

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2023 - Thèse n° 148

**CARACTÉRISATION DE L'INFILTRAT IMMUNITAIRE
DES TUMEURS MAMMAIRES SIMPLES DE LA
CHIENNE**

THESE

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

Et soutenue publiquement le 14 décembre 2023
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

ETERRADOSSI Julia

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2023 - Thèse n° 148

**CARACTÉRISATION DE L'INFILTRAT IMMUNITAIRE
DES TUMEURS MAMMAIRES SIMPLES DE LA
CHIENNE**

THESE

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

Et soutenue publiquement le 14 décembre 2023
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

ETERRADOSSI Julia

Liste des enseignants

Pr	ABITBOL	Marie	Professeur
Dr	ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences
Pr	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Professeur
Dr	AYRAL	Florence	Maître de conférences
Pr	BECKER	Claire	Professeur
Dr	BELLUCO	Sara	Maître de conférences
Dr	BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences
Pr	BENOIT	Etienne	Professeur
Pr	BERNY	Philippe	Professeur
Pr	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur
Dr	BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences
Dr	BRUTO	Maxime	Maître de conférences
Dr	BRUYERE	Pierre	Maître de conférences
Pr	BUFF	Samuel	Professeur
Pr	BURONFOSSE	Thierry	Professeur
Dr	CACHON	Thibaut	Maître de conférences
Pr	CADORÉ	Jean-Luc	Professeur
Pr	CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Professeur
Pr	CHABANNE	Luc	Professeur
Pr	CHALVET-MONFRAY	Karine	Professeur
Dr	CHANOIT	Gillaume	Professeur
Dr	CHETOT	Thomas	Maître de conférences
Pr	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Professeur
Pr	DELIQUETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur
Pr	DJELOUADJI	Zorée	Professeur
Dr	ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences
Dr	FRIKHA	Mohamed-Ridha	Maître de conférences
Dr	GALIA	Wessam	Maître de conférences
Pr	GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur
Dr	GONTHIER	Alain	Maître de conférences
Dr	GREZEL	Delphine	Maître de conférences
Dr	HUGONNARD	Marine	Maître de conférences
Dr	JOSSON-SCHRAMME	Anne	Chargé d'enseignement contractuel
Pr	JUNOT	Stéphane	Professeur
Pr	KODJO	Angeli	Professeur
Dr	KRAFFT	Emilie	Maître de conférences
Dr	LAABERKI	Maria-Halima	Maître de conférences
Dr	LAMBERT	Véronique	Maître de conférences
Pr	LE GRAND	Dominique	Professeur
Pr	LEBLOND	Agnès	Professeur
Dr	LEDOUX	Dorothée	Maître de conférences
Dr	LEFEBVRE	Sébastien	Maître de conférences
Dr	LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences
Dr	LEGROS	Vincent	Maître de conférences
Pr	LEPAGE	Olivier	Professeur
Pr	LOUZIER	Vanessa	Professeur
Dr	LURIER	Thibaut	Maître de conférences
Dr	MAGNIN	Mathieu	Maître de conférences
Pr	MARCHAL	Thierry	Professeur
Dr	MOSCA	Marion	Maître de conférences
Pr	MOUNIER	Luc	Professeur
Dr	PEROZ	Carole	Maître de conférences
Pr	PIN	Didier	Professeur
Pr	PONCE	Frédérique	Professeur

Pr	PORTIER	Karine	Professeur
Pr	POUZOT-NEVORET	Céline	Professeur
Pr	PROUILLAC	Caroline	Professeur
Pr	REMY	Denise	Professeur
Dr	RENE MARTELLET	Magalie	Maître de conférences
Pr	ROGER	Thierry	Professeur
Dr	SAWAYA	Serge	Maître de conférences
Pr	SCHRAMME	Michael	Professeur
Pr	SERGENTET	Delphine	Professeur
Dr	TORTEREAU	Antonin	Maître de conférences
Dr	VICTONI	Tatiana	Maître de conférences
Dr	VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	Chargé d'enseignement contractuel
Pr	ZENNER	Lionel	Professeur

