait cependant être noté que les patients sont susceptibles d'estimer différemment les avantages respectifs des deux approches, et que les avancées scientifiques nous permettent d'estimer de plus en plus précisément le risque de métastases occultes chez un patient donné. Ultimement le choix de la prise en charge se base donc sur les préférences du patient et l'estimation du risque de métastases occultes par le clinicien. L'estimation de ce risque chez le patient avec HNSCC va au-delà des objectifs de cette thèse, mais est discutée plus en détail dans une revue de 2019 [246]. Chez les patients avec un OSCC de stade cN+, l'étendue de la dissection à réaliser est également source de controverses. Une exérèse (relativement) sélective semble une alternative acceptable par rapport à une exérèse plus complète, à condition de bien sélectionner les patients [249].

Chez le Chien avec un OSCC de stade cN0, il n'existe pas de recommandation consensuelle sur la prise en charge cervicale à réaliser [244]. La prise de décision chez le Chien ne présentant pas d'anomalie à la palpation est compliquée par :

- le bilan d'extension souvent moins poussé qu'en médecine humaine. Les examens d'imagerie modernes (Imagerie par tomодensitométrie, par résonance magnétique ...) de la tête et du cou sont ainsi peu fréquents en prise en charge initiale.
- Le manque d'études permettant d'estimer raisonnablement le risque de métastases occultes à partir des caractéristiques du patient et de la tumeur primaire.
- Le manque d'études évaluant le bénéfice potentiel de l'END chez le Chien.

En l'absence de recommandations consensuelles en médecine vétérinaire, une publication de 2020 rapporte les résultats d'une enquête réalisée auprès de spécialistes des Collèges Américains exerçant en oncologie, chirurgie des tissus mous ou dentisterie et chirurgie orale, afin d'évaluer les pratiques actuelles [244]. Pour les OSCC chez le Chien, une majorité des répondants recommandait une exérèse dans les seuls cas où l'imagerie et/ou la cytologie étaient évocatrices d'une métastase (i.e. stade cN+), et ce quelle que soit la taille de la tumeur primaire. La proportion de spécialistes recommandant une END augmentait cependant avec la taille de la tumeur primaire (de T1 à T3). Les auteurs de cette publication indiquent par ailleurs réaliser au sein de leur institution une END bilatérale des NLs mandibulaires et rétropharyngiens dans le cas des OSCC de stade T2/T3 cN0M0 [244]. Dans le cas où le clinicien estime le risque de métastases loco-régionales occultes suffisant pour justifier une END, l'exérèse bilatérale

pourrait se justifier chez le Chien par la proportion significative de cancers oraux N+ comportant des métastases contro- et/ou bilatérales [149,151].

A.3. Maladie oligométastatique et métastasectomie

La maladie oligométastatique peut se définir chez l'Homme par un nombre limité de métastases à distance (typiquement moins de cinq), dans un nombre d'organes également restreint [250,251]. Chez les patients avec OSCC et maladie oligométastatique, plusieurs essais cliniques et publications suggèrent un bénéfice sur la survie de l'ablation chirurgicale des métastases à distance. Cela est notamment le cas pour les métastases pulmonaires [252] – les plus fréquentes chez les patients avec OSCC [142] – mais pourrait également être le cas avec d'autres sites comme le foie [253].

B. Radiothérapie

Les OSCC présentent une bonne radiosensibilité. La radiothérapie est utilisée au niveau du site de la tumeur primaire et/ou au niveau loco-régional (cou). Tout comme l'intervention chirurgicale, cela peut se faire :

- **A visée curative**, le plus souvent en association avec la chirurgie (pré-, per- et/ou post-opératoire).
- **A visée palliative**, afin de réduire le volume tumoral et soulager le patient ou l'animal malade dans les cas d'OSCC non opérable ou métastatique.

Les différents types et protocoles de radiothérapie ont été revus dans une thèse d'exercice de 2016 [254]. Brièvement, c'est plus particulièrement la radiothérapie externe par mégavoltage qui est utilisée dans le traitement des OSCC chez le Chien. Selon le protocole réalisé, 32 à 60 Gy (Gray) sont administrés au niveau du site primaire de l'OSCC et/ou au niveau des métastases loco-régionales [254–256]. Cette dose de radiations est fractionnée en plusieurs séances sur 3 à 6 semaines. Une distinction peut être faite à ce niveau entre les protocoles hyper-fractionnés (nombreuses séances, de 3-4 Gy chacune) et hypo-fractionnés (séances moins nombreuses, de 6-8 Gy chacune) [254–256].

B.1. Radiothérapie à visée curative

Chez l'Homme ou chez le Chien, la radiothérapie à visée curative peut être réalisée seule dans des stades précoces de HNSCC [257], mais est plus fréquemment utilisée en complément à la résection chirurgicale. La décision de réaliser une radiothérapie à visée curative en post-opératoire se base sur l'estimation du risque de récurrence locale. La présence de marges infiltrées ou d'un envahissement extra-nodulaire (ENE) sont ainsi considérées comme traduisant un haut-risque de récurrence locale, et motivent généralement la mise en place d'une radiothérapie post-opératoire [245,258,259]. D'autres critères couramment pris en compte incluent la taille de la tumeur primaire, la distance d'invasion (DOI), la présence d'une invasion péri-neurale (PNI) ou d'une invasion lympho-vasculaire (LVI) à l'examen histopathologique, ainsi que l'implication de multiples nœuds lymphatiques loco-régionaux [245,258,259].

Chez le Chien avec OSCC, les résultats rapportés après radiothérapie seule sont extrêmement variés, avec des médianes de survie sans progression comprises entre quelques mois et 36 mois [260–262]. Cette variabilité reflète une hétérogénéité importante dans les populations traitées (âge, localisation au sein de la cavité orale, stade clinique ...) ainsi que dans les protocoles thérapeutiques utilisés. Le pronostic sous radiothérapie seule est notamment meilleur pour les chiens jeunes ainsi que pour les tumeurs primaires de petite taille [260–262]. Les tumeurs rostrales pourraient également être associées à un meilleur pronostic [260]. La radiothérapie adjuvante post-opératoire apporte cependant un bénéfice clinique conséquent chez les chiens avec un OSCC opéré en marges infiltrées ou étroites, et sans métastase à distance. Riggs *et al.* ont ainsi rapporté dans cette population une médiane de survie globale de 2 051 jours avec radiothérapie hypo-fractionnée post-opératoire (32-36 Gy en quatre séances à une semaine d'intervalle) contre 181 jours en l'absence de radiothérapie post-opératoire [255].

B.2. Radiothérapie à visée palliative

Dans une série de cas de Mosca *et al.*, 13 chiens avec un OSCC non opérable et majoritairement de stades II ou III ont reçu une radiothérapie hypo-fractionnée à visée palliative (32-34 Gy en quatre séances à une semaine d'intervalle). 62 % des chiens (huit sur 13) ont également reçu du méloxicam adjuvant à long terme. Une rémission a été observée dans 77 % des cas (10 sur 13), dont une rémission complète. Une amélioration de la qualité de vie a également été rapportée dans tous les cas sauf un [256].

B.3. Complications et effets indésirables.

La radiothérapie est associée à la survenue d'effets indésirables précoces (après quelques jours à semaines) et retardés (après quelques mois à années).

Les effets indésirables précoces correspondent notamment à une inflammation des tissus exposés à l'irradiation. Dans le cas du traitement des OSCC chez le Chien, une (radio)mucite orale est fréquemment rapportée [256,262]. Les autres tissus moins fréquemment atteints chez le Chien sont la peau (dermatite, alopecie, desquamation ...), les glandes salivaires (hyposialie) et les structures oculaires [3,256]. Les effets indésirables précoces sont le plus souvent limités, mais peuvent occasionnellement motiver une interruption du traitement [262]. Selon la localisation ciblée par la radiothérapie, une partie de ces localisations (œil notamment) peut cependant être protégée pendant les séances de radiothérapie [256].

La survenue d'effets indésirables retardés (après quelques mois à années) doit être mise en relation avec l'espérance de vie attendue. Chez les Chiens traités par radiothérapie à visée palliative notamment, peu d'animaux sont susceptibles de vivre assez longtemps pour expérimenter ce risque. Les effets indésirables retardés sont globalement peu fréquents chez le Chien traité pour OSCC [255,256], mais semblent un peu plus fréquents dans le cas d'OSCC macroscopique traité à visée palliative [256]. Ces effets indésirables incluent chez le Chien le développement de fistules osseuses, la nécrose osseuse ou muqueuse, et la myosite des muscles masticateurs [3,256,262]. Quoique peu fréquents, ces effets indésirables sont potentiellement sévères et associés à une morbidité conséquente, et doivent donc être envisagés et discutés avec les propriétaires [256].

C. Photothérapie dynamique

La photothérapie dynamique consiste en l'administration d'une molécule photosensible, suivie de son activation au niveau de la zone souhaitée par une lumière de longueur d'onde donnée. Cela permet une cytotoxicité locale et la réduction (complète ou totale) du volume tumoral, tandis que les composants de la matrice extracellulaire (collagène, élastine...) ne sont pas ou peu endommagés, facilitant la cicatrisation [263].

Chez l'Homme la photothérapie semble d'efficacité comparable à la chirurgie dans la prise en charge des OSCC de stade précoce (T1N0M0 ou T2N0M0), avec une rémission complète observée dans 86 % des cas [263]. Elle est cependant réservée à ces cas particuliers du fait de son efficacité uniquement superficielle.

Chez le Chien, McCaw *et al.* ont rapporté l'utilisation de la photothérapie sur 11 cas d'OSCC, après administration de pyropheophorbide-alpha-hexyl-ether (HPPH ; 0,3mg/kg IV, une séance) [264]. Malgré une invasion osseuse fréquente, une rémission complète de la tumeur primaire a été observée dans 91 % des cas (10 cas sur 11), dont un pour lequel une récurrence locale a été constatée. Dans un autre cas une métastase loco-régionale a été constatée trois mois après traitement malgré l'absence de récurrence locale. Il est important de noter qu'une réduction chirurgicale des tumeurs a été réalisée avant irradiation de façon à réduire l'épaisseur tumorale à moins de 10 mm si ce n'était pas déjà le cas [264].

La photothérapie dynamique est globalement bien tolérée chez l'Homme et le Chien. Une photosensibilité cutanée prolongée (de durée variable selon l'agent) constitue l'effet indésirable le plus fréquent et nécessite la mise en place de mesures de protection temporaires. McCaw *et al.* ont également rapporté la dévitalisation de fragments osseux, qui a dans trois cas prolongé la cicatrisation et nécessité une intervention chirurgicale. Les attaches des dents irradiées étaient également fragilisées, les rendant lâches [264].

Ces résultats suggèrent que la photothérapie dynamique puisse servir au contrôle strictement local des OSCC de stade précoce (profondeur inférieure à 1cm) chez le Chien, en alternative au traitement chirurgical.

D. Chimiothérapie cytotoxique

D.1. Chimiothérapie systémique

La chimiothérapie systémique est susceptible d'être utilisée dans la prise en charge des HNSCC non-opérables, récurrents ou métastatiques (R/M).

Chez l'Homme, le protocole de première ligne chez ces patients a longtemps impliqué une combinaison de cisplatine et 5-fluouracil (5-FU) [265,266], bien que les patients avec OSCC bénéficient d'une moins bonne réponse que les autres sites [267]. Le carboplatine présente un meilleur profil de toxicité que le cisplatine mais une efficacité moindre sur les HNSCC, il n'est donc pas recommandé pour la majorité des HNSCC R/M [268]. Les taxanes (paclitaxel, doclitaxel) ont plus récemment démontré leur intérêt dans la prise en charge des HNSCC [269–271], et sont notamment utilisés en combinaison avec le cisplatine (en remplacement du 5-FU), ou en addition au couple cisplatine/5-FU.

Chez le Chien, des rémissions d'OSCC ont été observées sous piroxicam (dans trois cas sur 17 avec 0,3 mg/kg PO toutes les 24 heures) [272]. De meilleurs résultats semblent obtenus en

combinant le piroxicam à un dérivé de platine (DP) : cisplatine (rémission dans cinq cas sur neuf avec 50 mg.m⁻² IV toutes les trois semaines) [273] ou carboplatine (rémission dans six cas sur sept avec 300 mg.m⁻² IV toutes les trois semaines) [274]. L'utilisation de docetaxel *per os* a également été rapporté chez le Chien, combinée à de la cyclosporine pour en augmenter la biodisponibilité. Le pourcentage de rémissions observé était de 50 % pour les HNSCC canins (six cas sur 12 avec docetaxel 1,625 mg/kg toutes les deux semaines) [275].

Le piroxicam seul semble globalement très bien toléré [272]. Malgré la réalisation d'une fluidothérapie concomitante à l'administration de cisplatine, une azotémie discrète à modérée est fréquemment observée chez les chiens traités avec le couple piroxicam/cisplatine. L'azotémie se résout cependant rapidement après arrêt du cisplatine [273]. Une telle toxicité rénale n'a pas été observée avec le couple piroxicam/carboplatine [274]. L'utilisation de piroxicam/DP est par ailleurs associée à la survenue occasionnelle d'une toxicité gastro-intestinale et hématologique (neutropénie discrète essentiellement) [273,274]. Waite *et al.* ont quant à eux rapporté que l'utilisation du couple cyclosporine/docetaxel *per os* s'accompagnait d'une toxicité gastro-intestinale sévère relativement fréquente, avec notamment 16 % des cas nécessitant une hospitalisation de courte durée après la 1^{ère} séance (huit cas sur 51, dont un décès pour lequel le propriétaire avait refusé l'hospitalisation) [275]. Dans la même publication la toxicité hématologique (neutropénie) était elle peu fréquente.

D.2. Approches de chimiothérapie localisée

Les approches de chimiothérapie « localisée » pourraient être intéressantes dans la prise en charge des HNSCC non-opérables ou récurrents localement. Elles ne sont cependant pas adaptées au traitement de la majorité des cas de métastases à distance.

En oncologie l'électro-chimiothérapie consiste en l'administration d'impulsions électriques au niveau d'une tumeur, de façon à perméabiliser les cellules et faciliter l'entrée d'une molécule de chimiothérapie. C'est notamment la bléomycine qui est utilisée dans ce cadre après administration intra-veineuse ou intra-tumorale [276]. Chez l'Homme cette approche a montré des résultats encourageants pour le traitement des HNSCC non opérables et/ou après échec des traitements standards. Les pourcentages de rémission rapportés pour les HNSCC sont ainsi compris entre 45 et 58 % dans les séries de cas récentes [277–279]. Ce traitement semble par ailleurs bien toléré, malgré la survenue de quelques événements graves peu fréquents (saignements et infections sévères notamment) [276,280].

Chez le Chien une publication récente a rapporté de bons résultats pour une série d'OSCC traités par une à deux séances d'électro-chimiothérapie (bléomycine 15 000 UI/m² IV). Le pourcentage de rémission après électro-chimiothérapie était de 92 % (11 cas sur 12) avec 67 % de rémission complète [281]. Ces bons résultats, y compris par-rapport à ceux rapportés chez l'Homme, pourraient notamment s'expliquer par : une petite taille des tumeurs incluses (diamètre médian de 1,65 cm) ; un envahissement limité (pas de signe de métastase et un seul cas avec envahissement osseux) ; et l'absence de traitements antérieurs (à l'exception d'une tumeur ayant subi une réduction chirurgicale) [281]. Tous ces critères ont en effet été associés à une meilleure réponse à l'électro-chimiothérapie chez l'Homme [276]. L'électro-chimiothérapie était par ailleurs associée à peu d'effets indésirables chez le Chien [281]. Bien que devant être confirmés par d'autres études, ces résultats suggèrent que l'électro-chimiothérapie puisse être une alternative intéressante au traitement chirurgical pour les OSCC canins de petite taille (plus grand diamètre inférieur à 2cm) et sans envahissement osseux.

Des conjugués cisplatine-acide hyaluronique sont par ailleurs actuellement en développement pour administration intra-tumorale. Des rémissions ont été rapportées dans des cas d'OSCC canins, mais des niveaux de toxicité importants ont motivé une adaptation de la formulation [282,283], dont la balance bénéfice/risque reste à évaluer à ce jour.

E. Thérapies ciblées

En oncologie les thérapies ciblées correspondent à des médicaments ciblant des molécules plus spécifiquement présentes ou activées au niveau des tumeurs, leur permettant d'exercer une action antitumorale. Cette plus grande spécificité – bien qu'imparfaite – distingue les thérapies ciblées de la chimiothérapie cytotoxique conventionnelle. Dans le contexte des HNSCC, les thérapies ciblées étudiées incluent les inhibiteurs de l'EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor), les inhibiteurs de CDK4/6 (Cyclin Dependent Kinase), les inhibiteurs du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et de son récepteur le VEGFR, et les inhibiteurs de l'axe PI3K/AKT/mTOR [268,284]. Les inhibiteurs des points de contrôle immunitaires (ICI) peuvent être considérées comme des thérapies ciblées, mais sont souvent considérés à part dans la catégorie plus large des immunothérapies. Les ICI seront vus dans la sous-partie suivante.

Chez l'Homme, ce sont principalement les inhibiteurs de l'EGFR (dont le cetuximab) qui ont démontré leur efficacité chez les patients avec HNSCC R/M [285–287], faisant de la trithérapie cetuximab/cisplatine/5-FU un traitement de 1^{ère} ligne chez les patients sans contre-indication [268]. Le bénéfice clinique semble par ailleurs particulièrement marqué pour les patients avec un OSCC par rapport aux autres localisations de la tête et du cou [285–287]. D'autres associations comme le couple taxanes/cetuximab semblent également prometteuses dans les essais cliniques de phase II [268]. Les inhibiteurs de CDK4/6 (dont le palbociclib) ont eux montré des résultats prometteurs chez l'Homme en association avec le cetuximab [288]. Les autres thérapies ciblées mentionnées précédemment n'ont jusque-là pas démontré de balance bénéfice/risque satisfaisante chez les patients avec un OSCC [268,284].

Les thérapies ciblées n'ont été que très peu étudiées dans le traitement de l'OSCC chez le Chien, et n'ont à notre connaissance pas dépassé le stade de la recherche pré-clinique. Guscetti *et al.* ont récemment montré que les protéines conservées CDK4 et CDK6 étaient surexprimées dans des échantillons d'OSCC canin par comparaison à l'épithélium sain. Des lignées cellulaires d'OSCC canin étaient également sensibles à l'induction de l'apoptose et de l'arrêt du cycle cellulaire par de faibles doses de palbociclib [5]. Ces résultats suggèrent que les OSCC canins pourraient être sensibles au palbociclib comme le sont les HNSCC chez l'Homme. L'efficacité des thérapies ciblées sur des lignées cellulaires d'OSCC canin a également été rapportée avec un inhibiteur de tyrosine kinase (Masitinib) [289] et un inhibiteur de l'axe PI3K/AKT (LY294002) [290].

F. Inhibiteurs des points de contrôle immunitaires

Les inhibiteurs des points de contrôle immunitaires (ICI, 'Immune Check-point Inhibitors') ont révolutionné le traitement du cancer par leur efficacité dans certains cancers au pronostic jusque-là sombre, comme le mélanome métastatique [291]. Ces molécules fonctionnent en levant les freins du système immunitaire, facilitant ainsi le rôle antitumoral de ce dernier [292].

Chez l'Homme, les anticorps dirigés contre PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) ont démontré leur efficacité chez les patients avec un HNSCC, ainsi que leur toxicité moindre par rapport à la chimiothérapie cytotoxique [176,293–295]. Les anti-PD-1 sont ainsi indiqués en 2^{ème} ligne des traitements systémiques (HNSCC R/M progressant malgré une chimiothérapie adaptée), voire en 1^{ère} ligne pour les HNSCC R/M [268,296]. Le bénéfice est notamment observé sur la survie globale, et nettement moins sur la survie médiane sans progression de la maladie [176]. Cela suggère que les anti-PD1 ne soient particulièrement bénéfiques qu'à une sous-population de patients, avec cependant des effets durables possibles [176,268]. Un enjeu crucial de recherche consiste donc à déterminer des critères permettant d'identifier les patients susceptibles de bénéficier d'un ICI. Dans cet objectif le niveau d'expression de PD-L1 au sein des HNSCC semble être un critère intéressant [176,297]. Bien d'autres critères susceptibles d'être prédictifs de la réponse des HNSCC aux ICI sont à l'étude, dont les caractéristiques de l'infiltrat immunitaire ou la charge mutationnelle. Ils nécessitent cependant d'être évalués plus précisément dans cette maladie [297].

Les ICI sont également une modalité thérapeutique d'intérêt en médecine et recherche vétérinaire [298–300]. Des anticorps chimériques et caninisés dirigés contre PD-1 et PD-L1 ont notamment été étudiés chez le Chien. Ils semblent relativement bien tolérés dans cette espèce [299–301], avec également plusieurs publications en faveur d'une efficacité dans le traitement du mélanome canin, tant sur la progression que la survie globale [299–301]. L'efficacité des ICI dans le traitement des carcinomes épidermoïdes n'a cependant été évaluée qu'anecdotiquement à notre connaissance [300]. Dans l'éventualité où les ICI se montrent efficaces dans le traitement des OSCC canins, une contrainte majeure de ces thérapies est actuellement leur prix élevé pour la médecine vétérinaire.

G. Surveillance carcinologique

La surveillance carcinologique chez le patient ou animal malade en rémission totale/sans signe de cancer a plusieurs objectifs :

- **Identifier précocement une récurrence locale** au niveau de la cavité orale ou des sites métastatiques identifiés au moment de la prise en charge initiale.
- **Identifier précocement une progression métastatique**, y compris chez le patient ou animal malade ne présentant pas de métastases au moment de la prise en charge initiale.
- **Identifier précocement une seconde tumeur primaire**. Cela est notamment le cas chez l'Homme pour qui le développement d'un OSCC traduit dans la majorité des cas l'influence de substances carcinogènes (dont tabac et alcool). Les patients concernés sont donc à risque de développer un second HNSCC, ou bien un autre cancer favorisé par le tabac (cancer du poumon, de la vessie ...) [302].

Du fait du faible taux de métastases à distance chez l'Homme et le Chien, la chirurgie et la radiothérapie constituent le plus souvent les premières lignes du traitement. La chimiothérapie est également une modalité thérapeutique importante dans ces deux espèces. Les thérapies ciblées (anti-EGFR notamment) et l'immunothérapie (anti-PD-1/PD-L1 notamment) occupent une place de plus en plus importante dans le traitement des OSCC récurrents et/ou métastatiques chez l'Homme, mais sont peu évaluées dans cette indication chez le Chien.

Partie II : l'analyse transcriptomique des carcinomes épidermoïdes de la cavité orale chez l'Homme et le Chien révèle une hétérogénéité à plusieurs niveaux dans la transition épithélio-mésenchymateuse et sa régulation

Pour rappel, la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) consiste, pour une cellule d'origine épithéliale, en la perte des caractéristiques épithéliales typiques comme la polarité apico-basale et l'adhésion ferme aux cellules épithéliales adjacentes, et/ou le gain de caractéristiques mésenchymateuses comme l'adhésion à la matrice extra-cellulaire et des capacités de migration. La TEM se produit dans trois contextes distincts : l'embryogenèse, la cicatrisation et le cancer [186], où elle est susceptible de favoriser les processus d'invasion et de métastase. La TEM est un phénomène complexe régulé à de multiples niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel, et post-traductionnel [189]. Le niveau transcriptionnel de régulation en particulier peut être étudié avec le séquençage ARN (RNAseq), qui donne accès à l'abondance relative des transcrits ARN. La régulation transcriptionnelle de la TEM implique de multiples Facteurs de Transcription (FT), parmi lesquels SNAI1, SNAI2, TWIST1, ZEB1 et ZEB2 sont considérés comme des FT majeurs de ce processus. Ils sont susceptibles d'être induits par des signaux similaires comme la signalisation du TGF β [303,304], peuvent induire leurs expressions respectives, et sont tous de puissants inducteurs du phénotype mésenchymateux et/ou répresseurs du phénotype épithélial. Cependant, leurs fonctions ne sont pas entièrement équivalentes [6,7] et des études suggèrent que différents FT majeurs de la TEM pourraient prédominer selon le type de cancer, le contexte tissulaire et la cinétique [189]. Dans les OSCC humains et canins, des publications basées sur l'IHC [8–11] ou le RNAseq [4,5,12] ont ainsi suggéré que différents FT pourraient dominer la régulation de la TEM.

Depuis que le RNAseq 'bulk' a été développé, il est devenu une des technologies les plus utilisées dans la recherche en cancérologie. Une de ses limites est que la plupart des tumeurs contiennent des populations cellulaires hétérogènes, une hétérogénéité présente entre différentes tumeurs mais également au sein d'une tumeur unique. Le RNAseq 'bulk' révèle par conséquent un profil d'expression génétique moyenné du tissu analysé, un inconvénient majeur qui a été surmonté par de nouvelles technologies telles que le RNAseq sur échantillon microdisséqué, et plus récemment le RNAseq 'single-cell' à l'échelle de la cellule unique. Pour les HNSCC chez l'Homme, trois jeux de données RNAseq 'single-cell' ont été publiés à ce jour [12–14], tandis qu'aucun jeu n'est actuellement disponible pour les OSCC canins. En plus de son coût, une difficulté importante pour réaliser du séquençage 'single-cell' sur des tumeurs canines est le recrutement d'échantillons frais, sur lesquels les technologies actuelles sont basées.

L'objectif de cette étude était d'investiguer la régulation de la TEM par les FT majeurs de la TEM dans les OSCC canins et humains, à travers une analyse comparée de jeux de données RNAseq publiques. Dans cet objectif, des jeux de données 'bulk' [4,5,15] et 'single-cell' [12–14,16] ont été analysés, permettant d'évaluer l'hétérogénéité inter-patient et intra-tumorale respectivement. Par ailleurs, un second aspect de notre projet était de mettre au point une procédure permettant d'isoler des cellules uniques, à partir d'échantillons FFPE d'OSCC canins d'une cohorte rétrospective [18], avec l'objectif à long terme de réaliser du RNAseq 'single-cell' à partir d'échantillons FFPE.

I. Matériel et Méthodes

Accès aux jeux de données

Les données brutes de séquençage ARN (fichiers FASTQ) pour les jeux de données canins ont été téléchargées à partir de ‘Sequence Read Archive’ avec le numéro d’accès SRP046723 [4], et à partir de ‘European Nucleotide Archive’ avec le numéro d’accès PRJEB34234 [5]. Les données de comptes brutes pour les 238 patients ‘OSCC’ du The Cancer Genome Atlas (TCGA) [15] ont été téléchargées en utilisant le package R TCGAbiolinks (version 2.18.0) [305]. Les sous-types moléculaires [184,191] et les estimations de pureté [306] disponibles pour les tumeurs correspondantes du TCGA ont également été téléchargées avec TCGAbiolinks. Parmi les cinq estimateurs disponibles pour l’évaluation de la pureté, celui utilisé ici correspond à la mesure consensus dérivée (CPE), qui intègre les résultats de quatre méthodes indépendantes (ABSOLUTE, ESTIMATE, LUMP et IHC). Le principe exploité par ces quatre méthodes est résumé dans le tableau XII.

Tableau XII : Méthodes utilisées par les estimateurs de pureté ABSOLUTE, ESTIMATE, LUMP et IHC

ABSOLUTE	Utilise les données sur les nombres de copies de gènes somatiques.
ESTIMATE	Utilise le niveau d’expression de 141 gènes exprimés par les cellules immunitaires, et gènes exprimés par les cellules stromales.
LUMP	Utilise les données de méthylation au niveau de 44 sites CpG spécifiques des cellules immunitaires.
IHC	Réalise une analyse d’image d’une coupe colorée hémalun-éosine (HE).

Les données d’expression ‘single-cell’ (en $\log_2(\text{TPM}+1)$) de 10 patients ‘OSCC’ ont été téléchargées sur figshare (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.7174922.v2>) [307]. Les caractéristiques principales des quatre jeux de données RNAseq analysés ici sont présentées dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Caractéristiques principales des jeux de données RNAseq inclus.

Jeu de données	Espèce	Nombre d’échantillons inclus	Type d’échantillon
<i>TCGA, 2015</i>	Homme	238 échantillons néoplasiques 17 échantillons normaux appariés	Pièce d’exérèse ou biopsie
<i>Liu, 2015</i>	Chien	7 échantillons néoplasiques 3 échantillons normaux appariés	Pièce d’exérèse ou biopsie
<i>Xiao, 2019</i>	Homme	2,176 cellules malignes provenant de 10 patients	Cellules malignes uniques
<i>Guscetti, 2020</i>	Chien	10 échantillons néoplasiques 10 échantillons normaux appariés	Tissu néoplasique ou épithélial microdisséqué

Xiao et al. ont repris le jeu de données ‘single-cell’ de Puram et al. [12], et y ont appliqué plusieurs corrections et normalisations (Normalisation par rapport à la taille des cellules, inférence des niveaux d’expression de certains gènes, etc.) [16].

Alignement des données brutes de séquençage ARN

La qualité des lectures ('reads') a été évaluée avec fastQC (version 0.11.8) (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) et multiQC (version 1.10.1). Pour le jeu de données canin de Guscetti, les lectures ont été raccourcies avec Trimmomatic (version 0.33) [308] comme décrit précédemment [5], de façon à retirer les bases nucléiques introduites au cours de la préparation de librairie. Les lectures des deux jeux canins ont ensuite été alignées au génome et transcriptome canin de référence (CanFam3.1) avec STAR (version 2.7.9a) [309].

Analyse d'expression différentielle entre échantillons normaux et tumoraux

Dans le cas du jeu de données humain du TCGA, l'analyse a été effectuée en ne considérant que les 17 patients pour lesquels on disposait de données de séquençage ARN appariées avec tissu tumoral et sain. Les gènes avec moins de 20 comptes au total dans les 34 échantillons appariés du TCGA ont été retirés avant de passer aux étapes suivantes. De la même manière, les gènes avec moins de cinq comptes au total dans un des jeux canins ont été retirés du ou des jeux de données correspondants.

Les comptes bruts ont été normalisés avec la fonction « rlog » du package R DESeq2 (version 1.30.1) [310]. Les données normalisées ont ensuite été utilisées pour réaliser des Analyses en Composantes Principales (ACP) avec la fonction « prcomp » du package R stats (version 4.0.4), et évaluer les potentielles sources de variation dans chaque jeu de données. L'analyse d'expression différentielle a ensuite été réalisée avec DESeq2, avec un seuil de significativité de la p-value ajustée (padj) à $\text{padj} = 0.05$. Le changement relatif d'expression a été quantifié via l'estimation de $\log_2(\text{Fold Change})$ ($\log_2(\text{FC})$) avec DESeq2, où $\text{FC} = 2$ correspond à un gène deux fois plus exprimé dans les échantillons tumoraux que dans les échantillons normaux. Des valeurs réduites des $\log_2(\text{FC})$ ont ensuite été obtenues avec DESeq2 en utilisant l'estimateur 'ashr' du package R ashR (version 2.2-47) [311].

L'analyse par 'Fast pre-ranked Gene Set Enrichment Analysis' (fgSEA) a été réalisée avec le package R fgsea (version 1.16.0) [312], en utilisant les valeurs réduites de $\log_2(\text{FC})$ pour classer les gènes. Avant l'analyse par fgSEA, les identifiants ENSEMBL canins ont été convertis en symbole « HUGO Gene Nomenclature Committee » (HGNC) de leur orthologue humain avec le package R biomaRt (version 2.46.3). Seuls les couples d'orthologues « 1:1 » ont été conservés. Les listes de gènes testées au cours de l'analyse par fgSEA correspondaient aux listes 'Hallmark' obtenues de Molecular Signature DataBase (MSigDB) [313].

Analyse de l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale : niveau d'expression des gènes

Pour les analyses inter- et intra-tumorales, le niveau d'expression (E) des gènes a été quantifié comme « $E_{i,j} = \log_2(\text{TPM}_{i,j} + 1)$ », $\text{TPM}_{i,j}$ faisant référence à 'transcript-per-million' pour le gène i dans l'échantillon j, et étant calculé comme suit :

$$\text{TPM}_{i,j} = 10^6 \times \frac{X_{i,j}}{l_i} \times \frac{1}{\left(\sum \frac{X_{i,j}}{l_i}\right)}$$

, avec $X_{i,j}$ le compte brut pour le gène i dans l'échantillon j, et l_i la longueur du transcrit du gène i (en kilobases). Les longueurs de transcrits ont été obtenues avec le package R biomaRt

(version 2.46.3). Quand plusieurs transcrits ont été trouvés pour un même gène, la longueur du plus long transcrit a été utilisée pour la normalisation TPM.

Analyse de l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale : score par échantillon pour une liste de gènes

Les scores par échantillon pour une liste de gènes d'intérêt ont été calculés comme décrit précédemment [12]. Brièvement, un score initial a d'abord été calculé par la moyenne géométrique des 'Niveau d'expression + 1' des gènes inclus dans la liste d'intérêt. Le score final « S » a ensuite été obtenu en corrigeant pour la complexité des échantillons, c'est-à-dire le nombre de gènes détectés dans chaque échantillon. Ceci a été réalisé en soustrayant au score initial pour la liste d'intérêt, le score initial pour une liste contrôle, comme suit :

$$S = \left(\sqrt[n]{\prod_{i=1}^n (E_{i,j} + 1)} \right) - \left(\sqrt[n']{\prod_{k=1}^{n'} (E_{k,j} + 1)} \right)$$

, avec $E_{i,j}$ le niveau d'expression dans l'échantillon j du gène i inclus dans la liste d'intérêt de taille n , et $E_{k,j}$ le niveau d'expression du gène k inclus dans la liste contrôle de taille n' . Les listes de gènes contrôle ont été assemblées aléatoirement de façon à refléter la distribution des niveaux d'expression au sein de la liste de gènes d'intérêt, et afin de contenir au moins 5,000 gènes ($n' \geq 5,000$).

Trois listes de gènes, ou signatures, ont été choisies afin d'évaluer le phénotype de TEM : la signature « TEM Hallmark » de MSigDB [313], ainsi que les signatures pan-cancer « Mésoenchymateuse » et « Epithéliale » de Tan *et al.* [314]. Comme attendu, les gènes inclus dans les signatures « TEM Hallmark » et « Mésoenchymateuse » se recoupent nettement (fig 7). Les symboles des gènes inclus dans les deux signatures pan-cancer ont été mis à jour avec le package R biomaRt. Les gènes SNAI1/2, ZEB1/2, TWIST1, GRHL2 et OVOL1/2 ont été retirés de ces trois signatures lorsqu'ils étaient inclus, de façon à ce que les scores calculés soient indépendants de l'expression de ces facteurs de transcription. Les gènes GRHL2 et OVOL1/2 codent pour des facteurs de transcription majeurs du phénotype épithélial. Bien que leur étude ait été initialement prévue conjointement à celle des FT de la TEM, elle n'a pas été incluse à ce travail.

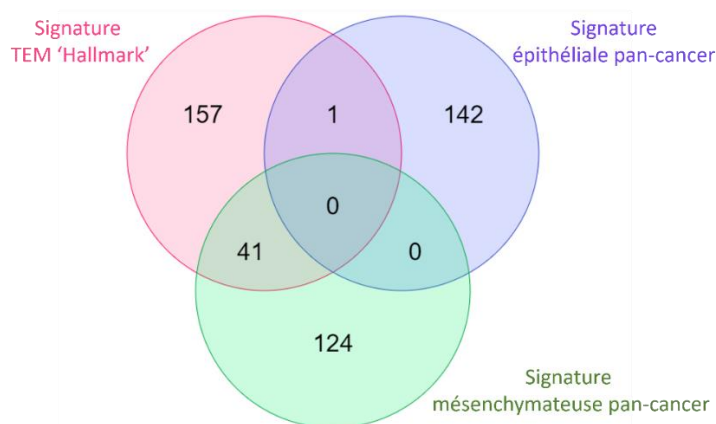


Figure 7 : Recoupement entre les trois signatures utilisées pour caractériser le phénotype de transition épithélio-mésenchymateuse. Les deux signatures évaluant le phénotype mésoenchymateux se recoupent partiellement entre elles, mais ne se recoupent pas avec la signature épithéliale à l'exception d'un gène.

L'association entre les scores calculés et les autres variables quantitatives (niveaux d'expression, estimations de pureté) a été testée avec la corrélation de Spearman en utilisant la fonction `cor.test` du package R `stats` (version 4.0.4). Les p-values initiales ont été corrigées pour la réalisation de tests multiples selon la méthode de Bonferroni. La comparaison des estimations de pureté entre tumeurs appartenant à différents sous-types moléculaires a été réalisée avec le test de Mann-Whitney.

Analyse intra-tumorale ou 'single-cell' : regroupement par clusters et expression différentielle entre clusters

Les étapes décrites ci-après ont été réalisées sur les cellules malignes uniquement. Des scores pour les trois signatures « TEM Hallmark », « Mésoenchymateuse », « Epithéliale » ont été calculés à l'échelle de la cellule comme décrit précédemment. Le regroupement des cellules malignes en clusters a été réalisé avec les fonctions « `FindNeighbors` » et « `FindClusters` » du package R `Seurat` (version 4.0.1), après optimisation de la résolution et du nombre de composantes selon la méthode de la silhouette [315].

La comparaison des scores entre clusters a été réalisée avec le test de Mann-Whitney, et les p-values initiales ont été corrigées selon la méthode de Bonferroni. L'analyse d'expression différentielle entre clusters a été réalisée avec la fonction « `FindAllMarkers` » du package R `Seurat`. Les FT majeurs de la TEM n'ont été testés que s'ils étaient détectés dans plus de 20 % des cellules d'au moins un cluster (soit `min.pct = 0,2`). Pour les autres paramètres que « `min.pct` », les réglages par défaut ont été conservés. Les p-values initiales ont ensuite été corrigées pour la réalisation de tests multiples selon la méthode de Bonferroni.

Dissociation des échantillons FFPE et tri cellulaire

Des échantillons FFPE de OSCC canins ont été sélectionnés à partir d'une cohorte rétrospective déjà constituée [3]. Les critères de pré-sélection incluaient une localisation dans la cavité orale, la présence d'un stroma intra-tumoral relativement abondant autre que fibro-collagénique, la réalisation préalable d'analyses IHC, et l'absence de tissu osseux. La sélection finale a été réalisée après examen microscopique de coupes colorées à l'Hémalun-Eosine (HE).

La dissociation a été effectuée à partir de huit sections de 50µm d'épaisseur, après élimination des premiers 100µm pour limiter les effets de l'exposition de longue durée à l'air. La dissociation a été réalisée avec le kit « `Miltenyi Biotec FFPE dissociation` » selon le protocole du fabricant (référence 130-118-052). Brièvement, les sections de tissu FFPE ont été déparaffinées, et dissociées en une suspension de cellules uniques via une action mécanique (appareil `Gentleman`) et via une dégradation enzymatique de la matrice extra-cellulaire. Après dissociation, la suspension a été appliquée à un filtre de 70µm pour retirer les grosses particules restantes. Les cellules obtenues ont été dénombrées avec une lame de Malassez.

Pour le tri cellulaire, la suspension cellulaire a été suspendue dans 500µL de tampon W avec du DAPI (`Miltenyi Biotec`, référence 130-111-570) à une concentration finale de 0,8 µg/mL. Les cellules DAPI-positives (DAPI+) ont été triées avec un BD `FACS Aria III`, et l'acquisition analysée avec `FlowJo` (version 10.7.2). Les cellules DAPI+ ont été lavées avec du PBS1X et centrifugées à 226g pendant 5 min à 4°C, et ce à deux reprises. Le culot cellulaire a ensuite été

suspendu dans 200 μ L de tampon de lyse LBA (Beckman Coulter, FormaPure RNA kit, référence PN C21005AC) et conservé à -80°C sur la nuit.

Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN a été effectuée sur l'échantillon préalablement préparé, avec le kit « Beckman Coulter FormaPure RNA » selon le protocole du fabricant (référence PN C21005AC), mais sans réaliser les deux premières parties du protocole (Préparation de l'échantillon et déparaffinage).

La qualité finale des ARN a été évaluée avec un Agilent 4200 TapeStation system et le logiciel d'analyse TapeStation (version 3.2).

II. Résultats

La carcinogénèse est associée à de fortes signatures immunitaires et de Transition Epithélio-mésenchymateuse dans les jeux de données humains et canins

Afin d'identifier des changements d'expression associés au processus de carcinogénèse, nous avons réalisé une analyse d'expression différentielle entre échantillons sains et néoplasiques, dans un jeu de données humain (« TCGA ») [15] et deux jeux canins (« Liu » et « Guscetti ») [4,5]. Les résultats d'expression différentielle ont ensuite été utilisés pour une analyse fonctionnelle par 'Gene Set Enrichment Analysis' (GSEA) des signatures 'Hallmark Pathways' de MSigDB [313]. L'analyse par GSEA était globalement concordante entre les différents jeux de données, avec 33 des 50 signatures ayant un score d'enrichissement normalisé (Normalized Enrichment Score, NES) avec un signe conservé dans les trois jeux de données (données non montrées). Les sept signatures suivantes étaient fortement enrichies (NES > 1,5) dans les tumeurs de tous les jeux de données : 'TEM', 'cibles de la famille E2F', 'réponse à l'interféron (IFN) α ', 'réponse à l'IFN γ ', 'angiogénèse', 'réponse inflammatoire', et 'rejet d'allogreffe'. La signature TEM faisait partie des trois signatures les plus enrichies dans tous les jeux de données (fig 8).

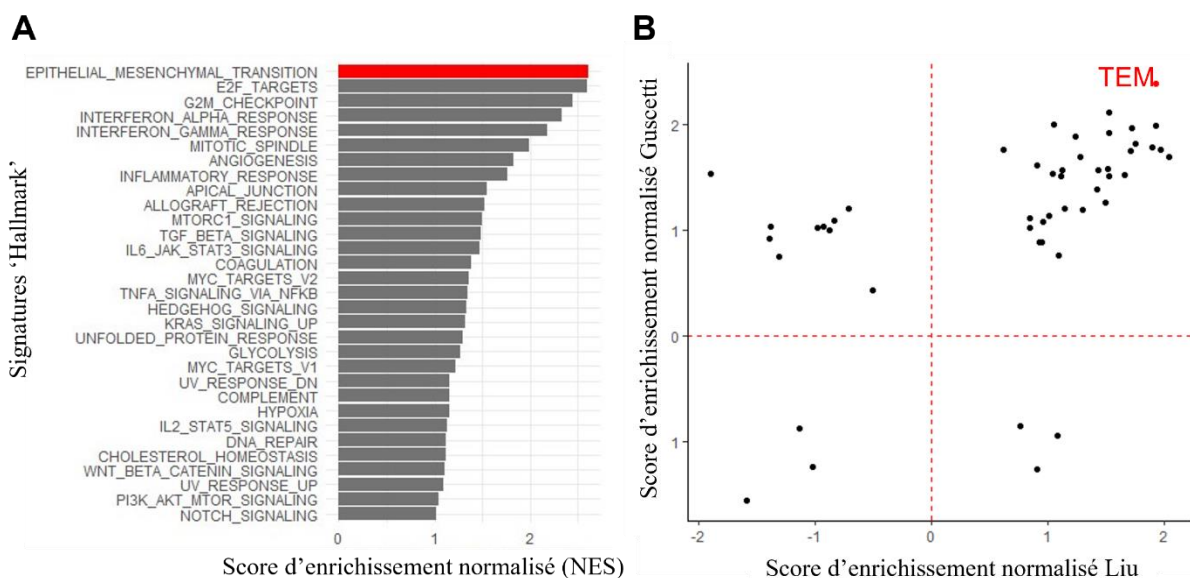


Figure 8 : La comparaison des tissus sains et tumoraux dans les jeux de données canins et humains révèle un enrichissement concordant de la transition épithélio-mésenchymateuse dans les échantillons néoplasiques. (A) 'Fast pre-ranked Gene Set Enrichment Analysis' (fGSEA) des signatures 'Hallmark' entre les échantillons normaux et tumoraux du jeu de données du TCGA. Un score d'enrichissement normalisé positif (Normalized Enrichment Score, NES) indique un enrichissement de la signature correspondante dans les tumeurs, par comparaison avec les échantillons sains. Seules les signatures 'Hallmark' avec NES > 1 sont montrées ici. Le résultat pour la signature TEM 'Hallmark' est mis en valeur en rouge. (B) Comparaison des résultats des analyses par fGSEA des signatures 'Hallmark' entre les deux jeux de données canins (Liu et Guscetti). Un score d'enrichissement normalisé positif indique un enrichissement de la signature correspondante dans les tumeurs du ou des jeux de données correspondants. Les résultats pour la signature TEM 'Hallmark' sont mis en valeur par un point rouge.

Les jeux de données se distinguent par leur profils d'expression différentielle des facteurs de transcription majeurs de la transition épithélio-mésenchymateuse

Afin d'évaluer si l'enrichissement dans la signature TEM était associé à des variations dans l'expression des cinq Facteurs de Transcription (FT) majeurs de la TEM, SNAI1/2, TWIST1 et ZEB1/2, nous avons examiné les résultats de l'analyse d'expression différentielle pour ces gènes. Aucun de ces cinq gènes n'était significativement sous-exprimé dans les tumeurs, et ce, quel que soit le jeu de données (fig 9). Au contraire, trois gènes (SNAI1, SNAI2 et ZEB2) étaient significativement sur-exprimés dans les tumeurs par rapport au tissu sain dans au moins un jeu de données (fig 9), ce qui est cohérent avec l'enrichissement de la signature TEM dans les tumeurs. Cependant, les profils d'expression différentielle se distinguaient entre jeux de données : SNAI1 était significativement surexprimé dans le jeu de Liu, SNAI2 dans celui du TCGA, et ZEB2 dans celui de Guscetti (fig 9).