Remerciements au jury

A la Professeure Isabelle RAY-COQUARD

De l'Université Claude Bernard Lyon 1 et du Centre Léon Bérard,
Qui me fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,
Sincère remerciements

Au Professeur T. Marchal,

De VetagroSup,
Qui a initié et encadré ce projet,
Qui a permis le partenariat avec le Dr. Ménétrier-Caux,
Merci beaucoup.

Au Docteur Emilie ROSSET,

De VetagroSup,
Qui a accepté d'être assesseure de ce projet,
Qui a également beaucoup aidé à la construction de la cohorte prospective,
Merci.

Table des matières

Liste des annexes.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des tableaux.....	17
Liste des abréviations.....	19
Introduction.....	21
Partie 1.....	23
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA CARACTÉRISATION DE L'INFILTRAT IMMUNITAIRE DES TUMEURS MAMMAIRES DE LA CHIENNE.....	23
I. Anatomie, histologie et physiologie de la chaîne mammaire saine de la chienne.....	23
1. Anatomie et histologie de la chaîne mammaire de la chienne.....	23
a. Anatomie topographique de la chaîne mammaire.....	23
b. Anatomie et histologie de la mamelle.....	25
2. Régulation hormonale du développement du parenchyme.....	27
a. Lors du cycle oestral.....	27
b. Lors de la gestation.....	27
c. Lors de la lactation.....	27
3. Surveillance immunitaire physiologique du parenchyme mammaire sain.....	28
II. Épidémiologie des tumeurs mammaires simples de la chienne.....	29
1. Épidémiologie générale.....	29
2. Facteurs de risque.....	30
a. L'âge.....	30
b. L'imprégnation hormonale.....	30
c. L'exposition aux traitements hormonaux supprimeurs de l'oestrus.....	31
d. La prédisposition génétique.....	32
e. Le surpoids et l'obésité.....	33
3. Indicateurs pronostiques.....	33
a. Le grade.....	33
b. La présence d'embolies lymphatiques.....	34
c. La présence de métastases macroscopiques.....	36
d. La taille de la tumeur.....	36
e. L'expression de récepteurs hormonaux.....	37
f. La composition de l'infiltrat immunitaire.....	39
III. Classification histologique des tumeurs mammaires simples de la chienne.....	46
IV. Prise en charge thérapeutique des néoplasies mammaires de la chienne.....	47
1. Gold Standard – Exérèse complète.....	47

2.	Chimiothérapies.....	47
3.	Perspectives de traitements disponibles ou envisagées en médecine humaine	48
V.	Pertinence des tumeurs mammaires spontanées de la chienne pour la modélisation du cancer du sein humain	50
1.	Dissimilarités entre tumeurs mammaires murines et humaines	50
2.	Similarités entre tumeurs mammaires canines et humaines.....	51
3.	Particularités canines pouvant limiter la pertinence du modèle canin	53
Partie 2	55
CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX DES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES INFILTRANT LES TUMEURS MAMMAIRES CANINES.....		55
I.	Matériels et méthodes	55
1.	Échantillons biologiques	55
2.	Isolation des lymphocytes circulants	56
3.	Digestion enzymatique des tissus	56
4.	Activation lymphocytaire	57
5.	Marquages de cytométrie en flux (FC).....	58
6.	Analyse statistique	61
II.	Résultats	62
1.	Screening sur PBMCs de chiens sains d'un panel d'Ac validés chez l'humain.....	62
2.	Quantification par FC de l'infiltrat lymphocytaire des CMT.....	62
III.	Discussion	66
Partie 3	71
CARACTÉRISATION PAR IMMUNOHISTOCHIMIE DES POPULATIONS IMMUNITAIRES INFILTRANT LES TUMEURS MAMMAIRES SIMPLES BÉNIGNES ET MALIGNES DE LA CHIENNE.....		71
I.	Matériels et méthodes	72
1.	Échantillons biologiques	72
2.	Marquages IHC sur coupes FFPE	73
3.	Quantification des marquages IHC	75
4.	Analyse statistique	75
II.	Résultats	77
1.	Applicabilité de l'analyse automatique aux marquages IHC en recherche vétérinaire	77
2.	Impact du développement simultané de multiples foyers tumoraux bénins et malins	79
3.	Identification et caractérisation de structures lymphoïdes stromales chez les chiennes présentant des tumeurs mammaires.....	80
III.	Discussion	83
Conclusion	91