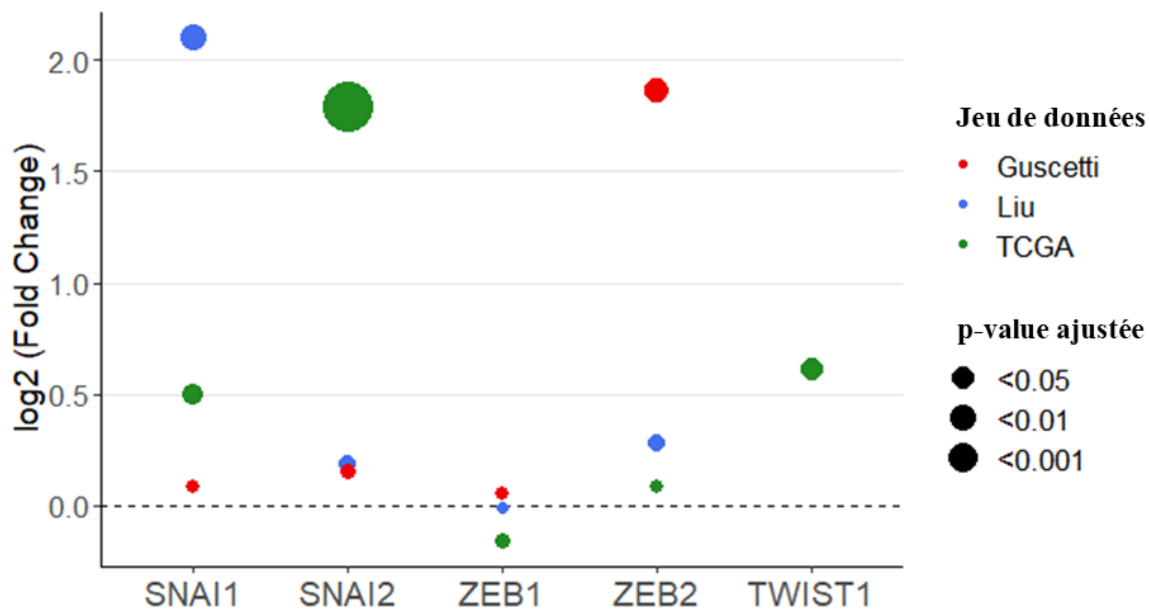


Figure 9 : Les différents jeux de données analysés présentent des spécificités dans l’expression différentielle des facteurs de transcription majeurs de la transition épithélio-mésenchymateuse. Représentation de l’expression différentielle des FT majeurs de la TEM entre échantillons normaux et tumoraux, dans les trois jeux de données. Les valeurs de ‘log2(Fold Change)’ (log2(FC)) correspondent aux log2(FC) réduits selon l’estimateur ‘ashr’. Une valeur positive de log2(FC) indique une surexpression relative dans les tumeurs, par rapport aux échantillons normaux. L’expression différentielle a été testée avec DESeq2, en utilisant le seuil de 0,05 pour la p-value ajustée (padj). La taille des points représentés est inversement proportionnelle à la p-value ajustée pour le gène et la cohorte correspondants. Aucune donnée n’a pu être obtenue pour le gène TWIST1 dans les jeux de données canins, ce gène n’étant pas annoté par ENSEMBL dans le génome CanFam3.1.

Les OSCC humains et canins présentent une hétérogénéité inter-tumorale dans leur « phénotype » TEM et dans l’expression des facteurs de transcription majeurs de la TEM, en lien avec la composition des tumeurs

Afin d’évaluer si les résultats de l’analyse d’expression différentielle ont pu être influencés par une hétérogénéité inter-échantillons, nous avons analysé l’expression des cinq FT majeurs de la TEM à l’échelle de l’échantillon. En parallèle, nous avons estimé un phénotype TEM à l’échelle de l’échantillon, en calculant des scores pour trois signatures: la signature ‘TEM Hallmark’ de MSigDB [313], ainsi que les signatures ‘Mésenchymateuse’ et ‘Epithéliale’ de Tan *et al.* [314]. Dans le jeu de données du TCGA, à la fois les échantillons sains et néoplasiques présentaient une hétérogénéité dans leurs scores pour ces signatures, ainsi que dans l’expression des FT majeurs de la TEM (fig 10A). Dans les échantillons normaux, le score ‘TEM Hallmark’ corrélait positivement avec le niveau d’expression des cinq FT (test de corrélation de Spearman unilatéral, p-value ajustée < 0,001) (fig 10A). Cependant, ce score corrélait également négativement avec la pureté des tumeurs, définie comme la proportion de cellules malignes au sein d’un échantillon (test de corrélation de Spearman unilatéral, p-value ajustée < 0,001). Cela appuie l’idée que la composition cellulaire des tumeurs soit un facteur de confusion au moment d’évaluer à la fois un phénotype TEM et l’expression des FT étudiés. De même, l’hétérogénéité observée au sein des échantillons normaux pourrait refléter des différences de ratio entre tissu épithélial et mésenchymateux dans chaque échantillon. Ces différences de composition pourraient vraisemblablement affecter les résultats précédents d’expression différentielle. De

façon intéressante, nous avons également observé dans le jeu du TCGA que la pureté des OSCC du sous-type moléculaire 'Mesenchymal' était significativement inférieure à la pureté des OSCC attribués à d'autres sous-types moléculaires (Test de Mann-Whitney unilatéral, p-value < 0,001) (fig 10A).

Comme dans le jeu du TCGA, les échantillons sains et tumoraux du jeu de Liu présentaient une hétérogénéité dans les scores pour ces trois signatures, et l'expression des FT majeurs de la TEM tendait à corrélérer positivement avec le score 'TEM Hallmark', bien que non significativement (test de corrélation de Spearman bilatéral, p-value ajustée > 0.05) (fig 10B). Une telle analyse n'a pas pu être réalisée avec le jeu de Guscetti, la moindre profondeur de séquençage limitant la pertinence de l'étude du niveau d'expression de certains gènes à l'échelle de l'échantillon (annexe 1).

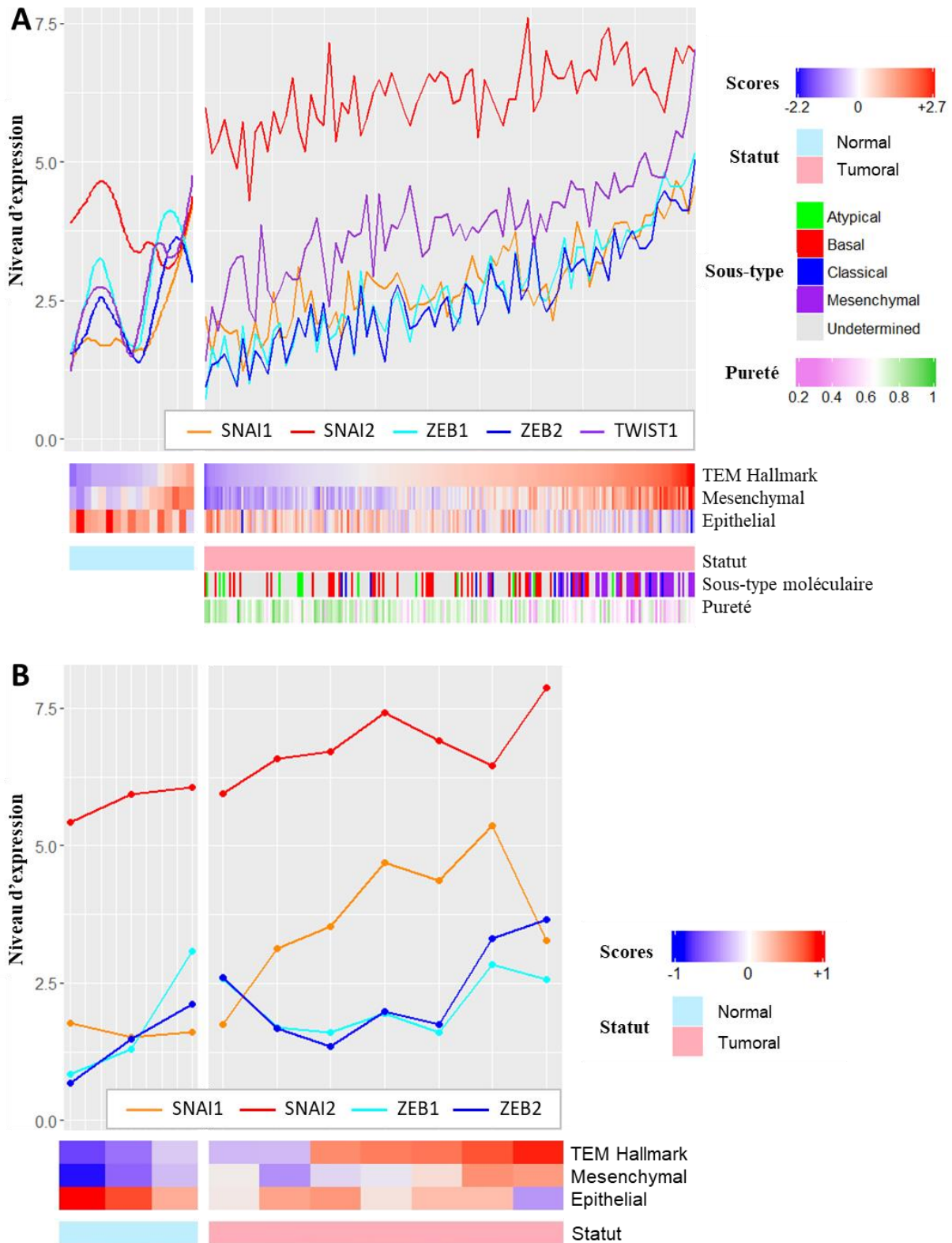


Figure 10 : A l'échelle de l'échantillon, l'enrichissement dans la signature TEM est associé à une augmentation de l'expression des facteurs de transcription majeurs de la TEM et/ou à une diminution de la pureté des tumeurs dans les jeux de données humain et canin. Pour les deux jeux de données, les échantillons ont été séparés selon leur statut (normal ou tumoral), et ordonnés selon leur score 'TEM Hallmark' adapté. (A) Les courbes montrent l'expression lissée (régression linéaire locale par fenêtre de 10 échantillons) en $\log_2(\text{TPM}+1)$ des FT majeurs de la TEM dans le jeu de données du TCGA. Pour chaque échantillon, le sous-type moléculaire et la pureté sont également représentés quand disponibles. L'estimation de la pureté des tumeurs correspond ici à la

mesure consensus dérivée (CPE) du TCGA. (B) Les courbes montrent le niveau d'expression en $\log_2(\text{TPM}+1)$ des FT majeurs de la TEM dans le jeu de données de Liu.

Le «phénotype» TEM reste associé à l'expression des facteurs de transcription majeurs de la TEM indépendamment de la pureté des tumeurs

La pureté des tumeurs ayant été identifiée comme un potentiel facteur de confusion pour l'étude de la TEM dans le jeu du TCGA, nous avons répété notre analyse sur une sélection de 59 OSCC du TCGA, correspondant aux 25 % de tumeurs avec les plus hautes estimations de pureté. De façon intéressante, cette sélection présentait également une hétérogénéité dans le « phénotype » TEM (fig 11), tandis que le score 'TEM Hallmark' ne corrélait plus significativement avec la pureté des tumeurs (test de corrélation de Spearman bilatéral, p-value ajustée > 0,05). De plus, le score 'TEM Hallmark' restait positivement corrélé à l'expression des cinq FT majeurs de la TEM (test de corrélation de Spearman unilatéral, p-value ajustée < 0,001) dans cette sélection de tumeurs (fig 11). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que les différences observées en lien avec la TEM reposent au moins partiellement sur des différences de processus biologiques au sein des cellules malignes, et non uniquement sur la pureté des tumeurs.

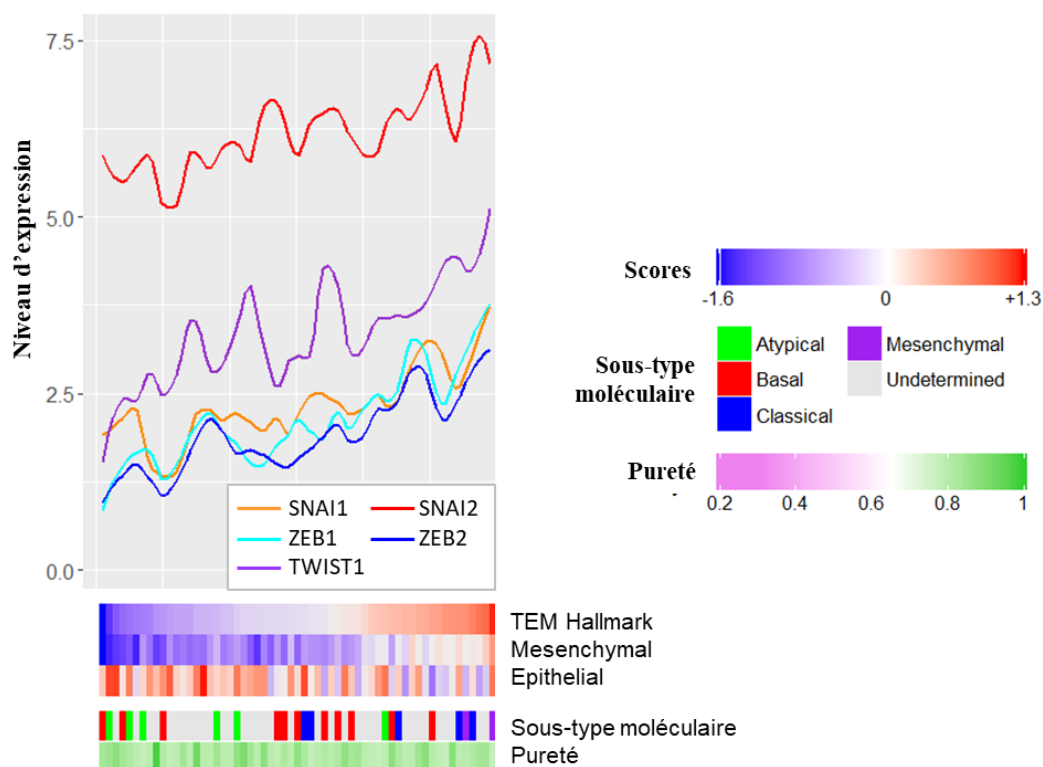


Figure 11 : L'enrichissement dans la signature TEM reste associé à une augmentation de l'expression des facteurs de transcription majeurs de la TEM dans des tumeur avec de hautes estimations de pureté. Les 59 (soit 25 %) OSCC du TCGA avec les plus hautes estimations de pureté ont été sélectionnés et ordonnés selon leur score 'TEM Hallmark' adapté. L'estimation de la pureté des tumeurs correspond ici à la mesure consensus dérivée (CPE) du TCGA. Les courbes montrent l'expression lissée (régression linéaire locale par fenêtre de 10 échantillons) en $\log_2(\text{TPM}+1)$ des FT majeurs de la TEM dans ces 59 échantillons. Le sous-type moléculaire est également représenté quand disponible.

Les cellules malignes uniques présentent une hétérogénéité inter- et intra-tumorale vis-à-vis du « phénotype » TEM et de l'expression des facteurs de transcription

Afin de prendre en compte l'influence potentielle de l'hétérogénéité intra-tumorale vis-à-vis du phénotype TEM et de l'expression des FT majeurs de la TEM, nous avons analysé un jeu de données humain 'single-cell' [12,16]. De manière concordante avec ce qui a pu être observé précédemment, les patients de ce jeu de données présentaient une hétérogénéité inter-tumorale vis-à-vis des trois signatures étudiées (fig 12). De plus, le degré d'hétérogénéité intra-tumorale variait entre patients, que ce soit en considérant la signature 'TEM Hallmark' (fig 12) ou les deux autres (données non montrées). A l'exception de SNAI2, qui était détecté à des niveaux relativement élevés dans la plupart des cellules malignes, les autres FT étaient faiblement exprimés ou non détectés chez la plupart des patients (données non montrées). Cela est cohérent avec les résultats des analyses 'bulk' précédentes, dans lesquelles SNAI2 était exprimé à des niveaux relativement élevés dans les échantillons normaux et tumoraux par comparaison avec les autres FT (fig 10 et 11).

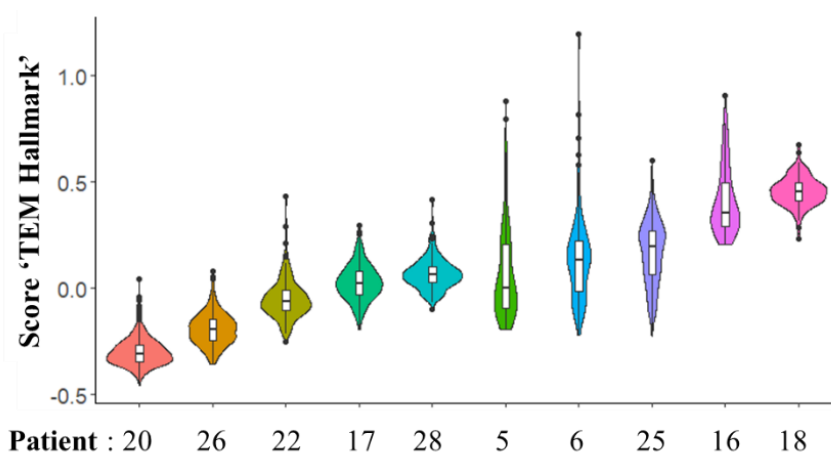


Figure 12 : Les cellules malignes présentent une hétérogénéité inter- et intra-tumorale vis-à-vis des signatures en lien avec la transition épithélio-mésenchymateuse. Représentation des scores 'TEM Hallmark' des cellules malignes des 10 patients du jeu de données de Xiao *et al.* (i.e. données de Puram *et al.* corrigées et normalisées par Xiao *et al.*)

Afin d'évaluer l'hétérogénéité intra-tumorale vis-à-vis du phénotype TEM, nous avons ensuite considéré individuellement les patients n°5, 6 et 25, qui présentaient une plus grande hétérogénéité intra-tumorale vis-à-vis des scores calculés (fig 12), et pour lesquels un nombre raisonnable de cellules malignes était disponible (entre 123 et 209 cellules pour chaque patient). Chez ces patients, l'expression des FT majeurs de la TEM ne corrélait positivement qu'occasionnellement avec le score 'TEM Hallmark' (test de corrélation de Spearman). De plus, les trois signatures en lien avec la TEM n'étaient pas clairement concordantes, notamment la signature 'Epithelial' avec les deux autres signatures (fig 13A).

Afin d'aller plus loin, nous avons ensuite réalisé une analyse non supervisée basée sur les 465 gènes inclus dans les trois signatures précédentes, sur les cellules malignes de chaque patient. Le regroupement non supervisé des cellules malignes a mis en évidence deux clusters de cellules pour chaque patient, comme illustré dans la figure 13B pour un patient représentatif (n°25). Chez ce patient, les deux clusters différaient significativement vis-à-vis de leurs scores

pour les trois signatures étudiées (test de Mann-Whitney bilatéral, p-value ajustée < 0,01), avec des variations cohérentes des trois signatures (fig 13C), distinguant donc des clusters respectivement plus « épithélial » et « mésenchymateux ». Des résultats similaires ont été obtenus avec les patients n°5 et 6 (données non montrées). De façon intéressante chez le patient n°25, le regroupement et donc l'hétérogénéité vis-à-vis de la TEM semblaient être essentiellement déterminés par la perte d'expression de gènes épithéliaux, plutôt que par l'augmentation de l'expression de gènes mésenchymateux (fig 13A et 13C). Concernant l'expression différentielle des FT majeurs de la TEM entre clusters, SNAI2 était significativement surexprimé dans le cluster le plus « mésenchymateux » chez les trois patients analysés (test de Mann-Whitney bilatéral, p-value ajustée < 0,01), comme illustré dans la figure 13D pour un patient représentatif (n°25). Les autres FT majeurs de la TEM n'ont pas pu être analysés de manière fiable du fait de leur faible niveau d'expression dans la grande majorité des cellules malignes de ces trois patients (données non montrées).

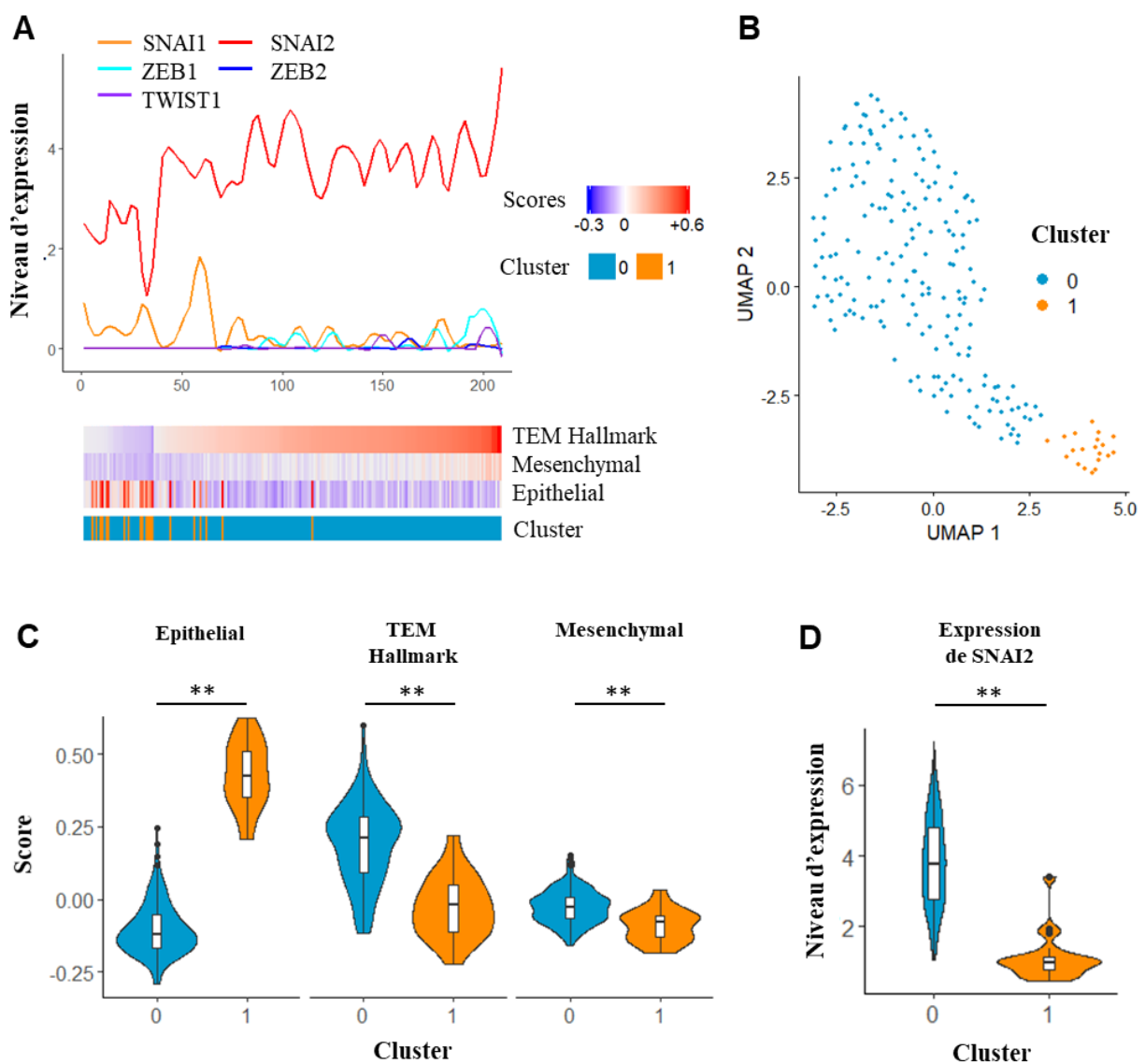


Figure 13 : L'analyse des données 'single-cell' permet l'identification de sous-populations de cellules malignes avec des caractéristiques spécifiques vis-à-vis de la transition épithélio-mésenchymateuse. (A) Les cellules malignes d'un patient représentatif (n°25) ont été ordonnées selon leur score 'TEM Hallmark' adapté. Les courbes montrent l'expression lissée

(régression linéaire locale par fenêtre de 20 cellules) en $\log_2(\text{TPM}+1)$ des FT majeurs de la TEM dans les cellules malignes correspondantes. Le cluster attribué à chaque cellule est également représenté. (B) Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) des cellules malignes d'un patient représentatif (n° 25), sur la base de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) des gènes inclus dans les trois signatures étudiées. Les clusters sont le résultat d'un regroupement non supervisé réalisé avec Seurat, après optimisation de la résolution et du nombre de composantes avec la méthode de la silhouette. (C) Scores calculés pour les cellules malignes d'un patient représentatif (n°25), selon leur cluster précédemment attribué. La comparaison des distributions des scores entre clusters a été réalisée avec le test de Mann-Whitney, suivi par une correction des p-values selon la méthode de Bonferroni (** = p-value ajustée < 0.001). (D) Niveau d'expression en $\log_2(\text{TPM}+1)$ du gène SNAI2 dans les cellules malignes du patient n°25, selon leur cluster précédemment attribué. L'expression différentielle a été testée avec la fonction FindAllMarkers de Seurat, suivi par une correction des p-values selon la méthode de Bonferroni (** = p-value ajustée < 0.001).