Bibliographie.....	93
Annexes	107

Liste des annexes

Annexe I : Classification histologique de Goldschmidt <i>et al.</i>	107
---	-----

Liste des figures

Figure 1 : Topographie, drainage lymphatique et irrigation artérielle des mamelles de la chienne.....	24
Figure 2 : Histologie de la mamelle de la chienne aux stades de pro-œstrus et de diœstrus	25
Figure 3 : Comparaison histologique du tissu mammaire de la chienne en phases de pro-œstrus et de diœstrus.....	26
Figure 4 : Rôle des différentes populations immunitaires dans les réponses pro- et anti-tumorales ..	41
Figure 5 : Mécanismes effecteurs de la régulation des Teff par les Tregs.....	43
Figure 6 : Différents stades de maturation des TLS associés à des fonctions immunitaires distinctes	45
Figure 7 : Exemple représentatif d'un screening d'anticorps reconnaissant des marqueurs d'activation des lymphocytes T sur des PBMC des chiens sains activés ou non	63
Figure 8 : Exemple représentatif du screening d'anticorps reconnaissant les marqueurs CD39, OX-40, CTLA-4, 4-1BB et GITR humains sur des lymphocytes T CD3+ CD4+ de chiens sains activés ou non	64
Figure 9 : CCR4, TIM-3 et PD-1 sont surexprimés par les lymphocytes T CD8+ dans les CMT.....	65
Figure 10 : Exemples de marquages IHC et procédure d'analyse d'une lame avec le logiciel Halo	76
Figure 11 : Comparaison de l'infiltrat immunitaire dans le stroma et le parenchyme des tissus sains, tumeurs bénignes et tumeurs malignes des cohortes S, B et BM	78
Figure 12 : Observation de structures similaires à des TLS dans le stroma mammaire des chiennes présentant des CMT	81
Figure 13 : Les TLS sont corrélés à la malignité, enrichis en lymphocytes T CD8+, mais pas en cellules prolifératives ou en lymphocytes T régulateurs	82

Figure 14 : Exemples d'artéfacts devant être pris en compte lors du développement d'un outil d'analyse automatisée commun aux différents blocs et tissus composant notre cohorte..... 85

Liste des tableaux

Tableau I : Facteurs de risque pour le développement de tumeurs mammaires canines et similarités avec les tumeurs mammaires humaines	33
Tableau II : Grade des tumeurs mammaires épithéliales canines.....	35
Tableau III : Facteurs pronostiques pour le développement de tumeurs mammaires canines et similarités avec les tumeurs mammaires humaines.....	38
Tableau IV : Diagnostics histologiques et caractéristiques biologiques des cas inclus dans la cohorte prospective	57
Tableau V : Anticorps évalués par cytométrie en flux sur PBMCs canins.....	59
Tableau VI : Tableau VI : Anticorps évalués par cytométrie en flux sur suspensions cellulaires de CMT, LNd et tissu sain.....	60
Tableau VII : Diagnostics histologiques et caractéristiques biologiques des cas inclus dans la cohorte rétrospective	74