Un protocole approprié permet la dissociation d'échantillons FFPE de carcinomes épidermoïdes de la cavité orale en éléments cellulaires individuels

A ce jour, il n'existe pas de données RNAseq 'single-cell' pour des OSCC canins, une difficulté pour cela étant entre autres la disponibilité de tissus frais, sur lesquels les techniques actuelles sont basés. Afin de surmonter cette problématique, et avec l'objectif à long terme de réaliser du RNAseq 'single-cell', nous avons évalué la faisabilité d'isoler des suspensions cellulaires de qualité appropriée à partir d'échantillons de OSCC canins, sur la base d'une procédure déjà établie au laboratoire pour des tumeurs humaines. L'échantillon FFPE canin analysé ici était un carcinome épidermoïde lingual bien différencié provenant d'un Epagneul Breton mâle de 9 ans. Des sections de l'échantillon ont été colorées à l'Hémalun-Eosine (HE), montrant la présence à la fois de tissu néoplasique et de stroma (fig 14A). La dissociation enzymatique et mécanique avec le kit Miltenyi 'FFPE tissue dissociation' a permis de générer une suspension cellulaire d'environ 900,000 éléments cellulaires individuels à partir de sections de l'échantillon FFPE. Le nombre final de cellules était limité, surtout en comparaison de tentatives précédentes sur des échantillons FFPE de OSCC humains (données non montrées), ce qui est vraisemblablement dû à la plus petite taille de l'échantillon canin. Les cellules dissociées ont ensuite été colorées avec du DAPI pour sélectionner spécifiquement les cellules « intactes » contenant un noyau, et les cellules DAPI-positives ont été triées sur un BD FACSARIA III (fig 14B). Afin d'évaluer la qualité et la quantité d'ARN obtenue, nous avons ensuite réalisé une extraction d'ARN « bulk » sur la population DAPI-positive. La quantité d'ARN extraite était trop faible pour être quantifiée sur un système Agilent 4200 TapeStation (données non montrées) et n'a pas pu être analysée au-delà. Par conséquent, il est possible de générer des suspensions de cellules uniques à partir d'échantillons FFPE de OSCC canins, mais la procédure nécessite d'être optimisée pour le séquençage ARN.

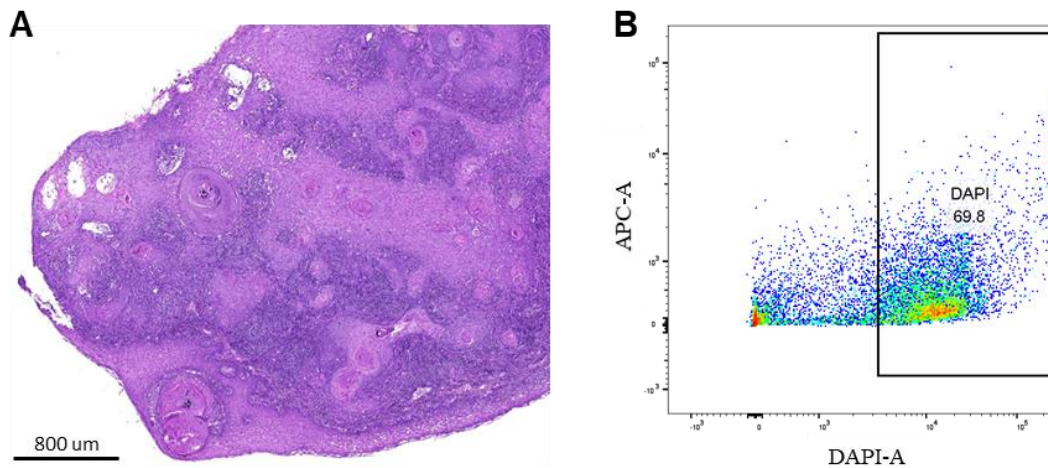


Figure 14 : Dissociation en éléments cellulaires individuels et tri cellulaire à partir d'un carcinome épidermoïde oral canin. (A) Coloration à l'Hémalun-Eosine de l'échantillon de carcinome épidermoïde lingual canin sélectionné pour la dissociation. (B) Visualisation de la population DAPI-positive pendant le tri des cellules intra-tumorales dissociées.

III. Discussion

Modifications observées au sein des OSCC humains et canins par rapport au tissu normal

L'analyse par fgSEA a mis en évidence une concordance importante entre les trois jeux de données, vis-à-vis des signatures enrichies dans les échantillons néoplasiques par rapport aux échantillons normaux. Cela est d'autant plus marquant qu'il s'agit de différentes espèces (Homme et Chien), et différents types d'échantillons (échantillons entiers dans le jeu du TCGA, tissu néoplasique macroscopiquement disséqué dans celui de Liu, et tissu épithélial microdisséqué dans celui de Guscetti). Cela renforce l'hypothèse que les signatures concordantes reflètent des processus importants au sein des OSCC chez l'Homme et le Chien. La variation de la pureté des échantillons considérés – avec plusieurs niveaux de (micro)dissection – suggère de plus que les signatures concordantes reflètent des processus impliquant les cellules néoplasiques, et pas seulement les cellules stromales. Parmi les signatures concordantes, la signature TEM faisait partie des trois signatures les plus enrichies dans tous les jeux de données, suggérant que la TEM est un processus clé associé à la carcinogenèse dans les OSCC humains et canins.

Toujours en comparant tumeurs et tissu normal, nous avons observé que les profils d'expression différentielle des cinq FT majeurs de la TEM différaient entre jeux de données. En effet SNAI1 était significativement surexprimé dans le jeu de Liu, SNAI2 dans celui du TCGA, et ZEB2 dans celui de Guscetti. Pour autant aucun n'était significativement sous-exprimé dans les tumeurs, quel que soit le jeu de données. Une explication possible à ces observations est que différents FT majeurs dominent l'induction du phénotype de TEM dans ces différents jeux de données, comme déjà suggéré [5]. Alternativement, il est possible que malgré des modes de régulation similaires entre cohortes, le manque de sensibilité et de puissance statistique empêche l'identification de tous les gènes différentiellement exprimés

dans certains jeux de données. Dans ce cas de figure, on s'attendrait à ce qu'un gène significativement surexprimé dans une cohorte avec peu de puissance statistique soit également significativement surexprimé dans les cohortes avec plus de puissance statistique (comme celle du TCGA). Ce n'est cependant pas ce que l'on observe, ce qui rend cette hypothèse peu plausible comme seul facteur explicatif des différences observées entre jeux de données. Enfin une explication possible à notre observation est qu'il existe une hétérogénéité entre échantillons tumoraux et/ou normaux, d'où une variation des résultats obtenus selon la composition de la cohorte. C'est notamment cette hypothèse que nous avons étudié dans la suite de notre travail.

Etude de l'hétérogénéité inter-tumorale des OSCC humains et canins

Dans notre étude, l'expression des cinq FT majeurs de la TEM – SNAI1/2, TWIST1, ZEB1/2 – corrélait significativement avec la signature TEM dans les OSCC humains du TCGA. Une tendance similaire a pu être observée dans les OSCC canins du jeu de données de Liu, dans lequel le nombre d'échantillons limite cependant la puissance de l'analyse. Une différence importante dans les jeux de données canins consiste en l'absence d'information sur l'expression de TWIST1. En effet, et bien que TWIST1 soit référencé chez le Chien [4,316], ce gène n'est pas présent et/ou annoté par ENSEMBL [317] dans le génome de référence CanFam3.1. Plus généralement, le génome canin n'est pas aussi bien connu et décrit que le génome humain. Cela constitue un défi supplémentaire dans les études basées sur le RNAseq chez le Chien comme cela diminue la proportion de lectures ('reads') susceptibles d'être alignées au génome, et donc la proportion de lectures informatives. Tandis que de précédentes publications ont proposé des FT candidats en tant que régulateurs principaux de la TEM au sein des OSCC [4,5,8–12], nos résultats invitent à la prudence quant à l'importance relative des FT majeurs de la TEM. En effet, nous avons observé qu'à la fois les échantillons sains et tumoraux montraient une hétérogénéité vis-à-vis de l'expression des FT majeurs de la TEM, ce qui est susceptible d'influencer les résultats de toute comparaison entre tissu sain et tumoral, en fonction de la composition de la cohorte.

Au cours de l'analyse du jeu de données du TCGA, la pureté des tumeurs corrélait négativement avec la signature TEM, mettant en évidence la pureté comme un facteur de confusion potentiellement crucial dans l'étude de la TEM et de sa régulation. En effet les échantillons humains du TCGA, et canins du jeu de Liu, n'ont pas été microdisséqués. Par conséquent leurs profils d'expression génétiques représentent le profil d'expression moyen des cellules malignes et du micro-environnement. De façon intéressante, nous avons également observé que la pureté des OSCC humains du sous-type moléculaire 'Mesenchymal' était significativement inférieure à la pureté des OSCC attribués à d'autres sous-types moléculaires. Cela soutient l'idée déjà proposée que le sous-type 'Mesenchymal' reflèterait – au moins en partie – une plus grande proportion de cellules non néoplasiques mésenchymateuses dans l'échantillon. Puram *et al.* ont ainsi estimé qu'en faisant abstraction des cellules stromales, les cellules néoplasiques des échantillons de sous-type 'Mesenchymal' avaient un profil d'expression correspondant au sous-type 'Basal' (ou 'Malignant-Basal') [12].

Pour aller plus loin, nous avons pu sélectionner une sous-population d'OSCC humains avec de hautes estimations de pureté. Au sein de ces tumeurs, l'expression des FT majeurs de la TEM continuait de corrélait significativement avec la signature TEM, ce qui indique que les variations de pureté tumorale n'expliquent pas toutes les variations observées dans le phénotype TEM et dans sa régulation. Au contraire, les variations indépendantes du micro-environnement reflètent vraisemblablement un processus de TEM des cellules malignes, processus associé à

l'augmentation de l'expression des cinq FT majeurs de la TEM à l'échelle de la tumeur. En plus de prendre en compte les estimations de pureté tumorale, une autre approche intéressante pour acquérir des informations centrées sur le tissu néoplasique est d'utiliser des données de tissu néoplasique microdisséqué, comme dans le jeu canin de Guscetti *et al.* [5]. Cependant la profondeur de séquençage dans les échantillons microdisséqués du jeu de Guscetti limitait les possibilités d'étude de l'expression des FT de la TEM à l'échelle de l'échantillon.

Etude de l'hétérogénéité intra-tumorale des OSCC humains

En utilisant des données RNAseq 'single-cell' pour étudier l'hétérogénéité entre cellules, en lien avec le processus de TEM, nous avons identifié des sous-populations de cellules malignes chez des patients individuels, avec des caractéristiques respectivement plus épithéliales ou mésenchymateuses. Cela est cohérent avec l'idée que la TEM n'est ni un phénomène global se produisant dans toutes les cellules malignes d'une tumeur, ni un processus binaire entre deux états opposés [187,318]. Les sous-populations avec un profil moins épithélial et/ou plus mésenchymateux avaient également une expression plus importante de SNAI2. Les autres FT majeurs de la TEM n'ont quant à eux pas été détectés, ou seulement à un faible niveau, dans la plupart des cellules malignes. Par conséquent, une possibilité est que la TEM soit influencée principalement par SNAI2 dans les cellules malignes de ces patients. Cependant, les technologies de RNAseq 'single-cell' ne permettent actuellement qu'une faible profondeur de séquençage par cellule, ce qui entraîne une mauvaise sensibilité pour les gènes qui ne sont pas fortement exprimés dans une cellule donnée. Par conséquent, et compte-tenu du fait que SNAI2 était exprimé à des niveaux relativement élevés dans les échantillons 'bulk' de notre analyse par comparaison aux autres FT, il est difficile d'exclure l'implication des autres FT majeurs de la TEM chez les patients de ce jeu de données. Notre caractérisation du phénotype TEM à l'échelle de la cellule unique reste préliminaire, et un travail plus précis est nécessaire afin d'identifier plus clairement la dynamique et les états intermédiaires de la TEM dans les OSCC.

Dissociation d'échantillons FFPE de carcinomes épidermoïdes oraux

Il n'y a actuellement pas de données de RNAseq 'single-cell' pour les OSCC Canins. Vis-à-vis de la dissociation des échantillons FFPE, nous avons réussi à obtenir des suspensions cellulaires à partir d'un échantillon de OSCC canin, comme cela avait pu être fait pour des OSCC humains au sein du laboratoire. Cependant, une problématique émergeant de ces expériences préliminaires est la quantité finale d'ARN obtenue, relativement faible par rapport à la quantité de cellules extraites. Hormis des difficultés techniques au cours du processus d'extraction, nous devrions également considérer des difficultés spécifiques de cette procédure. En effet, dissocier des cellules dans l'optique de réaliser du séquençage ARN 'single-cell' n'a jamais été réalisé à notre connaissance. Par exemple, il est possible qu'une partie de l'ARN soit libéré des cellules pendant ou après le processus de dissociation, et qu'il soit donc perdu avant l'extraction d'ARN. La réalisation de l'extraction d'ARN sur échantillon frais et/ou échantillon FFPE non dissocié auraient fourni des contrôles pertinents afin de préciser la nature du problème. Bien que présentant un défi certain, développer une technologie permettant du RNAseq 'single-cell' à partir d'échantillons FFPE présenterait des avantages significatifs par rapport au RNAseq 'single-cell' conventionnel. En particulier, travailler sur échantillons FFPE faciliterait grandement le recrutement des cas, et pourrait limiter les modifications dans les profils d'expression des cellules vivantes.

CONCLUSION

Les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (HNSCC) affectent aussi bien l'Homme que le Chien. Ils représentent un défi important dans ces deux espèces, de par la morbidité et mortalité qui leur sont associées. Bien que de même origine histologique, les HNSCC sont un groupe hétérogène de cancers. En particulier, leur localisation primaire affecte leur comportement biologique, le pronostic, ainsi que les possibilités thérapeutiques. Il est crucial que les futures études fournissent des informations précises sur la localisation des HNSCC étudiés, et s'accordent quant aux définitions des différentes régions de la tête et du cou (cavité orale et oropharynx en particulier).

Au sein de la cavité orale spécifiquement, les carcinomes épidermoïdes sont des cancers prééminents chez l'Homme (plus de 90 % des cancers oraux) et chez le Chien (18-28 % des cancers oraux). Les OSCC dans ces deux espèces présentent par ailleurs de nombreuses similarités au plan histologique et transcriptomique. Leur comportement biologique est également similaire, avec une forte agressivité locale tandis que les métastases sont tardives. La prise en charge de ces cancers repose majoritairement sur la chirurgie et la radiothérapie. Des approches complémentaires peuvent être utilisées, notamment en cas de métastases ou de tumeur non résécable. Celles-ci incluent la chimiothérapie, les thérapies ciblées voire l'immunothérapie qui prend une place de plus en plus importante chez l'Homme.

L'objectif principal de notre étude expérimentale était d'investiguer la régulation de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) par les facteurs de transcription (FT) majeurs SNAI1/2, TWIST1, ZEB1/2 dans les OSCC humains et canins, à travers une analyse comparée de jeux de données RNAseq 'bulk' et 'single-cell'. Un second aspect de notre projet était de mettre au point une procédure permettant d'isoler des cellules uniques, à partir d'échantillons FFPE d'OSCC canins, avec l'objectif à long terme de réaliser du RNAseq single-cell à partir d'échantillons FFPE.

Notre étude a confirmé la présence d'une forte signature TEM dans les OSCC humains et canins, malgré une importante variabilité inter-échantillons. A l'échelle de la tumeur, la signature TEM corrélait de plus avec l'expression de l'ensemble des FT majeurs étudiés. Dans les données humaines, la pureté des échantillons était un facteur de confusion potentiel pour l'étude de la TEM, mais n'expliquait pas l'ensemble des variations observées. A l'échelle de la cellule unique, nous avons pu observer que SNAI2 était surexprimé dans des sous-populations de cellules malignes humaines avec des caractéristiques plus mésenchymateuses et/ou moins épithéliales. Du fait du manque de sensibilité de la technologie 'single-cell', nous ne pouvons cependant exclure un rôle des autres FT majeurs de la TEM dans les cellules étudiées. Dans l'ensemble, nos résultats invitent donc à la prudence quant aux publications proposant un FT candidat comme régulateur principal de la TEM au sein des OSCC. Notre caractérisation du phénotype TEM à l'échelle de la cellule reste préliminaire, et un travail plus précis est nécessaire afin d'identifier la dynamique et les états intermédiaires de la TEM dans les OSCC. Par ailleurs, des approches complémentaires (IHC, hybridation *in situ*...) seraient pertinentes afin de préciser l'hétérogénéité et la distribution spatiale du processus de TEM au sein des tumeurs canines.

Vis-à-vis de la dissociation des échantillons FFPE, nous avons réussi à obtenir des suspensions cellulaires à partir d'un échantillon de OSCC canin. La quantité finale d'ARN obtenue était cependant plus faible qu'attendue, en faveur de difficultés techniques ou conceptuelles associées à l'extraction, et nécessitant d'être résolues pour le séquençage. Bien que présentant

un défi certain, développer une technologie permettant du RNAseq single-cell à partir d'échantillons FFPE présenterait des avantages significatifs par rapport au single-cell conventionnel. En particulier, travailler sur échantillons FFPE faciliterait grandement le recrutement des cas, et pourrait limiter les modifications dans les profils d'expression des cellules vivantes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Winn DM, Lee Y-CA, Hashibe M, Boffetta P, INHANCE consortium: **The INHANCE consortium: toward a better understanding of the causes and mechanisms of head and neck cancer.** *Oral Dis.* 2015, **21**:685–693. [doi: 10.1111/odi.12342] [PMID: 25809224]
2. Nemeč A, Murphy B, Kass PH, Verstraete FJM: **Histological subtypes of oral non-tonsillar squamous cell carcinoma in dogs.** *J. Comp. Pathol.* 2012, **147**:111–120. [doi: 10.1016/j.jcpa.2011.11.198] [PMID: 22300705]
3. Wynckel E: **Le Chien comme modèle des carcinomes épidermoïdes de la cavité orale de l'Homme non-fumeur et non-buveur: approche histologique et immunohistochimique.** Thèse de doctorat vétérinaire. Lyon : Université Claude-Bernard. 2018.
4. Liu D, Xiong H, Ellis AE, Northrup NC, Dobbin KK, Shin DM, Zhao S: **Canine Spontaneous Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Represent Their Human Counterparts at the Molecular Level.** *PLOS Genet.* 2015, **11**:e1005277. [doi: 10.1371/journal.pgen.1005277]
5. Guscetti F, Nassiri S, Beebe E, Rito Brandao I, Graf R, Markkanen E: **Molecular homology between canine spontaneous oral squamous cell carcinomas and human head-and-neck squamous cell carcinomas reveals disease drivers and therapeutic vulnerabilities.** *Neoplasia N. Y. N* 2020, **22**:778–788. [doi: 10.1016/j.neo.2020.10.003] [PMID: 33142242] [PMCID: PMC7642746]
6. Gras B, Jacquaroud L, Wierinckx A, Lamblot C, Fauvet F, Lachuer J, Puisieux A, Ansieau S: **Snail family members unequally trigger EMT and thereby differ in their ability to promote the neoplastic transformation of mammary epithelial cells.** *PloS One* 2014, **9**:e92254. [doi: 10.1371/journal.pone.0092254] [PMID: 24638100] [PMCID: PMC3956896]
7. Stemmler MP, Eccles RL, Brabletz S, Brabletz T: **Non-redundant functions of EMT transcription factors.** *Nat. Cell Biol.* 2019, **21**:102–112. [doi: 10.1038/s41556-018-0196-y] [PMID: 30602760]
8. Yao X, Sun S, Zhou X, Zhang Q, Guo W, Zhang L: **Clinicopathological significance of ZEB-1 and E-cadherin proteins in patients with oral cavity squamous cell carcinoma.** *OncoTargets Ther.* 2017, **10**:781–790. [doi: 10.2147/OTT.S111920] [PMID: 28243114] [PMCID: PMC5315354]
9. Ghulam J, Stuerken C, Wicklein D, Pries R, Wollenberg B, Schumacher U: **Immunohistochemical Analysis of Transcription Factors and Markers of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Human Tumors.** *Anticancer Res.* 2019, **39**:5437–5448. [doi: 10.21873/anticanres.13737] [PMID: 31570438]
10. Kong YH, Syed Zanuuddin SN, Lau SH, Ramanathan A, Kallarakkal TG, Vincent-Chong VK, Wan Mustafa WM, Abraham MT, Abdul Rahman ZA, Zain RB, et al.: **Co-Expression of TWIST1 and ZEB2 in Oral Squamous Cell Carcinoma Is Associated with Poor Survival.** *PloS One* 2015, **10**:e0134045. [doi: 10.1371/journal.pone.0134045] [PMID: 26214683] [PMCID: PMC4516250]
11. Göppel J, Möckelmann N, Münscher A, Sauter G, Schumacher U: **Expression of Epithelial-Mesenchymal Transition Regulating Transcription Factors in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas.** *Anticancer Res.* 2017, **37**:5435–5440. [doi: 10.21873/anticanres.11971] [PMID: 28982853]
12. Puram SV, Tirosch I, Parikh AS, Patel AP, Yizhak K, Gillespie S, Rodman C, Luo CL, Mroz EA, Emerick KS, et al.: **Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer.** *Cell* 2017, **171**:1611-1624.e24. [doi: 10.1016/j.cell.2017.10.044] [PMID: 29198524]
13. Song L, Zhang S, Yu S, Ma F, Wang B, Zhang C, Sun J, Mao X, Wei L: **Cellular heterogeneity landscape in laryngeal squamous cell carcinoma.** *Int. J. Cancer* 2020, **147**:2879–2890. [doi: 10.1002/ijc.33192]
14. Cillo AR, Kürten CHL, Tabib T, Qi Z, Onkar S, Wang T, Liu A, Duvvuri U, Kim S, Soose RJ, et al.: **Immune Landscape of Viral- and Carcinogen-Driven Head and Neck Cancer.** *Immunity* 2020, **52**:183-199.e9. [doi: 10.1016/j.immuni.2019.11.014] [PMID: 31924475]

15. Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M: **The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge.** *Contemp. Oncol. Poznan Pol.* 2015, **19**:A68-77. [doi: 10.5114/wo.2014.47136] [PMID: 25691825] [PMCID: PMC4322527]
16. Xiao Z, Dai Z, Locasale JW: **Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution.** *Nat. Commun.* 2019, **10**:1–12. [doi: 10.1038/s41467-019-11738-0]
17. Conway DI, Purkayastha M, Chestnutt IG: **The changing epidemiology of oral cancer: definitions, trends, and risk factors.** *Br. Dent. J.* 2018, **225**:867–873. [doi: 10.1038/sj.bdj.2018.922] [PMID: 30412558]
18. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C (Eds): *TNM Classification of Malignant Tumours, 8th edition.* Wiley-Blackwell; 2016.
19. Fritz A, Percy C, Jack A, Shanmugaratnam K, Sobin L, Parkin M, Whelan S (Eds): *International Classification of Diseases for Oncology, 3rd edition.* World Health Organization; 2000.
20. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F: **Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.** *CA. Cancer J. Clin.* 2021, **71**:209–249. [doi: 10.3322/caac.21660] [PMID: 33538338]
21. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A: **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** *CA. Cancer J. Clin.* 2018, **68**:394–424. [doi: 10.3322/caac.21492] [PMID: 30207593]
22. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A: **Global cancer statistics, 2012.** *CA. Cancer J. Clin.* 2015, **65**:87–108. [doi: 10.3322/caac.21262] [PMID: 25651787]
23. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics.** *CA. Cancer J. Clin.* 2011, **61**:69–90. [doi: 10.3322/caac.20107] [PMID: 21296855]
24. Warnakulasuriya S: **Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer.** *Oral Oncol.* 2009, **45**:309–316. [doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.06.002] [PMID: 18804401]
25. Vigneswaran N, Williams MD: **Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis.** *Oral Maxillofac. Surg. Clin. N. Am.* 2014, **26**:123–141. [doi: 10.1016/j.coms.2014.01.001] [PMID: 24794262] [PMCID: PMC4040236]
26. Cray M, Selmic LE, Ruple A: **Demographics of dogs and cats with oral tumors presenting to teaching hospitals: 1996-2017.** *J. Vet. Sci.* 2020, **21**:e70. [doi: 10.4142/jvs.2020.21.e70] [PMID: 33016017] [PMCID: PMC7533385]
27. Mikiewicz M, Paździor-Czapula K, Gesek M, Lemishevskiy V, Otrocka-Domagala I: **Canine and Feline Oral Cavity Tumours and Tumour-like Lesions: a Retrospective Study of 486 Cases (2015-2017).** *J. Comp. Pathol.* 2019, **172**:80–87. [doi: 10.1016/j.jcpa.2019.09.007] [PMID: 31690420]
28. Bonfanti U, Bertazzolo W, Gracis M, Roccabianca P, Romanelli G, Palermo G, Zini E: **Diagnostic value of cytological analysis of tumours and tumour-like lesions of the oral cavity in dogs and cats: a prospective study on 114 cases.** *Vet. J. Lond. Engl. 1997* 2015, **205**:322–327. [doi: 10.1016/j.tvjl.2014.10.022] [PMID: 25466576]
29. Wingo K: **Histopathologic Diagnoses From Biopsies of the Oral Cavity in 403 Dogs and 73 Cats.** *J. Vet. Dent.* 2018, **35**:7–17. [doi: 10.1177/0898756418759760] [PMID: 29486680]
30. Putnová B, Burová J, Georgiou M, Fichtel T, Stehlik L, Frgelecová L, Škorič M: **Occurrence site of canine oral lesions: a retrospective study of 659 cases.** *Acta Vet. Brno* 2020, **89**:179–187. [doi: 10.2754/avb202089020179]
31. Arduino PG, Carrozzo M, Chiecchio A, Broccoletti R, Tirone F, Borra E, Bertolusso G, Gandolfo S: **Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases.** *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 2008, **66**:1570–1579. [doi: 10.1016/j.joms.2007.12.024] [PMID: 18634942]
32. Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM: **Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study.** *Head Neck* 2008, **30**:75–84. [doi: 10.1002/hed.20664] [PMID: 17694557]
33. Harris SL, Kimple RJ, Hayes DN, Couch ME, Rosenman JG: **Never-smokers, never-drinkers: unique clinical subgroup of young patients with head and neck squamous cell cancers.** *Head Neck* 2010, **32**:499–503. [doi: 10.1002/hed.21220] [PMID: 19691028]
34. Yang Z, Du W, Zhang X, Chen D, Fang Q, He Y, Yang Y, Li D, Fan J: **Nonsmoking and Nondrinking Oral Squamous Cell Carcinoma Patients: A Different Entity.** *Front. Oncol.* 2021, **11**:558320. [doi: 10.3389/fonc.2021.558320] [PMID: 34262853] [PMCID: PMC8273760]

35. Kruse AL, Bredell M, Grätz KW: **Oral squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients.** *Head Neck Oncol.* 2010, **2**:24. [doi: 10.1186/1758-3284-2-24] [PMID: 20920351] [PMCID: PMC2958869]
36. Kühnel S, Kessler M: **[Prognosis of canine oral (gingival) squamous cell carcinoma after surgical therapy. A retrospective analysis in 40 patients].** *Tierarztl. Prax. Ausg. K Klientiere Heimtiere* 2014, **42**:359–366. [doi: 10.15654/TPK-140069] [PMID: 25418424]
37. Schmidt JM, North SM, Freeman KP, Ramiro-Ibañez F: **Canine paediatric oncology: retrospective assessment of 9522 tumours in dogs up to 12 months (1993-2008).** *Vet. Comp. Oncol.* 2010, **8**:283–292. [doi: 10.1111/j.1476-5829.2010.00226.x] [PMID: 21062410]
38. Stapleton BL, Barrus JM: **Papillary squamous cell carcinoma in a young dog.** *J. Vet. Dent.* 1996, **13**:65–68. [PMID: 9520782]
39. Ogilvie GK, Sundberg JP, O'Banion MK, Badertscher RR, Wheaton LG, Reichmann ME: **Papillary squamous cell carcinoma in three young dogs.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988, **192**:933–936. [PMID: 3366682]
40. Shield KD, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R, Chaturvedi AK, Bray F, Soerjomataram I: **The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012.** *CA. Cancer J. Clin.* 2017, **67**:51–64. [doi: 10.3322/caac.21384] [PMID: 28076666]
41. El-Husseiny G, Kandil A, Jamshed A, Khafaga Y, Saleem M, Allam A, Al-Rajhi N, Al-Amro A, Rostom AY, Abuzeid M, et al.: **Squamous cell carcinoma of the oral tongue: an analysis of prognostic factors.** *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2000, **38**:193–199. [doi: 10.1054/bjom.1999.0235] [PMID: 10864725]
42. Dennis MM, Ehrhart N, Duncan CG, Barnes AB, Ehrhart EJ: **Frequency of and risk factors associated with lingual lesions in dogs: 1,196 cases (1995-2004).** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2006, **228**:1533–1537. [doi: 10.2460/javma.228.10.1533] [PMID: 16677121]
43. Negri E, Boffetta P, Berthiller J, Castellsague X, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, et al.: **Family history of cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium.** *Int. J. Cancer* 2009, **124**:394–401. [doi: 10.1002/ijc.23848] [PMID: 18814262] [PMCID: PMC3711193]
44. Chuang S-C, Agudo A, Ahrens W, Anantharaman D, Benhamou S, Boccia S, Chen C, Conway DI, Fabianova E, Hayes RB, et al.: **Sequence Variants and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the INHANCE Consortium.** *Front. Oncol.* 2011, **1**:13. [doi: 10.3389/fonc.2011.00013] [PMID: 22655231] [PMCID: PMC3356135]
45. McKay JD, Truong T, Gaborieau V, Chabrier A, Chuang S-C, Byrnes G, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, et al.: **A genome-wide association study of upper aerodigestive tract cancers conducted within the INHANCE consortium.** *PLoS Genet.* 2011, **7**:e1001333. [doi: 10.1371/journal.pgen.1001333] [PMID: 21437268] [PMCID: PMC3060072]
46. Bravi F, Lee Y-CA, Hashibe M, Boffetta P, Conway DI, Ferraroni M, La Vecchia C, Edefonti V, INHANCE Consortium investigators: **Lessons learned from the INHANCE consortium: An overview of recent results on head and neck cancer.** *Oral Dis.* 2021, **27**:73–93. [doi: 10.1111/odi.13502] [PMID: 32569410] [PMCID: PMC7752834]
47. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, et al.: **Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium.** *J. Natl. Cancer Inst.* 2007, **99**:777–789. [doi: 10.1093/jnci/djk179] [PMID: 17505073]
48. Wyss A, Hashibe M, Chuang S-C, Lee Y-CA, Zhang Z-F, Yu G-P, Winn DM, Wei Q, Talamini R, Szeszenia-Dabrowska N, et al.: **Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium.** *Am. J. Epidemiol.* 2013, **178**:679–690. [doi: 10.1093/aje/kwt029] [PMID: 23817919] [PMCID: PMC3755640]
49. Berthiller J, Straif K, Agudo A, Ahrens W, Bezerra Dos Santos A, Boccia S, Cadoni G, Canova C, Castellsague X, Chen C, et al.: **Low frequency of cigarette smoking and the risk of head and neck cancer in the INHANCE consortium pooled analysis.** *Int. J. Epidemiol.* 2016, **45**:835–845. [doi: 10.1093/ije/dyv146] [PMID: 26228584] [PMCID: PMC5005938]
50. Lubin JH, Purdue M, Kelsey K, Zhang Z-F, Winn D, Wei Q, Talamini R, Szeszenia-Dabrowska N, Sturgis EM, Smith E, et al.: **Total exposure and exposure rate effects for alcohol and smoking and risk of head and neck cancer: a pooled analysis of case-control studies.** *Am. J.*

- Epidemiol.* 2009, **170**:937–947. [doi: 10.1093/aje/kwp222] [PMID: 19745021] [PMCID: PMC2800266]
51. Wyss AB, Hashibe M, Lee Y-CA, Chuang S-C, Muscat J, Chen C, Schwartz SM, Smith E, Zhang Z-F, Morgenstern H, et al.: **Smokeless Tobacco Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis of US Studies in the INHANCE Consortium.** *Am. J. Epidemiol.* 2016, **184**:703–716. [doi: 10.1093/aje/kww075] [PMID: 27744388] [PMCID: PMC5141945]
 52. Gupta B, Johnson NW: **Systematic review and meta-analysis of association of smokeless tobacco and of betel quid without tobacco with incidence of oral cancer in South Asia and the Pacific.** *PloS One* 2014, **9**:e113385. [doi: 10.1371/journal.pone.0113385] [PMID: 25411778] [PMCID: PMC4239077]
 53. Lee Y-CA, Boffetta P, Sturgis EM, Wei Q, Zhang Z-F, Muscat J, Lazarus P, Matos E, Hayes RB, Winn DM, et al.: **Involuntary smoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium.** *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 2008, **17**:1974–1981. [doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0047] [PMID: 18708387] [PMCID: PMC2561190]
 54. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, Scotti L, Jenab M, Turati F, Pasquali E, et al.: **Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis.** *Br. J. Cancer* 2015, **112**:580–593. [doi: 10.1038/bjc.2014.579] [PMID: 25422909] [PMCID: PMC4453639]
 55. Boffetta P, Hashibe M: **Alcohol and cancer.** *Lancet Oncol.* 2006, **7**:149–156. [doi: 10.1016/S1470-2045(06)70577-0] [PMID: 16455479]
 56. Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, Meier-Tackmann D, Singh S, Beckmann G, Bhatia K, Chen LZ, Fang B, Lisker R: **Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations.** *Hum. Genet.* 1992, **88**:344–346. [doi: 10.1007/BF00197271] [PMID: 1733836]
 57. Voltzke KJ, Lee Y-CA, Zhang Z-F, Zevallos JP, Yu G-P, Winn DM, Vaughan TL, Sturgis EM, Smith E, Schwartz SM, et al.: **Racial differences in the relationship between tobacco, alcohol, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis of US studies in the INHANCE Consortium.** *Cancer Causes Control CCC* 2018, **29**:619–630. [doi: 10.1007/s10552-018-1026-z] [PMID: 29761303] [PMCID: PMC6626318]
 58. Hashibe M, Brennan P, Chuang S-C, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, et al.: **Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium.** *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 2009, **18**:541–550. [doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0347] [PMID: 19190158] [PMCID: PMC3051410]
 59. Reif JS, Bruns C, Lower KS: **Cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses and exposure to environmental tobacco smoke in pet dogs.** *Am. J. Epidemiol.* 1998, **147**:488–492. [doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a009475] [PMID: 9525536]
 60. Bukowski JA, Wartenberg D, Goldschmidt M: **Environmental causes for sinonasal cancers in pet dogs, and their usefulness as sentinels of indoor cancer risk.** *J. Toxicol. Environ. Health A* 1998, **54**:579–591. [doi: 10.1080/009841098158719] [PMID: 9726781]
 61. Reif JS, Dunn K, Ogilvie GK, Harris CK: **Passive smoking and canine lung cancer risk.** *Am. J. Epidemiol.* 1992, **135**:234–239. [doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a116276] [PMID: 1546698]
 62. Zierenberg-Ripoll A, Pollard RE, Stewart SL, Allstadt SD, Barrett LE, Gillem JM, Skorupski KA: **Association between environmental factors including second-hand smoke and primary lung cancer in dogs.** *J. Small Anim. Pract.* 2018, **59**:343–349. [doi: 10.1111/jsap.12778] [PMID: 29134653] [PMCID: PMC7491366]
 63. Bertone-Johnson ER, Procter-Gray E, Gollenberg AL, Ryan MB, Barber LG: **Environmental tobacco smoke and canine urinary cotinine level.** *Environ. Res.* 2008, **106**:361–364. [doi: 10.1016/j.envres.2007.09.007] [PMID: 17950271] [PMCID: PMC2297465]
 64. Bawazeer S, Watson DG, Knottenbelt C: **Determination of nicotine exposure in dogs subjected to passive smoking using methanol extraction of hair followed by hydrophilic interaction chromatography in combination with Fourier transform mass spectrometry.** *Talanta* 2012, **88**:408–411. [doi: 10.1016/j.talanta.2011.11.008] [PMID: 22265518]
 65. Knottenbelt CM, Bawazeer S, Hammond J, Mellor D, Watson DG: **Nicotine hair concentrations in dogs exposed to environmental tobacco smoke: a pilot study.** *J. Small Anim. Pract.* 2012, **53**:623–626. [doi: 10.1111/j.1748-5827.2012.01284.x] [PMID: 23020087]

66. Roza MR, Viegas CAA: **The dog as a passive smoker: effects of exposure to environmental cigarette smoke on domestic dogs.** *Nicotine Tob. Res. Off. J. Soc. Res. Nicotine Tob.* 2007, **9**:1171–1176. [doi: 10.1080/14622200701648391] [PMID: 17978991]
67. Pérez N, Berrío A, Jaramillo JE, Urrego R, Arias MP: **Exposure to cigarette smoke causes DNA damage in oropharyngeal tissue in dogs.** *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2014, **769**:13–19. [doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.04.013] [PMID: 25344107]
68. Guha N, Warnakulasuriya S, Vlaanderen J, Straif K: **Betel quid chewing and the risk of oral and oropharyngeal cancers: a meta-analysis with implications for cancer control.** *Int. J. Cancer* 2014, **135**:1433–1443. [doi: 10.1002/ijc.28643] [PMID: 24302487]
69. Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Møller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, et al.: **Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck.** *N. Engl. J. Med.* 2001, **344**:1125–1131. [doi: 10.1056/NEJM200104123441503] [PMID: 11297703]
70. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML: **Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer.** *N. Engl. J. Med.* 2007, **356**:1944–1956. [doi: 10.1056/NEJMoa065497] [PMID: 17494927]
71. Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsagué X, Laporte L, Bosch FX, de Sanjosé S, Trottier H: **HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis.** *Lancet Oncol.* 2014, **15**:1319–1331. [doi: 10.1016/S1470-2045(14)70471-1] [PMID: 25439690]
72. Luria L, Cardoza-Favarato G: **Human Papillomavirus** [Updated 2021 Jan 24]. In StatPearls. Treasure Island (FL) : . StatPearls Publishing; 2021.
73. Heck JE, Berthiller J, Vaccarella S, Winn DM, Smith EM, Shan'gina O, Schwartz SM, Purdue MP, Pilarska A, Eluf-Neto J, et al.: **Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium.** *Int. J. Epidemiol.* 2010, **39**:166–181. [doi: 10.1093/ije/dyp350] [PMID: 20022926] [PMCID: PMC2817092]
74. Abogunrin S, Di Tanna GL, Keeping S, Carroll S, Iheanacho I: **Prevalence of human papillomavirus in head and neck cancers in European populations: a meta-analysis.** *BMC Cancer* 2014, **14**:968. [doi: 10.1186/1471-2407-14-968] [PMID: 25515630] [PMCID: PMC4320477]
75. Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordóñez B, He X, Pickard R, Koluder M, Jiang B, Wakely P, Xiao W, Gillison ML: **Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials.** *Am. J. Surg. Pathol.* 2012, **36**:945–954. [doi: 10.1097/PAS.0b013e318253a2d1] [PMID: 22743284] [PMCID: PMC6362985]
76. Chor JSY, Vlantis AC, Chow T-L, Fung S-C, Ng FYH, Lau C-H, Chan ABW, Ho L-C, Kwong W-H, Fung MNS, et al.: **The role of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: A case control study on a southern Chinese population.** *J. Med. Virol.* 2016, **88**:877–887. [doi: 10.1002/jmv.24405] [PMID: 26467027]
77. Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, Jiang B, Pickard R, Kreinbrink P, Perez-Ordóñez B, Jordan RC, Gillison ML: **Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas.** *Oral Oncol.* 2013, **49**:1–8. [doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.07.002] [PMID: 22841678]
78. Combes J-D, Franceschi S: **Role of human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers.** *Oral Oncol.* 2014, **50**:370–379. [doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.11.004] [PMID: 24331868]
79. Yakin M, Seo B, Hussaini H, Rich A, Hunter K: **Human papillomavirus and oral and oropharyngeal carcinoma: the essentials.** *Aust. Dent. J.* 2019, **64**:11–18. [doi: 10.1111/adj.12652] [PMID: 30238467]
80. de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S: **Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type.** *Int. J. Cancer* 2017, **141**:664–670. [doi: 10.1002/ijc.30716] [PMID: 28369882] [PMCID: PMC5520228]
81. Melo BA de C, Vilar LG, Oliveira NR de, Lima PO de, Pinheiro M de B, Domingueti CP, Pereira MC: **Human papillomavirus infection and oral squamous cell carcinoma - a systematic review.** *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 2021, **87**:346–352. [doi: 10.1016/j.bjorl.2020.10.017] [PMID: 33339760]

82. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C: **Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.** *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2015, **33**:3235–3242. [doi: 10.1200/JCO.2015.61.6995] [PMID: 26351338] [PMCID: PMC4979086]
83. Bishop JA, Lewis JS, Rocco JW, Faquin WC: **HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck: An update on testing in routine pathology practice.** *Semin. Diagn. Pathol.* 2015, **32**:344–351. [doi: 10.1053/j.semdp.2015.02.013] [PMID: 25724476]
84. Prigge E-S, Arbyn M, von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M: **Diagnostic accuracy of p16INK4a immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis.** *Int. J. Cancer* 2017, **140**:1186–1198. [doi: 10.1002/ijc.30516] [PMID: 27859245]
85. Munday JS, Thomson NA, Luff JA: **Papillomaviruses in dogs and cats.** *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 2017, **225**:23–31. [doi: 10.1016/j.tvjl.2017.04.018] [PMID: 28720294]
86. Lange CE, Ackermann M, Favrot C, Tobler K: **Entire genomic sequence of novel canine papillomavirus type 13.** *J. Virol.* 2012, **86**:10226–10227. [doi: 10.1128/JVI.01553-12] [PMID: 22923791] [PMCID: PMC3446628]
87. Teifke JP, Löhr CV, Shirasawa H: **Detection of canine oral papillomavirus-DNA in canine oral squamous cell carcinomas and p53 overexpressing skin papillomas of the dog using the polymerase chain reaction and non-radioactive in situ hybridization.** *Vet. Microbiol.* 1998, **60**:119–130. [doi: 10.1016/s0378-1135(98)00151-5] [PMID: 9646444]
88. Zaugg N, Nespeca G, Hauser B, Ackermann M, Favrot C: **Detection of novel papillomaviruses in canine mucosal, cutaneous and in situ squamous cell carcinomas.** *Vet. Dermatol.* 2005, **16**:290–298. [doi: 10.1111/j.1365-3164.2005.00467.x] [PMID: 16238808]
89. Porcellato I, Brachelente C, Guelfi G, Reginato A, Sforza M, Bongiovanni L, Mechelli L: **A retrospective investigation on canine papillomavirus 1 (CPV1) in oral oncogenesis reveals dogs are not a suitable animal model for high-risk HPV-induced oral cancer.** *PLoS One* 2014, **9**:e112833. [doi: 10.1371/journal.pone.0112833] [PMID: 25401953] [PMCID: PMC4234530]
90. Munday JS, French A, Harvey CJ: **Molecular and immunohistochemical studies do not support a role for papillomaviruses in canine oral squamous cell carcinoma development.** *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 2015, **204**:223–225. [doi: 10.1016/j.tvjl.2015.03.002] [PMID: 25956344]
91. Sabattini S, Savini F, Gallina L, Scagliarini A, Bassi P, Bettini G: **p16 Immunostaining of Canine Squamous Cell Carcinomas Is Not Associated with Papillomaviral DNA.** *PLoS One* 2016, **11**:e0159687. [doi: 10.1371/journal.pone.0159687] [PMID: 27441555] [PMCID: PMC4956233]
92. Chang C-Y, Chen W-T, Haga T, Yamashita N, Lee C-F, Tsuzuki M, Chang H-W: **The Detection and Association of Canine Papillomavirus with Benign and Malignant Skin Lesions in Dogs.** *Viruses* 2020, **12**. [doi: 10.3390/v12020170] [PMID: 32028559] [PMCID: PMC7077320]
93. Thaiwong T, Sledge DG, Collins-Webb A, Kiupel M: **Immunohistochemical Characterization of Canine Oral Papillary Squamous Cell Carcinoma.** *Vet. Pathol.* 2018, **55**:224–232. [doi: 10.1177/0300985817741732] [PMID: 29262763]
94. Lange CE, Zollinger S, Tobler K, Ackermann M, Favrot C: **Clinically healthy skin of dogs is a potential reservoir for canine papillomaviruses.** *J. Clin. Microbiol.* 2011, **49**:707–709. [doi: 10.1128/JCM.02047-10] [PMID: 21159938] [PMCID: PMC3043500]
95. Munday JS, Tucker RS, Kiupel M, Harvey CJ: **Multiple oral carcinomas associated with a novel papillomavirus in a dog.** *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 2015, **27**:221–225. [doi: 10.1177/1040638714567191] [PMID: 25613043]
96. Regalado Ibarra AM, Legendre L, Munday JS: **Malignant Transformation of a Canine Papillomavirus Type 1-Induced Persistent Oral Papilloma in a 3-Year-Old Dog.** *J. Vet. Dent.* 2018, **35**:79–95. [doi: 10.1177/0898756418774575] [PMID: 29865982]
97. Thaiwong T, Sledge DG, Wise AG, Olstad K, Maes RK, Kiupel M: **Malignant transformation of canine oral papillomavirus (CPV1)-associated papillomas in dogs: An emerging concern?** *Papillomavirus Res. Amst. Neth.* 2018, **6**:83–89. [doi: 10.1016/j.pvr.2018.10.007] [PMID: 30414951] [PMCID: PMC6260289]
98. Salavoura K, Kolialexi A, Tsangaris G, Mavrou A: **Development of cancer in patients with primary immunodeficiencies.** *Anticancer Res.* 2008, **28**:1263–1269. [PMID: 18505064]
99. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM: **Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis.** *Lancet Lond. Engl.* 2007, **370**:59–67. [doi: 10.1016/S0140-6736(07)61050-2] [PMID: 17617273]

100. Vajdic CM, van Leeuwen MT: **Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation.** *Int. J. Cancer* 2009, **125**:1747–1754. [doi: 10.1002/ijc.24439] [PMID: 19444916]
101. Hauck F, Voss R, Urban C, Seidel MG: **Intrinsic and extrinsic causes of malignancies in patients with primary immunodeficiency disorders.** *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018, **141**:59–68.e4. [doi: 10.1016/j.jaci.2017.06.009] [PMID: 28669558]
102. Burnet FM: **The concept of immunological surveillance.** *Prog. Exp. Tumor Res.* 1970, **13**:1–27. [doi: 10.1159/000386035] [PMID: 4921480]
103. Malmberg K-J, Carlsten M, Björklund A, Sohlberg E, Bryceson YT, Ljunggren H-G: **Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer.** *Semin. Immunol.* 2017, **31**:20–29. [doi: 10.1016/j.smim.2017.08.002] [PMID: 28888619]
104. Rao S, Gharib K, Han A: **Cancer Immunosurveillance by T Cells.** *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2019, **342**:149–173. [doi: 10.1016/bs.ircmb.2018.08.001] [PMID: 30635090]
105. Curtis RE, Metayer C, Rizzo JD, Socié G, Sobocinski KA, Flowers MED, Travis WD, Travis LB, Horowitz MM, Deeg HJ: **Impact of chronic GVHD therapy on the development of squamous-cell cancers after hematopoietic stem-cell transplantation: an international case-control study.** *Blood* 2005, **105**:3802–3811. [doi: 10.1182/blood-2004-09-3411] [PMID: 15687239] [PMCID: PMC1895092]
106. Rizzo JD, Curtis RE, Socié G, Sobocinski KA, Gilbert E, Landgren O, Travis LB, Travis WD, Flowers MED, Friedman DL, et al.: **Solid cancers after allogeneic hematopoietic cell transplantation.** *Blood* 2009, **113**:1175–1183. [doi: 10.1182/blood-2008-05-158782] [PMID: 18971419] [PMCID: PMC2635083]
107. Chen MH, Chang PM, Li WY, Hsiao LT, Hong YC, Liu CY, Gau JP, Liu JH, Chen PM, Chiou TJ, et al.: **High incidence of oral squamous cell carcinoma independent of HPV infection after allogeneic hematopoietic SCT in Taiwan.** *Bone Marrow Transplant.* 2011, **46**:567–572. [doi: 10.1038/bmt.2010.163] [PMID: 20622906]
108. Szlauer-Stefańska A, Kamińska-Winciorek G, Giebel S, Bağlaj M: **Secondary skin neoplasms in patients after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation procedures.** *Adv. Clin. Exp. Med. Off. Organ Wroclaw Med. Univ.* 2020, **29**:1221–1230. [doi: 10.17219/acem/126739] [PMID: 33064381]
109. Connolly K, Manders P, Earls P, Epstein RJ: **Papillomavirus-associated squamous skin cancers following transplant immunosuppression: one Notch closer to control.** *Cancer Treat. Rev.* 2014, **40**:205–214. [doi: 10.1016/j.ctrv.2013.08.005] [PMID: 24051018]
110. Callan MB, Preziosi D, Mauldin E: **Multiple papillomavirus-associated epidermal hamartomas and squamous cell carcinomas in situ in a dog following chronic treatment with prednisone and cyclosporine.** *Vet. Dermatol.* 2005, **16**:338–345. [doi: 10.1111/j.1365-3164.2005.00466.x] [PMID: 16238815]
111. Goldschmidt MH, Kennedy JS, Kennedy DR, Yuan H, Holt DE, Casal ML, Traas AM, Mauldin EA, Moore PF, Henthorn PS, et al.: **Severe papillomavirus infection progressing to metastatic squamous cell carcinoma in bone marrow-transplanted X-linked SCID dogs.** *J. Virol.* 2006, **80**:6621–6628. [doi: 10.1128/JVI.02571-05] [PMID: 16775349] [PMCID: PMC1488951]
112. Wu X, Nguyen B-C, Dziunycz P, Chang S, Brooks Y, Lefort K, Hofbauer GFL, Dotto GP: **Opposing roles for calcineurin and ATF3 in squamous skin cancer.** *Nature* 2010, **465**:368–372. [doi: 10.1038/nature08996] [PMID: 20485437] [PMCID: PMC3050632]
113. Dziunycz PJ, Lefort K, Wu X, Freiburger SN, Neu J, Djerbi N, Iotzowa-Weiss G, French LE, Dotto G-P, Hofbauer GFL: **The oncogene ATF3 is potentiated by cyclosporine A and ultraviolet light A.** *J. Invest. Dermatol.* 2014, **134**:1998–2004. [doi: 10.1038/jid.2014.77] [PMID: 24509533]
114. Plasmeyjer EI, Sachse MM, Gebhardt C, Geusau A, Bouwes Bavinck JN: **Cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) and immunosurveillance - the impact of immunosuppression on frequency of cSCC.** *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 2019, **33 Suppl 8**:33–37. [doi: 10.1111/jdv.16025] [PMID: 31833604]
115. Hashim D, Sartori S, Brennan P, Curado MP, Wunsch-Filho V, Divaris K, Olshan AF, Zevallos JP, Winn DM, Franceschi S, et al.: **The role of oral hygiene in head and neck cancer: results from International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium.** *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 2016, **27**:1619–1625. [doi: 10.1093/annonc/mdw224] [PMID: 27234641] [PMCID: PMC4959929]

116. Leoncini E, Ricciardi W, Cadoni G, Arzani D, Petrelli L, Paludetti G, Brennan P, Luce D, Stucker I, Matsuo K, et al.: **Adult height and head and neck cancer: a pooled analysis within the INHANCE Consortium.** *Eur. J. Epidemiol.* 2014, **29**:35–48. [doi: 10.1007/s10654-013-9863-2] [PMID: 24271556] [PMCID: PMC4122122]
117. Lubin JH, Gaudet MM, Olshan AF, Kelsey K, Boffetta P, Brennan P, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, et al.: **Body mass index, cigarette smoking, and alcohol consumption and cancers of the oral cavity, pharynx, and larynx: modeling odds ratios in pooled case-control data.** *Am. J. Epidemiol.* 2010, **171**:1250–1261. [doi: 10.1093/aje/kwq088] [PMID: 20494999] [PMCID: PMC2915496]
118. Gaudet MM, Olshan AF, Chuang S-C, Berthiller J, Zhang Z-F, Lissowska J, Zaridze D, Winn DM, Wei Q, Talamini R, et al.: **Body mass index and risk of head and neck cancer in a pooled analysis of case-control studies in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium.** *Int. J. Epidemiol.* 2010, **39**:1091–1102. [doi: 10.1093/ije/dyp380] [PMID: 20123951] [PMCID: PMC2929351]
119. Lubin JH, Muscat J, Gaudet MM, Olshan AF, Curado MP, Dal Maso L, Wunsch-Filho V, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Castellsague X, et al.: **An examination of male and female odds ratios by BMI, cigarette smoking, and alcohol consumption for cancers of the oral cavity, pharynx, and larynx in pooled data from 15 case-control studies.** *Cancer Causes Control CCC* 2011, **22**:1217–1231. [doi: 10.1007/s10552-011-9792-x] [PMID: 21744095] [PMCID: PMC3304584]
120. Nicolotti N, Chuang S-C, Cadoni G, Arzani D, Petrelli L, Bosetti C, Brenner H, Hosono S, La Vecchia C, Talamini R, et al.: **Recreational physical activity and risk of head and neck cancer: a pooled analysis within the international head and neck cancer epidemiology (INHANCE) Consortium.** *Eur. J. Epidemiol.* 2011, **26**:619–628. [doi: 10.1007/s10654-011-9612-3] [PMID: 21842237]
121. Conway DI, Brenner DR, McMahon AD, Macpherson LMD, Agudo A, Ahrens W, Bosetti C, Brenner H, Castellsague X, Chen C, et al.: **Estimating and explaining the effect of education and income on head and neck cancer risk: INHANCE consortium pooled analysis of 31 case-control studies from 27 countries.** *Int. J. Cancer* 2015, **136**:1125–1139. [doi: 10.1002/ijc.29063] [PMID: 24996155] [PMCID: PMC4531373]
122. Khetan P, Boffetta P, Luce D, Stucker I, Curado MP, Menezes A, Wunsch-Filho V, Ahrens W, Lagiou P, Serraino D, et al.: **Occupations and the Risk of Head and Neck Cancer: A Pooled Analysis of the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium.** *J. Occup. Environ. Med.* 2019, **61**:397–404. [doi: 10.1097/JOM.0000000000001563] [PMID: 31268937] [PMCID: PMC6613803]
123. Barasch A, Morse DE, Krutchkoff DJ, Eisenberg E: **Smoking, gender, and age as risk factors for site-specific intraoral squamous cell carcinoma. A case-series analysis.** *Cancer* 1994, **73**:509–513. [doi: 10.1002/1097-0142(19940201)73:3<509::aid-cnrc2820730303>3.0.co;2-x] [PMID: 8299073]
124. Chandu A, Adams G, Smith ACH: **Factors affecting survival in patients with oral cancer: an Australian perspective.** *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2005, **34**:514–520. [doi: 10.1016/j.ijom.2004.10.006] [PMID: 16053871]
125. Garzino-Demo P, Dell'Acqua A, Dalmaso P, Fasolis M, La Terra Maggiore GM, Ramieri G, Berrone S, Rampino M, Schena M: **Clinicopathological parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma.** *J. Cranio-Maxillo-fac. Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-fac. Surg.* 2006, **34**:344–350. [doi: 10.1016/j.jcms.2006.04.004] [PMID: 16859913]
126. Arduino PG, Carrozzo M, Chiecchio A, Broccoletti R, Tirone F, Borra E, Bertolusso G, Gandolfo S: **Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases.** *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 2008, **66**:1570–1579. [doi: 10.1016/j.joms.2007.12.024] [PMID: 18634942]
127. Sundermann BV, Uhlmann L, Hoffmann J, Freier K, Thiele OC: **The localization and risk factors of squamous cell carcinoma in the oral cavity: A retrospective study of 1501 cases.** *J. Cranio-Maxillo-fac. Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-fac. Surg.* 2018, **46**:177–182. [doi: 10.1016/j.jcms.2017.10.019] [PMID: 29242026]

128. Schmidt BL, Dierks EJ, Homer L, Potter B: **Tobacco smoking history and presentation of oral squamous cell carcinoma.** *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 2004, **62**:1055–1058. [doi: 10.1016/j.joms.2004.03.010] [PMID: 15346353]
129. Amagasa T, Yamashiro M, Uzawa N: **Oral premalignant lesions: from a clinical perspective.** *Int. J. Clin. Oncol.* 2011, **16**:5–14. [doi: 10.1007/s10147-010-0157-3] [PMID: 21225307]
130. Mortazavi H, Baharvand M, Mehdipour M: **Oral potentially malignant disorders: an overview of more than 20 entities.** *J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospects* 2014, **8**:6–14. [doi: 10.5681/joddd.2014.002] [PMID: 25024833] [PMCID: PMC4091702]
131. Université Médicale Virtuelle Francophone: **Site de l'Université Médicale Virtuelle Francophone [Internet].** URL : <http://umvf.cerimes.fr/> [Consulté le 31 août 2021].
132. Fitzpatrick SG, Cohen DM, Clark AN: **Ulcerated Lesions of the Oral Mucosa: Clinical and Histologic Review.** *Head Neck Pathol.* 2019, **13**:91–102. [doi: 10.1007/s12105-018-0981-8] [PMID: 30701449] [PMCID: PMC6405793]
133. Withrow S, Vail D, Page R: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 5th edition.* Saunders, Elsevier; 2012.
134. Verhaert L: **Oral proliferative lesions in the dog and cat.** *Eur. J. Companion Anim. Pract.* 2010, **20**:252–264.
135. El-Naggar A, Chan J, Grandis J, Takata T, Slootweg P (Eds): *WHO Classification of Head and Neck Tumours, 4th edition.* International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017.
136. Kosovsky JK, Matthiesen DT, Marretta SM, Patnaik AK: **Results of partial mandibulectomy for the treatment of oral tumors in 142 dogs.** *Vet. Surg. VS* 1991, **20**:397–401. [doi: 10.1111/j.1532-950x.1991.tb00346.x] [PMID: 1369522]
137. Frew DG, Dobson JM: **Radiological assessment of 50 cases of incisive or maxillary neoplasia in the dog.** *J. Small Anim. Pract.* 1992, **33**:11–18. [doi: 10.1111/j.1748-5827.1992.tb01006.x]
138. Kuperman DI, Auethavekiat V, Adkins DR, Nussenbaum B, Collins S, Boonchalermvichian C, Trinkaus K, Chen L, Morgensztern D: **Squamous cell cancer of the head and neck with distant metastasis at presentation.** *Head Neck* 2011, **33**:714–718. [doi: 10.1002/hed.21529] [PMID: 20872838]
139. Sharma A, Kim J-W, Paeng J-Y: **Clinical analysis of neck node metastasis in oral cavity cancer.** *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 2018, **44**:282–288. [doi: 10.5125/jkaoms.2018.44.6.282] [PMID: 30637242] [PMCID: PMC6327011]
140. Kowalski LP, Carvalho AL, Martins Priante AV, Magrin J: **Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma.** *Oral Oncol.* 2005, **41**:534–541. [doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.01.012] [PMID: 15878760]
141. Garavello W, Ciardo A, Spreafico R, Gaini RM: **Risk factors for distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma.** *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2006, **132**:762–766. [doi: 10.1001/archotol.132.7.762] [PMID: 16847186]
142. Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Haigentz M, Woolgar JA, Triantafyllou A, Mondin V, Paccagnella D, de Bree R, Shaha AR, et al.: **Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part I. Basic aspects.** *Oral Oncol.* 2012, **48**:775–779. [doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.03.013] [PMID: 22520054]
143. Todoroff RJ, Brodey RS: **Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1979, **175**:567–571. [PMID: 511751]
144. Fulton AJ, Nemec A, Murphy BG, Kass PH, Verstraete FJM: **Risk factors associated with survival in dogs with nontonsillar oral squamous cell carcinoma 31 cases (1990-2010).** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2013, **243**:696–702. [doi: 10.2460/javma.243.5.696] [PMID: 23971850]
145. Clarke BS, Mannion PA, White R a. S: **Rib metastases from a non-tonsillar squamous cell carcinoma in a dog.** *J. Small Anim. Pract.* 2011, **52**:163–167. [doi: 10.1111/j.1748-5827.2011.01019.x] [PMID: 21294732]
146. Beyaz, Atasever A, Apaydin, Deniz K: **Metastases from a gingival Squamous Cell Carcinoma (SCC) in a dog.** *Rev. Médecine Vét.* 2009, **160**:74–78.
147. White R a. S: **Mandibulectomy and maxillectomy in the dog: long term survival in 100 cases.** *J. Small Anim. Pract.* 1991, **32**:69–74. [doi: 10.1111/j.1748-5827.1991.tb00917.x]
148. Herring ES, Smith MM, Robertson JL: **Lymph node staging of oral and maxillofacial neoplasms in 31 dogs and cats.** *J. Vet. Dent.* 2002, **19**:122–126. [doi: 10.1177/089875640201900301] [PMID: 12382529]

149. Grimes JA, Mestrinho LA, Berg J, Cass S, Oblak ML, Murphy S, Amsellem PM, Brown P, Hamaide A, Matz BM: **Histologic evaluation of mandibular and medial retropharyngeal lymph nodes during staging of oral malignant melanoma and squamous cell carcinoma in dogs.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2019, **254**:938–943. [doi: 10.2460/javma.254.8.938] [PMID: 30938614]
150. Odenweller PH, Smith MM, Taney KG: **Validation of Regional Lymph Node Excisional Biopsy for Staging Oral and Maxillofacial Malignant Neoplasms in 97 Dogs and 10 Cats (2006-2016).** *J. Vet. Dent.* 2019, **36**:97–103. [doi: 10.1177/0898756419869841] [PMID: 31431132]
151. Skinner OT, Boston SE, Souza CH de M: **Patterns of lymph node metastasis identified following bilateral mandibular and medial retropharyngeal lymphadenectomy in 31 dogs with malignancies of the head.** *Vet. Comp. Oncol.* 2017, **15**:881–889. [doi: 10.1111/vco.12229] [PMID: 27196324]
152. Groome PA, Schulze K, Boysen M, Hall SF, Mackillop WJ: **A comparison of published head and neck stage groupings in carcinomas of the oral cavity.** *Head Neck* 2001, **23**:613–624. [doi: 10.1002/hed.1087] [PMID: 11443743]
153. Glastonbury CM: **Critical Changes in the Staging of Head and Neck Cancer.** *Radiol. Imaging Cancer* 2020, **2**:e190022. [doi: 10.1148/rycan.2019190022] [PMID: 33778691] [PMCID: PMC7983704]
154. Mercante G, Gaino F, Giannitto C, Ferreli F, De Virgilio A, Franzese C, Marrari A, Malvezzi L, Colombo G, Scorsetti M, et al.: **Discrepancies between UICC and AJCC TNM classifications for oral cavity tumors in the 8th editions and following versions.** *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 2021, doi:10.1007/s00405-021-06964-6. [doi: 10.1007/s00405-021-06964-6] [PMID: 34213607]
155. International Consortium for Outcome Research (ICOR) in Head and Neck Cancer, Ebrahimi A, Gil Z, Amit M, Yen T-C, Liao C-T, Chaturvedi P, Agarwal JP, Kowalski LP, Kreppel M, et al.: **Primary tumor staging for oral cancer and a proposed modification incorporating depth of invasion: an international multicenter retrospective study.** *JAMA Otolaryngol.-- Head Neck Surg.* 2014, **140**:1138–1148. [doi: 10.1001/jamaoto.2014.1548] [PMID: 25075712]
156. Wreesmann VB, Katabi N, Palmer FL, Montero PH, Migliacci JC, Gönen M, Carlson D, Ganly I, Shah JP, Ghossein R, et al.: **Influence of extracapsular nodal spread extent on prognosis of oral squamous cell carcinoma.** *Head Neck* 2016, **38 Suppl 1**:E1192-1199. [doi: 10.1002/hed.24190] [PMID: 26514096] [PMCID: PMC4996672]
157. Vuity D, McMahan J, Takhiuddin S, Slinger C, McLellan D, Wales C, MacIver C, Thomson E, McCaul J, Hislop S, et al.: **Is the 8th edition of the Union for International Cancer Control staging of oral cancer good enough?** *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2018, **56**:272–277. [doi: 10.1016/j.bjoms.2018.01.017] [PMID: 29576230]
158. Wunschel M, Neumeier M, Utpatel K, Reichert TE, Ettl T, Spanier G: **Staging more important than grading? Evaluation of malignancy grading, depth of invasion, and resection margins in oral squamous cell carcinoma.** *Clin. Oral Investig.* 2021, **25**:1169–1182. [doi: 10.1007/s00784-020-03421-2] [PMID: 32601998] [PMCID: PMC7878266]
159. Owen LN (Ed): **TNM Classification of Tumours in Domestic Animals.** 1980, [no volume].
160. Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP: **Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance.** *J. Can. Dent. Assoc.* 2007, **73**:339–344. [PMID: 17484800]
161. Van Rensburg IB: **Oral verrucous carcinoma in two dogs.** *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 1982, **53**:209–210. [PMID: 7175911]
162. Cushing T, Barnard S, Fleis R, Peters R: **Pseudoangiomatous squamous cell carcinoma in the oral cavity of a dog.** *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 2010, **22**:299–302. [doi: 10.1177/104063871002200225] [PMID: 20224097]
163. Nemeč A, Murphy BG, Jordan RC, Kass PH, Verstraete FJM: **Oral papillary squamous cell carcinoma in twelve dogs.** *J. Comp. Pathol.* 2014, **150**:155–161. [doi: 10.1016/j.jcpa.2013.07.007] [PMID: 24016780]
164. Sun Y, Kuyama K, Burkhardt A, Yamamoto H: **Clinicopathological evaluation of carcinoma cuniculatum: a variant of oral squamous cell carcinoma.** *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* 2012, **41**:303–308. [doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01116.x] [PMID: 22085046]

165. Gu X, Jiang R, Fowler MR: **Acantholytic squamous cell carcinoma in upper aerodigestive tract: histopathology, immunohistochemical profile and epithelial mesenchymal transition phenotype change.** *Head Neck Pathol.* 2012, **6**:438–444. [doi: 10.1007/s12105-012-0391-2] [PMID: 22850983] [PMCID: PMC3500901]
166. Almangush A, Bello IO, Keski-Säntti H, Mäkinen LK, Kauppila JH, Pukkila M, Hagström J, Laranne J, Tommola S, Nieminen O, et al.: **Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer.** *Head Neck* 2014, **36**:811–818. [doi: 10.1002/hed.23380] [PMID: 23696499] [PMCID: PMC4229066]
167. Dik EA, Ipenburg NA, Kessler PA, van Es RJJ, Willems SM: **The value of histological grading of biopsy and resection specimens in early stage oral squamous cell carcinomas.** *J. Cranio-Maxillo-fac. Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-fac. Surg.* 2018, **46**:1001–1006. [doi: 10.1016/j.jcms.2018.03.019] [PMID: 29709328]
168. Almangush A, Mäkitie AA, Triantafyllou A, de Bree R, Strojan P, Rinaldo A, Hernandez-Prera JC, Suárez C, Kowalski LP, Ferlito A, et al.: **Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update.** *Oral Oncol.* 2020, **107**:104799. [doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104799] [PMID: 32446214]
169. Caldeira PC, Soto AML, de Aguiar MCF, Martins CC: **Tumor depth of invasion and prognosis of early-stage oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis.** *Oral Dis.* 2020, **26**:1357–1365. [doi: 10.1111/odi.13194] [PMID: 31520552]
170. Müller S, Boy SC, Day TA, Magliocca KR, Richardson MS, Sloan P, Tilakaratne WM, Zain RB, Thompson LDR: **Data Set for the Reporting of Oral Cavity Carcinomas: Explanations and Recommendations of the Guidelines From the International Collaboration of Cancer Reporting.** *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2019, **143**:439–446. [doi: 10.5858/arpa.2018-0411-SA] [PMID: 30500296]
171. Mestrinho LA, Faísca P, Peleteiro MC, Niza MMRE: **PCNA and grade in 13 canine oral squamous cell carcinomas: association with prognosis.** *Vet. Comp. Oncol.* 2017, **15**:18–24. [doi: 10.1111/vco.12134] [PMID: 25524719]
172. Rivera C, Oliveira AK, Costa RAP, De Rossi T, Paes Leme AF: **Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review.** *Oral Oncol.* 2017, **72**:38–47. [doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.07.003] [PMID: 28797460]
173. Hadler-Olsen E, Wirsing AM: **Tissue-infiltrating immune cells as prognostic markers in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis.** *Br. J. Cancer* 2019, **120**:714–727. [doi: 10.1038/s41416-019-0409-6] [PMID: 30808992] [PMCID: PMC6461751]
174. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, Statistics Subcommittee of the NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics: **Reporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK).** *Br. J. Cancer* 2005, **93**:387–391. [doi: 10.1038/sj.bjc.6602678] [PMID: 16106245] [PMCID: PMC2361579]
175. Poste G: **Bring on the biomarkers.** *Nature* 2011, **469**:156–157. [doi: 10.1038/469156a] [PMID: 21228852]
176. Zhu P, Wang Y, Zhang W, Liu X: **Anti-PD1/PD-L1 monotherapy vs standard of care in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: A meta-analysis of randomized controlled trials.** *Medicine (Baltimore)* 2021, **100**:e24339. [doi: 10.1097/MD.00000000000024339] [PMID: 33530227] [PMCID: PMC7850637]
177. Chung CH, Zhang Q, Kong CS, Harris J, Fertig EJ, Harari PM, Wang D, Redmond KP, Shenouda G, Trotti A, et al.: **p16 protein expression and human papillomavirus status as prognostic biomarkers of nonoropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma.** *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2014, **32**:3930–3938. [doi: 10.1200/JCO.2013.54.5228] [PMID: 25267748] [PMCID: PMC4251957]
178. Martano M, Restucci B, Ceccarelli DM, Lo Muzio L, Maiolino P: **Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine oral squamous cell carcinomas.** *Oncol. Lett.* 2016, **11**:399–404. [doi: 10.3892/ol.2015.3847] [PMID: 26870224] [PMCID: PMC4727185]
179. Mestrinho LA, Pissarra H, Faísca PB, Bragança M, Peleteiro MC, Niza MMRE: **p63 and E-cadherin Expression in Canine Oral Squamous Cell Carcinoma.** *Vet. Pathol.* 2015, **52**:614–620. [doi: 10.1177/0300985814547391] [PMID: 25248518]
180. Nagamine E, Hirayama K, Matsuda K, Okamoto M, Ohmachi T, Uchida K, Kadosawa T, Taniyama H: **Invasive Front Grading and Epithelial-Mesenchymal Transition in Canine Oral**