Liste des abréviations

Ac : Anticorps

ADCC : Mort Cellulaire Dépendante des Anticorps

cDC1 : Cellule Dendritique conventionnelle de type 1

cDC2 : Cellule Dendritique conventionnelle de type 2

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMT : Tumeur Mammaire Canine

ConA : Concanavaline A

Cox-2 : CycloOxygénase 2

DC : Cellules Dendritiques

DFS : Survie Sans Rechute (Disease Free Survival)

E2 : Œstradiol

EGFR : Récepteur du Facteur de Croissance Endothélial

ER : Récepteur de l'Oestradiol

FC : Cytométrie en Flux

FFPE : Fixé en Formaldéhyde et inclus en Paraffine

GH : Hormone de croissance (Growth Hormone)

HER2 : Récepteur 2 du facteur de Croissance Endothélial Humain (Human Endothelial Growth factor Receptor 2)

HEV : Veinules post capillaires à haut endothélium

HPF : Champs à fort grossissement (High Power Field)

ICP : Point de Contrôle Immunitaire

IGF : Facteur de Croissance Insulin-like (Insulin-like Growth Factor)

IGFR : Récepteur du Facteur de Croissance Insulin-like

IgG : Immunoglobulines de type G

M1 : Mamelle thoracique crâniale

M2 : Mamelle thoracique caudale

M3 : Mamelle abdominale crâniale
M4 : Mamelle abdominale caudale
M5 : Mamelle inguinale
MDSC : Cellules Suppressives Dérivées de cellules Myéloïdes
mIF : multi-immunofluorescence
NA : Non Applicable
ND : Indéterminé
NK : Lymphocytes Natural Killer
NLd : Ganglion Lymphatique Drainant
NO : Monoxyde d'Azote
OS : Survie Globale (Overall Survival)
PBMC : Cellules du Sang Périphérique Mononucléées
pDC : DC plasmacytoides
PR : Récepteur de la Progestérone
RPMIc : Milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 complet
RT : Température ambiante (Room Temperature)
SVF : Sérum de Veau Foetal
TCR : Récepteur des Cellules T
Teff : Lymphocytes T effecteurs CD4⁺
Th2 : Lymphocytes T helpers de type 2
TLS : Structure Lymphoïde Tertiaire
TME : Micro-Environnement Tumoral
TNBC : Cancer du sein Triple Négatif
Treg : Lymphocyte T régulateur

INTRODUCTION

En médecine vétérinaire canine, comme en médecine humaine, le traitement des tumeurs prend une place de plus en plus importante.

Le développement de nouveaux traitements des tumeurs mammaires canines (CMT) est pour l'instant limité. Pourtant, la demande est clairement présente. Les études les plus récentes montrent chez certaines races que jusqu'à 65% des décès sont imputables à un cancer, avec une incidence moyenne toutes races confondues d'environ 300 à 800 / 100,000 (1, 2). Les tumeurs mammaires représentant environ 20% (3) des tumeurs et sont dans 50 % des cas malignes. Les tumeurs mammaires malignes constituent donc une part importante des consultations vétérinaires.

Au contraire des tumeurs mammaires bénignes ou de faible grade de malignité, qui sont plutôt de bon pronostic, les tumeurs mammaires malignes invasives, même prises en charge, ont un pronostic très péjoratif à 1 an post-chirurgie (4, 5). Le développement chez la chienne d'un traitement complémentaire moins contraignant pour le propriétaire et abordable financièrement permettant d'améliorer ce pronostic est donc un enjeu d'importance.

En médecine humaine, les choix thérapeutiques concernant le traitement des cancers sont nombreux et comprennent radiothérapie, chimiothérapies, hormonothérapies, immunothérapies, entre autres. L'utilisation de certaines thérapies ciblées employées chez l'homme pour le traitement des tumeurs très agressives, pourrait être envisagée en médecine vétérinaire. En effet, plusieurs travaux font état de la similarité du micro-environnement tumoral (TME) et de l'infiltrat immunitaire entre les tumeurs mammaires canines et les cancers du sein chez la femme.