- and Cutaneous Squamous Cell Carcinomas.** *Vet. Pathol.* 2017, **54**:783–791. [doi: 10.1177/0300985817707005] [PMID: 28494700]
181. Hanahan D, Weinberg R: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013. [doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013] [PMID: 21376230]
 182. Wang Z, Gerstein M, Snyder M: **RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.** *Nat. Rev. Genet.* 2009, **10**:57–63. [doi: 10.1038/nrg2484] [PMID: 19015660] [PMCID: PMC2949280]
 183. Ding L, Bailey MH, Porta-Pardo E, Thorsson V, Colaprico A, Bertrand D, Gibbs DL, Weerasinghe A, Huang K-L, Tokheim C, et al.: **Perspective on Oncogenic Processes at the End of the Beginning of Cancer Genomics.** *Cell* 2018, **173**:305-320.e10. [doi: 10.1016/j.cell.2018.03.033] [PMID: 29625049] [PMCID: PMC5916814]
 184. TCGA Network: **Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas.** *Nature* 2015, **517**. [doi: 10.1038/nature14129] [PMID: 25631445]
 185. Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, Chatila WK, Luna A, La KC, Dimitriadoy S, Liu DL, Kantheti HS, Saghaifinia S, et al.: **Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas.** *Cell* 2018, **173**:321-337.e10. [doi: 10.1016/j.cell.2018.03.035] [PMID: 29625050] [PMCID: PMC6070353]
 186. Kalluri R, Weinberg RA: **The basics of epithelial-mesenchymal transition.** *J. Clin. Invest.* 2009, **119**:1420–1428. [doi: 10.1172/JCI39104] [PMID: 19487818] [PMCID: PMC2689101]
 187. Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, Fioramonti M, Revenco T, Boumahdi S, Van Keymeulen A, Brown D, Moers V, Lemaire S, et al.: **Identification of the tumour transition states occurring during EMT.** *Nature* 2018, **556**:463–468. [doi: 10.1038/s41586-018-0040-3] [PMID: 29670281]
 188. Panchy N, Azeredo-Tseng C, Luo M, Randall N, Hong T: **Integrative Transcriptomic Analysis Reveals a Multiphasic Epithelial-Mesenchymal Spectrum in Cancer and Non-tumorigenic Cells.** *Front. Oncol.* 2019, **9**:1479. [doi: 10.3389/fonc.2019.01479] [PMID: 32038999] [PMCID: PMC6987415]
 189. Lamouille S, Xu J, Derynck R: **Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014, **15**:178–196. [doi: 10.1038/nrm3758] [PMID: 24556840] [PMCID: PMC4240281]
 190. Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, Butterfoss D, Xiang D, Zanation A, Yin X, et al.: **Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression.** *Cancer Cell* 2004, **5**:489–500. [doi: 10.1016/S1535-6108(04)00112-6] [PMID: 15144956]
 191. Walter V, Yin X, Wilkerson MD, Cabanski CR, Zhao N, Du Y, Ang MK, Hayward MC, Salazar AH, Hoadley KA, et al.: **Molecular Subtypes in Head and Neck Cancer Exhibit Distinct Patterns of Chromosomal Gain and Loss of Canonical Cancer Genes.** *PLOS ONE* 2013, **8**:e56823. [doi: 10.1371/journal.pone.0056823]
 192. De Cecco L, Nicolau M, Giannoccaro M, Daidone M, Bossi P, Locati L, Licitra L, Canevari S: **Head and neck cancer subtypes with biological and clinical relevance: Meta-analysis of gene-expression data.** *Oncotarget* 2015, doi:10.18632/oncotarget.3301. [doi: 10.18632/oncotarget.3301] [PMID: 25821127]
 193. Klempner SJ, Fabrizio D, Bane S, Reinhart M, Peoples T, Ali SM, Sokol ES, Frampton G, Schrock AB, Anhorn R, et al.: **Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker for Response to Immune Checkpoint Inhibitors: A Review of Current Evidence.** *The Oncologist* 2020, **25**:e147–e159. [doi: 10.1634/theoncologist.2019-0244] [PMID: 31578273] [PMCID: PMC6964127]
 194. Cohen EEW, Bell RB, Bifulco CB, Burtness B, Gillison ML, Harrington KJ, Le Q-T, Lee NY, Leidner R, Lewis RL, et al.: **The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC).** *J. Immunother. Cancer* 2019, **7**:184. [doi: 10.1186/s40425-019-0662-5] [PMID: 31307547] [PMCID: PMC6632213]
 195. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, et al.: **Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation.** *N. Engl. J. Med.* 2011, **364**:2507–2516. [doi: 10.1056/NEJMoa1103782] [PMID: 21639808] [PMCID: PMC3549296]
 196. Tang J, Li Y, Lyon K, Camps J, Dalton S, Ried T, Zhao S: **Cancer driver-passenger distinction via sporadic human and dog cancer comparison: a proof-of-principle study with colorectal**

- cancer.** *Oncogene* 2014, **33**:814–822. [doi: 10.1038/onc.2013.17] [PMID: 23416983] [PMCID: PMC3932186]
197. Do H, Dobrovic A: **Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization.** *Clin. Chem.* 2015, **61**:64–71. [doi: 10.1373/clinchem.2014.223040] [PMID: 25421801]
 198. Lin D-C, Hao J-J, Nagata Y, Xu L, Shang L, Meng X, Sato Y, Okuno Y, Varela AM, Ding L-W, et al.: **Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma.** *Nat. Genet.* 2014, **46**:467–473. [doi: 10.1038/ng.2935] [PMID: 24686850] [PMCID: PMC4070589]
 199. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, Fakhry C, Xie T-X, Zhang J, Wang J, et al.: **Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1.** *Science* 2011, **333**:1154–1157. [doi: 10.1126/science.1206923] [PMID: 21798897] [PMCID: PMC3162986]
 200. Chung GT, Lung RW, Hui AB, Yip KY, Woo JK, Chow C, Tong CY, Lee S-D, Yuen JW, Lun SW, et al.: **Identification of a recurrent transforming UBR5-ZNF423 fusion gene in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma.** *J. Pathol.* 2013, **231**:158–167. [doi: 10.1002/path.4240] [PMID: 23878065] [PMCID: PMC4166696]
 201. Xu G, Wei J, Huangfu B, Gao J, Wang X, Xiao L, Xuan R, Chen Z, Song G: **Animal model and bioinformatics analyses suggest the TIMP1/MMP9 axis as a potential biomarker in oral squamous cell carcinoma.** *Mol. Carcinog.* 2020, **59**:1302–1316. [doi: 10.1002/mc.23258] [PMID: 33006223]
 202. Midwood KS, Chiquet M, Tucker RP, Orend G: **Tenascin-C at a glance.** *J. Cell Sci.* 2016, **129**:4321–4327. [doi: 10.1242/jcs.190546] [PMID: 27875272]
 203. Govindan R, Ding L, Griffith M, Subramanian J, Dees ND, Kanchi KL, Maher CA, Fulton R, Fulton L, Wallis J, et al.: **Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers.** *Cell* 2012, **150**:1121–1134. [doi: 10.1016/j.cell.2012.08.024] [PMID: 22980976] [PMCID: PMC3656590]
 204. Tirosh I, Izar B, Prakadan S, Wadsworth M, Treacy D, Trombetta J, Rotem A, Rotman C, Lian C, Murphy G, et al.: **Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq.** *Science* 2016, doi:10.1126/science.aad0501. [doi: 10.1126/science.aad0501] [PMID: 27124452]
 205. Tirosh I, Suvà ML: **Dissecting human gliomas by single-cell RNA sequencing.** *Neuro-Oncol.* 2018, **20**:37–43. [doi: 10.1093/neuonc/nox126] [PMID: 29016805] [PMCID: PMC5761500]
 206. Yu X, Chen YA, Conejo-Garcia JR, Chung CH, Wang X: **Estimation of immune cell content in tumor using single-cell RNA-seq reference data.** *BMC Cancer* 2019, **19**:715. [doi: 10.1186/s12885-019-5927-3]
 207. Davis-Marcisak EF, Sherman TD, Orugunta P, Stein-O'Brien GL, Puram SV, Torres ETR, Hopkins AC, Jaffee EM, Favorov AV, Afsari B, et al.: **Differential Variation Analysis Enables Detection of Tumor Heterogeneity Using Single-Cell RNA-Sequencing Data.** *Cancer Res.* 2019, **79**:5102–5112. [doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3882] [PMID: 31337651]
 208. Zhang Z, Liu R, Jin R, Fan Y, Li T, Shuai Y, Li X, Wang X, Luo J: **Integrating Clinical and Genetic Analysis of Perineural Invasion in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.** *Front. Oncol.* 2019, **9**. [doi: 10.3389/fonc.2019.00434] [PMID: 31214495] [PMCID: PMC6555133]
 209. Xiang Z, Zhou S, Liang S, Zhang G, Tan Y: **RCOR1 directly binds to MED28 and weakens its inducing effect on cancer stem cell-like activity of oral cavity squamous cell carcinoma cells.** *J. Oral Pathol. Med.* 2020, **49**:741–750. [doi: 10.1111/jop.13022]
 210. Jerby-Arnon L, Shah P, Cuoco M, Rodman C, Su M, Melms J, Leeson R, Kanodia A, Mei S, Lin J, et al.: **A Cancer Cell Program Promotes T Cell Exclusion and Resistance to Checkpoint Blockade.** *Cell* 2018, doi:10.1016/j.cell.2018.09.006. [doi: 10.1016/j.cell.2018.09.006] [PMID: 30388455]
 211. Filbin M, Tirosh I, Hovestadt V, Shaw M, Escalante L, Mathewson N, Neftel C, Frank N, Pelton K, Hebert C, et al.: **Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq.** *Science* 2018, doi:10.1126/science.aao4750. [doi: 10.1126/science.aao4750] [PMID: 29674595]
 212. Kagohara LT, Zamuner F, Davis-Marcisak EF, Sharma G, Considine M, Allen J, Yegnasubramanian S, Gaykalova DA, Fertig EJ: **Integrated single-cell and bulk gene expression and ATAC-seq reveals heterogeneity and early changes in pathways associated**

- with resistance to cetuximab in HNSCC-sensitive cell lines.** *Br. J. Cancer* 2020, **123**:101–113. [doi: 10.1038/s41416-020-0851-5] [PMID: 32362655]
213. Peng X, Chen Z, Farshidfar F, Xu X, Lorenzi PL, Wang Y, Cheng F, Tan L, Mojumdar K, Du D, et al.: **Molecular Characterization and Clinical Relevance of Metabolic Expression Subtypes in Human Cancers.** *Cell Rep.* 2018, **23**:255-269.e4. [doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.077] [PMID: 29617665]
214. Amini P, Ettl J, Opitz L, Clementi E, Malbon A, Markkanen E: **An optimised protocol for isolation of RNA from small sections of laser-capture microdissected FFPE tissue amenable for next-generation sequencing.** *BMC Mol. Biol.* 2017, **18**:22. [doi: 10.1186/s12867-017-0099-7]
215. Nakazawa MS, Keith B, Simon MC: **Oxygen Availability and Metabolic Adaptations.** *Nat. Rev. Cancer* 2016, **16**:663–673. [doi: 10.1038/nrc.2016.84] [PMID: 27658636] [PMCID: PMC5546320]
216. Colella S, Richards KL, Bachinski LL, Baggerly KA, Tsavachidis S, Lang JC, Schuller DE, Krahe R: **Molecular signatures of metastasis in head and neck cancer.** *Head Neck* 2008, **30**:1273–1283. [doi: 10.1002/hed.20871] [PMID: 18642293] [PMCID: PMC4136479]
217. Casasent AK, Schalck A, Gao R, Sei E, Long A, Pangburn W, Casasent T, Meric-Bernstam F, Edgerton ME, Navin NE: **Multiclonal Invasion in Breast Tumors Identified by Topographic Single Cell Sequencing.** *Cell* 2018, **172**:205-217.e12. [doi: 10.1016/j.cell.2017.12.007]
218. Cheung KJ, Gabrielson E, Werb Z, Ewald AJ: **Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program.** *Cell* 2013, **155**:1639–1651. [doi: 10.1016/j.cell.2013.11.029] [PMID: 24332913] [PMCID: PMC3941206]
219. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, Yu M, Pely A, Engstrom A, Zhu H, et al.: **Circulating Tumor Cell Clusters are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis.** *Cell* 2014, **158**:1110–1122. [doi: 10.1016/j.cell.2014.07.013] [PMID: 25171411] [PMCID: PMC4149753]
220. Chaudhri VK, Salzler GG, Dick SA, Buckman MS, Sordella R, Karoly ED, Mohny R, Stiles BM, Elemento O, Altorki NK, et al.: **Metabolic alterations in lung cancer-associated fibroblasts correlated with increased glycolytic metabolism of the tumor.** *Mol. Cancer Res. MCR* 2013, **11**:579–592. [doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0437-T] [PMID: 23475953] [PMCID: PMC3686965]
221. Zhang D, Wang Y, Shi Z, Liu J, Sun P, Hou X, Zhang J, Zhao S, Zhou BP, Mi J: **Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by IDH3 α downregulation.** *Cell Rep.* 2015, **10**:1335–1348. [doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.006] [PMID: 25732824]
222. Xing Y, Zhao S, Zhou BP, Mi J: **Metabolic reprogramming of the tumour microenvironment.** *FEBS J.* 2015, **282**:3892–3898. [doi: https://doi.org/10.1111/febs.13402]
223. Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Ertel A, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Birbe RC, Howell A, Pavlides S, Gandara R, et al.: **Evidence for a stromal-epithelial “lactate shuttle” in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts.** *Cell Cycle Georget. Tex* 2011, **10**:1772–1783. [doi: 10.4161/cc.10.11.15659] [PMID: 21558814] [PMCID: PMC3142461]
224. Colegio OR, Chu N-Q, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM, et al.: **Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid.** *Nature* 2014, **513**:559–563. [doi: 10.1038/nature13490] [PMID: 25043024] [PMCID: PMC4301845]
225. Goveia J, Stapor P, Carmeliet P: **Principles of targeting endothelial cell metabolism to treat angiogenesis and endothelial cell dysfunction in disease.** *EMBO Mol. Med.* 2014, **6**:1105–1120. [doi: 10.15252/emmm.201404156] [PMID: 25063693] [PMCID: PMC4197858]
226. Li F, Simon MC: **Cancer Cells Don’t Live Alone: Metabolic Communication within Tumor Microenvironments.** *Dev. Cell* 2020, **54**:183–195. [doi: 10.1016/j.devcel.2020.06.018] [PMID: 32640203]
227. Buck M, Sowell R, Kaech S, Pearce E: **Metabolic Instruction of Immunity.** *Cell* 2017, doi:10.1016/j.cell.2017.04.004. [doi: 10.1016/j.cell.2017.04.004] [PMID: 28475890]
228. Doedens A, Phan A, Stradner M, Fujimoto J, Nguyen J, Yang E, Johnson R, Goldrath A: **Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen.** *Nat. Immunol.* 2013, doi:10.1038/ni.2714. [doi: 10.1038/ni.2714] [PMID: 24076634]

229. Finlay D, Rosenzweig E, Sinclair L, Feijoo-Carnero C, Hukelmann J, Rolf J, Panteleyev A, Okkenhaug K, Cantrell D: **PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8+ T cells.** *J. Exp. Med.* 2012, doi:10.1084/jem.20112607. [doi: 10.1084/jem.20112607] [PMID: 23183047]
230. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, Matos C, Bruss C, Klobuch S, Peter K, et al.: **LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells.** *Cell Metab.* 2016, **24**:657–671. [doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.011] [PMID: 27641098]
231. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, Bronte V, Chouaib S: **PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation.** *J. Exp. Med.* 2014, **211**:781–790. [doi: 10.1084/jem.20131916] [PMID: 24778419] [PMCID: PMC4010891]
232. Weed DT, Vella JL, Reis IM, De la Fuente AC, Gomez C, Sargi Z, Nazarian R, Califano J, Borrello I, Serafini P: **Tadalafil reduces myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells and promotes tumor immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma.** *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2015, **21**:39–48. [doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1711] [PMID: 25320361] [PMCID: PMC4322895]
233. Michalek R, Gerriets V, Jacobs S, Macintyre A, MacIver N, Mason E, Sullivan S, Nichols A, Rathmell J: **Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2011, doi:10.4049/jimmunol.1003613. [doi: 10.4049/jimmunol.1003613] [PMID: 21317389]
234. Angelin A, Gil-de-Gómez L, Dahiya S, Jiao J, Guo L, Levine M, Wang Z, Quinn W, Pk K, L W, et al.: **Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments.** *Cell Metab.* 2017, doi:10.1016/j.cmet.2016.12.018. [doi: 10.1016/j.cmet.2016.12.018] [PMID: 28416194]
235. Newton R, Priyadarshini B, Turka L: **Immunometabolism of regulatory T cells.** *Nat. Immunol.* 2016, doi:10.1038/ni.3466. [doi: 10.1038/ni.3466] [PMID: 27196520]
236. Ou D, Adam J, Garberis I, Blanchard P, Nguyen F, Levy A, Casiraghi O, Gorphe P, Breuskin I, Janot F, et al.: **Influence of tumor-associated macrophages and HLA class I expression according to HPV status in head and neck cancer patients receiving chemo/bioradiotherapy.** *Radiother. Oncol.* 2019, **130**:89–96. [doi: 10.1016/j.radonc.2018.08.013] [PMID: 30172455]
237. Lechien J, Seminerio I, Descamps G, Mat Q, Mouawad F, Hans S, Julieron M, Dequanter D, Vanderhaegen T, Journe F, et al.: **Impact of HPV Infection on the Immune System in Oropharyngeal and Non-Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review.** *Cells* 2019, doi:10.3390/cells8091061. [doi: 10.3390/cells8091061] [PMID: 31510065]
238. Verstraete FJM: **Mandibulectomy and maxillectomy.** *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2005, **35**:1009–1039, viii. [doi: 10.1016/j.cvsm.2005.03.005] [PMID: 15979523]
239. McMahon J, O'Brien CJ, Pathak I, Hamill R, McNeil E, Hammersley N, Gardiner S, Junor E: **Influence of condition of surgical margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal cancer.** *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2003, **41**:224–231. [doi: 10.1016/s0266-4356(03)00119-0] [PMID: 12946663]
240. Anderson CR, Sisson K, Moncrieff M: **A meta-analysis of margin size and local recurrence in oral squamous cell carcinoma.** *Oral Oncol.* 2015, **51**:464–469. [doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.01.015] [PMID: 25716108]
241. Wallace J, Matthiesen DT, Patnaik AK: **Hemimaxillectomy for the treatment of oral tumors in 69 dogs.** *Vet. Surg. VS* 1992, **21**:337–341. [doi: 10.1111/j.1532-950x.1992.tb01707.x] [PMID: 1413465]
242. Dvorak LD, Beaver DP, Ellison GW, Bellah JR, Mann FA, Henry CJ: **Major glossectomy in dogs: a case series and proposed classification system.** *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2004, **40**:331–337. [doi: 10.5326/0400331] [PMID: 15238564]
243. MacLellan RH, Rawlinson JE, Rao S, Worley DR: **Intraoperative and postoperative complications of partial maxillectomy for the treatment of oral tumors in dogs.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2018, **252**:1538–1547. [doi: 10.2460/javma.252.12.1538] [PMID: 29889637]
244. Congiusta M, Lawrence J, Rendahl A, Goldschmidt S: **Variability in Recommendations for Cervical Lymph Node Pathology for Staging of Canine Oral Neoplasia: A Survey Study.** *Front. Vet. Sci.* 2020, **7**:506. [doi: 10.3389/fvets.2020.00506] [PMID: 32903520] [PMCID: PMC7438545]

245. Koyfman SA, Ismaila N, Crook D, D’Cruz A, Rodriguez CP, Sher DJ, Silbermins D, Sturgis EM, Tsue TT, Weiss J, et al.: **Management of the Neck in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity and Oropharynx: ASCO Clinical Practice Guideline.** *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2019, **37**:1753–1774. [doi: 10.1200/JCO.18.01921] [PMID: 30811281] [PMCID: PMC7098829]
246. de Bree R, Takes RP, Shah JP, Hamoir M, Kowalski LP, Robbins KT, Rodrigo JP, Sanabria A, Medina JE, Rinaldo A, et al.: **Elective neck dissection in oral squamous cell carcinoma: Past, present and future.** *Oral Oncol.* 2019, **90**:87–93. [doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.01.016] [PMID: 30846183]
247. Fasanla AJ, Greene BH, Timmesfeld N, Wiegand S, Werner JA, Sesterhenn AM: **A meta-analysis of the randomized controlled trials on elective neck dissection versus therapeutic neck dissection in oral cavity cancers with clinically node-negative neck.** *Oral Oncol.* 2011, **47**:320–324. [doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.03.009] [PMID: 21459661]
248. Hutchison IL, Ridout F, Cheung SMY, Shah N, Hardee P, Surwald C, Thiruchelvam J, Cheng L, Mellor TK, Brennan PA, et al.: **Nationwide randomised trial evaluating elective neck dissection for early stage oral cancer (SEND study) with meta-analysis and concurrent real-world cohort.** *Br. J. Cancer* 2019, **121**:827–836. [doi: 10.1038/s41416-019-0587-2] [PMID: 31611612] [PMCID: PMC6888839]
249. Rodrigo JP, Grilli G, Shah JP, Medina JE, Robbins KT, Takes RP, Hamoir M, Kowalski LP, Suárez C, López F, et al.: **Selective neck dissection in surgically treated head and neck squamous cell carcinoma patients with a clinically positive neck: Systematic review.** *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* 2018, **44**:395–403. [doi: 10.1016/j.ejso.2018.01.003] [PMID: 29395434]
250. Hellman S, Weichselbaum RR: **Oligometastases.** *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 1995, **13**:8–10. [doi: 10.1200/JCO.1995.13.1.8] [PMID: 7799047]
251. Sun XS, Michel C, Babin E, De Raucourt D, Péchery A, Gherga E, Géry B, Florescu C, Bourhis J, Thariat J: **Approach to oligometastatic disease in head and neck cancer, on behalf of the GORTEC.** *Future Oncol. Lond. Engl.* 2018, **14**:877–889. [doi: 10.2217/fon-2017-0468] [PMID: 29578359]
252. Young ER, Diakos E, Khalid-Raja M, Mehanna H: **Resection of subsequent pulmonary metastases from treated head and neck squamous cell carcinoma: systematic review and meta-analysis.** *Clin. Otolaryngol. Off. J. ENT-UK Off. J. Neth. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. Cervico-Facial Surg.* 2015, **40**:208–218. [doi: 10.1111/coa.12348] [PMID: 25358605]
253. Florescu C, Thariat J: **Local ablative treatments of oligometastases from head and neck carcinomas.** *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2014, **91**:47–63. [doi: 10.1016/j.critrevonc.2014.01.004] [PMID: 24556572]
254. Scherf G: **La radiothérapie par mégavoltage du carcinome épidermoïde buccal non amygdalien du chien : étude rétrospective de 32 cas.** Thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de Médecine de Créteil. 2016.
255. Riggs J, Adams VJ, Hermer JV, Dobson JM, Murphy S, Ladlow JF: **Outcomes following surgical excision or surgical excision combined with adjunctive, hypofractionated radiotherapy in dogs with oral squamous cell carcinoma or fibrosarcoma.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2018, **253**:73–83. [doi: 10.2460/javma.253.1.73] [PMID: 29911943]
256. Mosca A, Gibson D, Mason SL, Dobson J, Giuliano A: **A possible role of coarse fractionated radiotherapy in the management of gingival squamous cell carcinoma in dogs: A retrospective study of 21 cases from two referral centers in the UK.** *J. Vet. Med. Sci.* 2021, **83**:447–455. [doi: 10.1292/jvms.20-0191] [PMID: 33487622] [PMCID: PMC8025409]
257. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL: **Head and neck cancer.** *Lancet Lond. Engl.* 2008, **371**:1695–1709. [doi: 10.1016/S0140-6736(08)60728-X] [PMID: 18486742] [PMCID: PMC7720415]
258. Expert Panel on Radiation Oncology-Head and Neck, Salama JK, Saba N, Quon H, Garg MK, Lawson J, McDonald MW, Ridge JA, Smith RV, Yeung AR, et al.: **ACR appropriateness criteria® adjuvant therapy for resected squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Oral Oncol.* 2011, **47**:554–559. [doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.05.002] [PMID: 21664857]
259. Margalit DN, Sacco AG, Cooper JS, Ridge JA, Bakst RL, Beadle BM, Beitler JJ, Chang SS, Chen AM, Galloway TJ, et al.: **Systematic review of postoperative therapy for resected squamous cell carcinoma of the head and neck: Executive summary of the American Radium Society**