Dans ce projet de recherche, j'ai, dans un premier temps, étudié la nature et l'impact de certaines populations immunitaires présentes dans le stroma de tumeurs mammaires chez la chienne en cytométrie en flux, pour proposer une première analyse de la pertinence de la mise en place dans cette espèce d'une immunothérapie pour le traitement des tumeurs mammaires.

Dans un second temps j'ai caractérisé et analysé, par des méthodes immunohistochimiques, la répartition topographique des populations lymphoïdes de la stroma réaction et du parenchyme tumoral dans des cas d'adénocarcinomes mammaires simples chez la chienne. Les informations ainsi obtenues contribuent à

l'évaluation critique de ce type de tumeur comme modèle spontané pour l'étude des cancers du sein triples négatifs de la femme en complément des modèles murins existants de plus en plus remis en question.

PARTIE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA CARACTÉRISATION DE L'INFILTRAT IMMUNITAIRE DES TUMEURS MAMMAIRES DE LA CHIENNE

I. Anatomie, histologie et physiologie de la chaîne mammaire saine de la chienne

1. Anatomie et histologie de la chaîne mammaire de la chienne

a. Anatomie topographique de la chaîne mammaire

Chaque chienne présente deux chaînes mammaires latérales séparées par le *sulcus* inter-mammaire, formées chacune de 5 mamelles en général : 2 mamelles thoraciques, crâniale (M1) et caudale (M2), 2 mamelles abdominales, crâniale (M3) et caudale (M4), et 1 mamelle inguinale (M5) (**Figure 1**). La disparition de M1, ou la présence d'une paire de mamelles supplémentaire est possible, chez les races de petit et grand format, respectivement.

Ces mamelles sont irriguées par les branches efférentes des artères aorte et subclavière et drainées par un système veineux parallèle, incluant les veines thoraciques internes et intercostales. Le drainage direct de M1 par ces veines implique une augmentation du risque de dissémination métastatique par voie veineuse des tumeurs localisées en M1 (**Figure 1**) (6).

En général, M1, M2 et M3 sont drainées par le ganglion lymphatique axillaire, alors que les mamelles caudales M4 et M5 sont drainées par le ganglion lymphatique inguinal superficiel. Cependant, de rares anastomoses du système de drainage lymphatique entre M3 et M4 peuvent être à l'origine d'une dissémination métastatique de tumeurs localisées en M3 et M4 dans les ganglions axillaire et inguinal simultanément, voire dans le ganglion lymphatique iliaque médial. La prise en charge

chirurgicale est donc à adapter en fonction de la localisation de la tumeur, le retrait de plusieurs ganglions drainants pouvant être indiqué pour les tumeurs localisées en M3 et M4 (6, 7).

Suite à la réalisation de lymphogrammes sur des chiennes atteintes de tumeurs mammaires non macroscopiquement métastatiques, Patsikas *et al* ont également rapporté le drainage plus rare de M1, M2 et M3 par le ganglion lymphatique sternal et de M5 par le ganglion lymphatique poplité (une chienne sur des échantillons de huit à neuf animaux) (8).