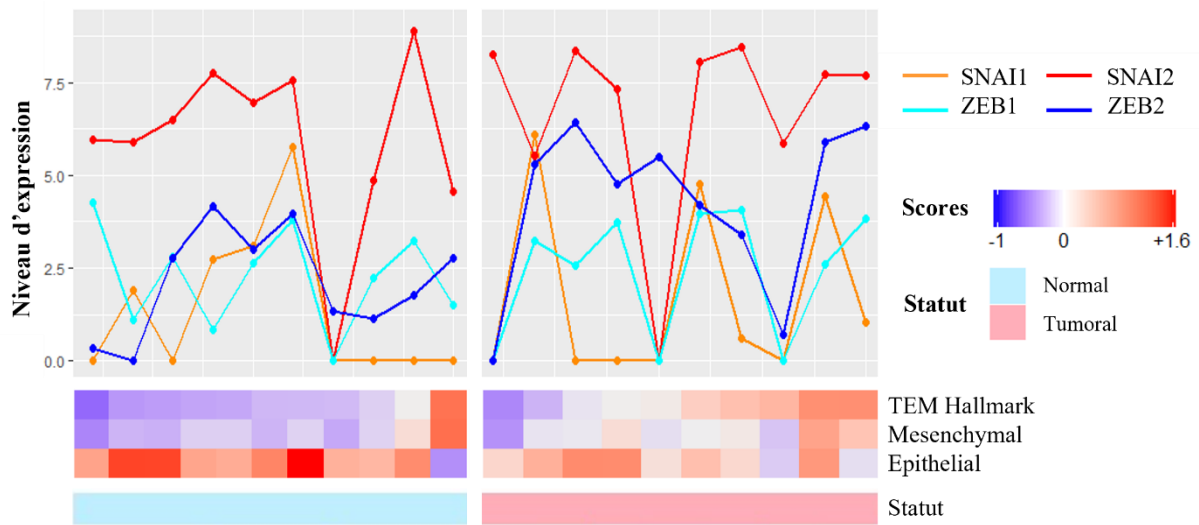
- appropriate use criteria.** *Head Neck* 2021, **43**:367–391. [doi: 10.1002/hed.26490] [PMID: 33098180] [PMCID: PMC7756212]
260. Evans SM, Shofer F: **Canine Oral Nontonsillar Squamous Cell Carcinoma.** *Vet. Radiol.* 1988, **29**:133–137. [doi: 10.1111/j.1740-8261.1988.tb01763.x]
261. LaDue-Miller T, Price GS, Page RL, Thrall DE: **Radiotherapy of Canine Non-Tonsillar Squamous Cell Carcinoma.** *Vet. Radiol. Ultrasound* 1996, **37**:74–77. [doi: 10.1111/j.1740-8261.1996.tb00817.x]
262. Théon AP, Rodriguez C, Madewell BR: **Analysis of prognostic factors and patterns of failure in dogs with malignant oral tumors treated with megavoltage irradiation.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1997, **210**:778–784. [PMID: 9074679]
263. Cerrati EW, Nguyen SA, Farrar JD, Lentsch EJ: **The efficacy of photodynamic therapy in the treatment of oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis.** *Ear. Nose. Throat J.* 2015, **94**:72–79. [doi: 10.1177/014556131509400208] [PMID: 25651350]
264. McCaw DL, Pope ER, Payne JT, West MK, Tompson RV, Tate D: **Treatment of canine oral squamous cell carcinomas with photodynamic therapy.** *Br. J. Cancer* 2000, **82**:1297–1299. [doi: 10.1054/bjoc.1999.1094] [PMID: 10755404] [PMCID: PMC2374488]
265. Kish JA, Weaver A, Jacobs J, Cummings G, Al-Sarraf M: **Cisplatin and 5-fluorouracil infusion in patients with recurrent and disseminated epidermoid cancer of the head and neck.** *Cancer* 1984, **53**:1819–1824. [doi: 10.1002/1097-0142(19840501)53:9<1819::aid-cncr2820530903>3.0.co;2-r] [PMID: 6538456]
266. Kish JA, Ensley JF, Jacobs J, Weaver A, Cummings G, Al-Sarraf M: **A randomized trial of cisplatin (CACP) + 5-fluorouracil (5-FU) infusion and CACP + 5-FU bolus for recurrent and advanced squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Cancer* 1985, **56**:2740–2744. [doi: 10.1002/1097-0142(19851215)56:12<2740::aid-cncr2820561203>3.0.co;2-y] [PMID: 3902199]
267. Argiris A, Li Y, Forastiere A: **Prognostic factors and long-term survivorship in patients with recurrent or metastatic carcinoma of the head and neck.** *Cancer* 2004, **101**:2222–2229. [doi: 10.1002/cncr.20640] [PMID: 15452834]
268. Szturcz P, Vermorken JB: **Management of recurrent and metastatic oral cavity cancer: Raising the bar a step higher.** *Oral Oncol.* 2020, **101**:104492. [doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.104492] [PMID: 31837576]
269. Gibson MK, Li Y, Murphy B, Hussain MHA, DeConti RC, Ensley J, Forastiere AA, Eastern Cooperative Oncology Group: **Randomized phase III evaluation of cisplatin plus fluorouracil versus cisplatin plus paclitaxel in advanced head and neck cancer (E1395): an intergroup trial of the Eastern Cooperative Oncology Group.** *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2005, **23**:3562–3567. [doi: 10.1200/JCO.2005.01.057] [PMID: 15908667]
270. Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, Mickiewicz E, Winkquist E, Gorbounova V, Tjulandin S, Shin DM, Cullen K, Ervin TJ, et al.: **Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer.** *N. Engl. J. Med.* 2007, **357**:1705–1715. [doi: 10.1056/NEJMoa070956] [PMID: 17960013]
271. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, Stewart JS, Jelic S, Betka J, Preiss JH, et al.: **Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer.** *N. Engl. J. Med.* 2007, **357**:1695–1704. [doi: 10.1056/NEJMoa071028] [PMID: 17960012]
272. Schmidt BR, Glickman NW, DeNicola DB, de Gortari AE, Knapp DW: **Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2001, **218**:1783–1786. [doi: 10.2460/javma.2001.218.1783] [PMID: 11394830]
273. Boria PA, Murry DJ, Bennett PF, Glickman NW, Snyder PW, Merkel BL, Schlittler DL, Mutsaers AJ, Thomas RM, Knapp DW: **Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2004, **224**:388–394. [doi: 10.2460/javma.2004.224.388] [PMID: 14765798]
274. de Vos JP, Burm AGD, Focker AP, Boschloo H, Karsijns M, van der Waal I: **Piroxicam and carboplatin as a combination treatment of canine oral non-tonsillar squamous cell carcinoma: a pilot study and a literature review of a canine model of human head and neck squamous cell carcinoma.** *Vet. Comp. Oncol.* 2005, **3**:16–24. [doi: 10.1111/j.1476-5810.2005.00065.x] [PMID: 19379210]

275. Waite A, Balkman C, Bailey D, Kiselow M, Flory A, Beaulieu BB, Lewis LD, McEntee M: **Phase II study of oral docetaxel and cyclosporine in canine epithelial cancer.** *Vet. Comp. Oncol.* 2014, **12**:160–168. [doi: 10.1111/j.1476-5829.2012.00350.x] [PMID: 22905693]
276. Enokida T, Tahara M: **Electrochemotherapy in the Treatment of Head and Neck Cancer: Current Conditions and Future Directions.** *Cancers* 2021, **13**:1418. [doi: 10.3390/cancers13061418] [PMID: 33808884] [PMCID: PMC8003720]
277. Plaschke CC, Bertino G, McCaul JA, Grau JJ, de Bree R, Sersa G, Occhini A, Groselj A, Langdon C, Heuveling DA, et al.: **European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results from the treatment of mucosal cancers.** *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* 2017, **87**:172–181. [doi: 10.1016/j.ejca.2017.10.008] [PMID: 29156298]
278. Longo F, Perri F, Pavone E, Aversa C, Maglione MG, Guida A, Montano M, Villano S, Daponte A, Caponigro F, et al.: **Electrochemotherapy as palliative treatment in patients with advanced head and neck tumours: Outcome analysis in 93 patients treated in a single institution.** *Oral Oncol.* 2019, **92**:77–84. [doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.03.016] [PMID: 31010628]
279. Plaschke CC, Johannesen HH, Hansen RH, Hendel HW, Kiss K, Gehl J, Wessel I: **The DAHANCA 32 study: Electrochemotherapy for recurrent mucosal head and neck cancer.** *Head Neck* 2019, **41**:329–339. [doi: 10.1002/hed.25454] [PMID: 30552847]
280. Plaschke CC, Gothelf A, Gehl J, Wessel I: **Electrochemotherapy of mucosal head and neck tumors: a systematic review.** *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 2016, **55**:1266–1272. [doi: 10.1080/0284186X.2016.1207803] [PMID: 27705053]
281. Simčič P, Lowe R, Granziera V, Pierini A, Torrigiani F, Lubas G: **Electrochemotherapy in treatment of canine oral non-tonsillar squamous cell carcinoma. A case series report.** *Vet. Comp. Oncol.* 2020, **18**:428–432. [doi: 10.1111/vco.12530] [PMID: 31419028]
282. Cai S, Zhang T, Forrest WC, Yang Q, Groer C, Mohr E, Aires DJ, Axiak-Bechtel SM, Flesner BK, Henry CJ, et al.: **Phase I-II clinical trial of hyaluronan-cisplatin nanoconjugate in dogs with naturally occurring malignant tumors.** *Am. J. Vet. Res.* 2016, **77**:1005–1016. [doi: 10.2460/ajvr.77.9.1005] [PMID: 27580113] [PMCID: PMC5008241]
283. Cai S, Zhang T, Groer C, Forrest M, Aires D, Otte V, Barchman S, Faerber A, Forrest ML: **Injectable Chemotherapy Downstaged Oral Squamous Cell Carcinoma from Nonresectable to Resectable in a Rescue Dog: Diagnosis, Treatment, and Outcome.** *Case Rep. Vet. Med.* 2018, **2018**:9078537. [doi: 10.1155/2018/9078537] [PMID: 30402324] [PMCID: PMC6196918]
284. Liu L, Chen J, Cai X, Yao Z, Huang J: **Progress in targeted therapeutic drugs for oral squamous cell carcinoma.** *Surg. Oncol.* 2019, **31**:90–97. [doi: 10.1016/j.suronc.2019.09.001] [PMID: 31550560]
285. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer H-R, Cupissol D, et al.: **Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer.** *N. Engl. J. Med.* 2008, **359**:1116–1127. [doi: 10.1056/NEJMoa0802656] [PMID: 18784101]
286. Machiels J-P, Subramanian S, Ruzsa A, Repassy G, Lifirenko I, Flygare A, Sørensen P, Nielsen T, Lisby S, Clement PMJ: **Zalutumumab plus best supportive care versus best supportive care alone in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck after failure of platinum-based chemotherapy: an open-label, randomised phase 3 trial.** *Lancet Oncol.* 2011, **12**:333–343. [doi: 10.1016/S1470-2045(11)70034-1] [PMID: 21377930]
287. Vermorken JB, Stöhlmacher-Williams J, Davidenko I, Licitra L, Winquist E, Villanueva C, Foa P, Rottey S, Skladowski K, Tahara M, et al.: **Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial.** *Lancet Oncol.* 2013, **14**:697–710. [doi: 10.1016/S1470-2045(13)70181-5] [PMID: 23746666]
288. Adkins D, Oppelt PJ, Ley JC, Trinkaus K, Neupane PC, Sacco AG, Palka KA, Worden FP, Grilley-Olson JE, Maggiore RJ, et al.: **Multicenter phase II trial of palbociclib, a selective cyclin dependent kinase (CDK) 4/6 inhibitor, and cetuximab in platinum-resistant HPV unrelated (-) recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (RM HNSCC).** *J. Clin. Oncol.* 2018, **36**:6008–6008. [doi: 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.6008]
289. Rathore K, Alexander M, Cekanova M: **Piroxicam inhibits Masitinib-induced cyclooxygenase 2 expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro.** *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 2014, **164**:158–168. [doi: 10.1016/j.trsl.2014.02.002] [PMID: 24631063]

290. Smolensky D, Rathore K, Bourn J, Cekanova M: **Inhibition of the PI3K/AKT Pathway Sensitizes Oral Squamous Cell Carcinoma Cells to Anthracycline-Based Chemotherapy In Vitro.** *J. Cell. Biochem.* 2017, **118**:2615–2624. [doi: 10.1002/jcb.25747] [PMID: 27649518] [PMCID: PMC5572634]
291. Carreau NA, Pavlick AC: **Nivolumab and ipilimumab: immunotherapy for treatment of malignant melanoma.** *Future Oncol. Lond. Engl.* 2019, **15**:349–358. [doi: 10.2217/fon-2018-0607] [PMID: 30334646]
292. Wei SC, Duffy CR, Allison JP: **Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy.** *Cancer Discov.* 2018, **8**:1069–1086. [doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0367] [PMID: 30115704]
293. Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, Dinis J, Licitra L, Ahn M-J, Soria A, Machiels J-P, Mach N, Mehra R, et al.: **Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study.** *Lancet Lond. Engl.* 2019, **393**:156–167. [doi: 10.1016/S0140-6736(18)31999-8] [PMID: 30509740]
294. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G, Psyrrí A, Basté N, Neupane P, Bratland Å, et al.: **Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study.** *Lancet Lond. Engl.* 2019, **394**:1915–1928. [doi: 10.1016/S0140-6736(19)32591-7] [PMID: 31679945]
295. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C, et al.: **Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck.** *N. Engl. J. Med.* 2016, **375**:1856–1867. [doi: 10.1056/NEJMoa1602252] [PMID: 27718784] [PMCID: PMC5564292]
296. Cramer JD, Burtneß B, Ferris RL: **Immunotherapy for head and neck cancer: Recent advances and future directions.** *Oral Oncol.* 2019, **99**:104460. [doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.104460] [PMID: 31683169] [PMCID: PMC7749717]
297. Almangush A, Leivo I, Mäkitie AA: **Biomarkers for Immunotherapy of Oral Squamous Cell Carcinoma: Current Status and Challenges.** *Front. Oncol.* 2021, **11**:616629. [doi: 10.3389/fonc.2021.616629] [PMID: 33763354] [PMCID: PMC7982571]
298. Olin MR, Ampudia-Mesias E, Pennell CA, Sarver A, Chen CC, Moertel CL, Hunt MA, Pluhar GE: **Treatment Combining CD200 Immune Checkpoint Inhibitor and Tumor-Lysate Vaccination after Surgery for Pet Dogs with High-Grade Glioma.** *Cancers* 2019, **11**:E137. [doi: 10.3390/cancers11020137] [PMID: 30682795] [PMCID: PMC6406711]
299. Maekawa N, Konnai S, Nishimura M, Kagawa Y, Takagi S, Hosoya K, Ohta H, Kim S, Okagawa T, Izumi Y, et al.: **PD-L1 immunohistochemistry for canine cancers and clinical benefit of anti-PD-L1 antibody in dogs with pulmonary metastatic oral malignant melanoma.** *NPJ Precis. Oncol.* 2021, **5**:10. [doi: 10.1038/s41698-021-00147-6] [PMID: 33580183] [PMCID: PMC7881100]
300. Igase M, Nemoto Y, Itamoto K, Tani K, Nakaichi M, Sakurai M, Sakai Y, Noguchi S, Kato M, Tsukui T, et al.: **A pilot clinical study of the therapeutic antibody against canine PD-1 for advanced spontaneous cancers in dogs.** *Sci. Rep.* 2020, **10**:18311. [doi: 10.1038/s41598-020-75533-4] [PMID: 33110170] [PMCID: PMC7591904]
301. Maekawa N, Konnai S, Takagi S, Kagawa Y, Okagawa T, Nishimori A, Ikebuchi R, Izumi Y, Deguchi T, Nakajima C, et al.: **A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma.** *Sci. Rep.* 2017, **7**:8951. [doi: 10.1038/s41598-017-09444-2] [PMID: 28827658] [PMCID: PMC5567082]
302. Mroueh R, Nevala A, Haapaniemi A, Pitkäniemi J, Salo T, Mäkitie AA: **Risk of second primary cancer in oral squamous cell carcinoma.** *Head Neck* 2020, **42**:1848–1858. [doi: 10.1002/hed.26107] [PMID: 32057158]
303. Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R: **TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression.** *Curr. Opin. Oncol.* 2013, **25**:76–84. [doi: 10.1097/CCO.0b013e32835b6371] [PMID: 23197193]
304. Hao Y, Baker D, Ten Dijke P: **TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis.** *Int. J. Mol. Sci.* 2019, **20**. [doi: 10.3390/ijms20112767] [PMID: 31195692] [PMCID: PMC6600375]

305. Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, Sabedot TS, Malta TM, Pagnotta SM, Castiglioni I, et al.: **TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data.** *Nucleic Acids Res.* 2016, **44**:e71. [doi: 10.1093/nar/gkv1507] [PMID: 26704973] [PMCID: PMC4856967]
306. Aran D, Sirota M, Butte AJ: **Systematic pan-cancer analysis of tumour purity.** *Nat. Commun.* 2015, **6**:8971. [doi: 10.1038/ncomms9971] [PMID: 26634437] [PMCID: PMC4671203]
307. Xiao, Zhengtao: **scRNA-seq Datasets [Internet].** URL: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.7174922.v2> [Consulté le 12 Mai 2021]
308. Bolger AM, Lohse M, Usadel B: **Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.** *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2014, **30**:2114–2120. [doi: 10.1093/bioinformatics/btu170] [PMID: 24695404] [PMCID: PMC4103590]
309. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR: **STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner.** *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2013, **29**:15–21. [doi: 10.1093/bioinformatics/bts635] [PMID: 23104886] [PMCID: PMC3530905]
310. Love MI, Huber W, Anders S: **Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.** *Genome Biol.* 2014, **15**:550. [doi: 10.1186/s13059-014-0550-8] [PMID: 25516281] [PMCID: PMC4302049]
311. Stephens M: **False discovery rates: a new deal.** *Biostat. Oxf. Engl.* 2017, **18**:275–294. [doi: 10.1093/biostatistics/kxw041] [PMID: 27756721] [PMCID: PMC5379932]
312. Sergushichev AA: **An algorithm for fast preranked gene set enrichment analysis using cumulative statistic calculation.** *bioRxiv* 2016, doi:10.1101/060012. [doi: 10.1101/060012]
313. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P: **The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection.** *Cell Syst.* 2015, **1**:417–425. [doi: 10.1016/j.cels.2015.12.004] [PMID: 26771021] [PMCID: PMC4707969]
314. Tan TZ, Miow QH, Miki Y, Noda T, Mori S, Huang RY-J, Thiery JP: **Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients.** *EMBO Mol. Med.* 2014, **6**:1279–1293. [doi: 10.15252/emmm.201404208] [PMID: 25214461] [PMCID: PMC4287932]
315. Rousseeuw PJ: **Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis.** *J. Comput. Appl. Math.* 1987, **20**:53–65. [doi: 10.1016/0377-0427(87)90125-7]
316. Bulla SC, Badial PR, Silva RC, Lunsford K, Bulla C: **Platelets Inhibit Migration of Canine Osteosarcoma Cells.** *J. Comp. Pathol.* 2017, **156**:3–13. [doi: 10.1016/j.jcpa.2016.10.001] [PMID: 27890405]
317. Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Azov AG, Bennett R, et al.: **Ensembl 2020.** *Nucleic Acids Res.* 2020, **48**:D682–D688. [doi: 10.1093/nar/gkz966] [PMID: 31691826] [PMCID: PMC7145704]
318. Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP: **EMT: 2016.** *Cell* 2016, **166**:21–45. [doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028] [PMID: 27368099]

ANNEXES



Annexe 1 : Hétérogénéité inter-tumorale dans l'expression des FT majeurs de la TEM et dans la signature de TEM, au sein de la cohorte de Guscetti *et al.* Les échantillons ont été séparés selon leur statut (normal ou tumoral), et ordonnés selon leur score 'TEM Hallmark' adapté. Les courbes montrent le niveau d'expression en $\log_2(\text{TPM}+1)$ des FT majeurs de la TEM dans le jeu de données de Guscetti.

La présence de nombreux niveaux d'expression à « 0 » (ou événements de 'drop-out') reflète ici le manque de sensibilité pour la détection des gènes faiblement exprimés. La profondeur de séquençage au sein de la cohorte de Guscetti semble donc trop basse pour permettre une analyse via ce type d'approche.

Etude comparée des carcinomes épidermoïdes oraux chez le Chien et chez l'Homme : caractérisation histologique, immunohistochimique et transcriptomique

Auteur

QUEFFEULOU Alexis

Résumé

Les carcinomes épidermoïdes oraux (OSCC) sont prééminents parmi les cancers oraux du Chien et de l'Homme, avec de nombreuses caractéristiques histologiques communes entre ces deux espèces. Quelques études basées sur le séquençage ARN (RNAseq) ont également rapporté des similarités potentielles entre OSCC canins et humains. Ces similarités incluaient la présence d'un processus de Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM). La TEM met en jeu les facteurs de transcription (FT) majeurs SNAI1/2, TWIST1 et ZEB1/2, avec des données contradictoires quant à leur importance relative au sein des OSCC. L'objectif principal de notre étude était d'investiguer la régulation de la TEM par ces cinq FT dans les OSCC humains et canins, à travers une analyse comparée de jeux de données RNAseq 'bulk' et 'single-cell'. Un second aspect de notre projet était d'évaluer une procédure pour isoler des cellules uniques à partir d'échantillons FFPE d'OSCC canins, avec l'objectif à long terme de réaliser du RNAseq 'single-cell' à partir d'échantillons FFPE. Notre étude a confirmé la présence d'une forte signature TEM dans les OSCC humains et canins. A l'échelle de la tumeur, la signature TEM corrélait avec l'expression de l'ensemble des FT étudiés. Dans les données humaines, la pureté des échantillons était un facteur de confusion potentiel pour l'étude de la TEM, mais n'expliquait pas l'ensemble des variations observées. A l'échelle de la cellule unique, SNAI2 était surexprimé dans des sous-populations de cellules malignes humaines avec des caractéristiques plus mésenchymateuses et/ou moins épithéliales. L'implication des autres FT ne pouvait être exclue. Enfin nous avons généré des suspensions cellulaires à partir d'échantillons FFPE d'OSCC canins. En résumé, nos données soulignent des similarités entre OSCC humains et canins vis-à-vis de la TEM, ainsi que l'importance de prendre en considération l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale pour l'étude de processus comme la TEM.

Mots-clés

Epithélioma spinocellulaire, Homme, Chien, Modèles animaux, Transcriptome

Jury

Président du jury : Pr **BLAY Jean-Yves**
Directeur de thèse : Pr **PONCE Frédérique**
assesseur : Dr **TORTEREAU Antonin**
Membre invité : Dr **MAHTOUK Karène**