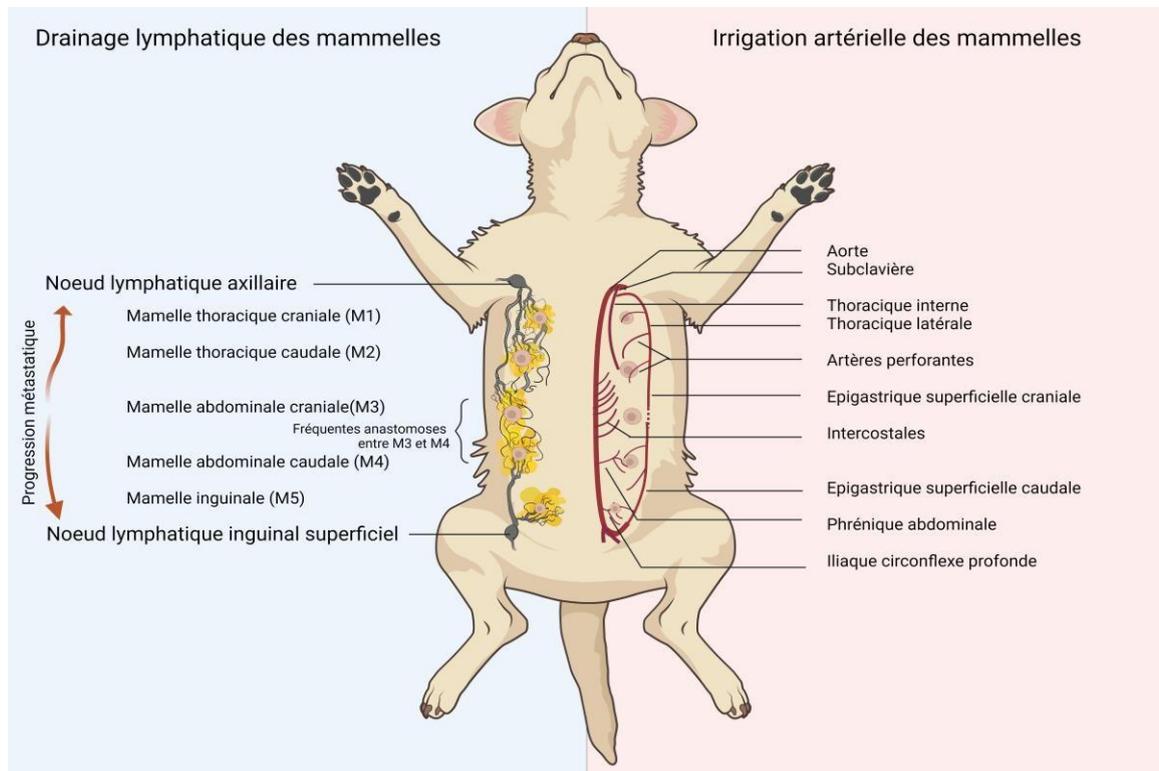


Figure 1 : Topographie, drainage lymphatique et irrigation artérielle des mamelles de la chienne. D'après Zapulli et al. (6)

Les cinq mamelles de la chienne sont principalement drainées par les ganglions lymphatiques axillaire (M1, M2 et M3) et inguinal superficiel (M4 et M5), avec des anastomoses lymphatiques possibles entre M3 et M4. La dissémination métastatique lymphatique se fait principalement dans ces ganglions. L'irrigation artérielle des mamelles de la chienne (et le drainage veineux en miroir) se fait par différents efférents de l'artère aorte (artères thoracique interne, intercostales, phrénique abdominale, etc) et des artères épigastriques.

b. Anatomie et histologie de la mamelle (6)

Les glandes mammaires sont composées de lobules formés d'*acini* et de canaux séparés par un tissu conjonctif contenant des fibroblastes, des adipocytes, des vaisseaux sanguins et des nerfs. Les unités sécrétrices, les acini, communiquent avec des canalicules eux-mêmes en continuité avec des canaux intralobulaires qui en sortant des lobules se poursuivent par des canaux extralobulaires. Ces canaux aboutissent dans les sinus papillaires, qui versent sur l'extérieur par les canaux papillaires (**Figure 2**).

Distalement, les canaux sont formés d'un épithélium pluristratifié de type malpighien et de cellules myoépithéliales supra-basales fusiformes.

Proximale aux *acini*, l'épithélium des canaux et des canalicules devient unistratifié, formé de cellules luminales épithéliales de forme cubique, et de cellules myoépithéliales qui présentent une morphologie étoilée. Un tissu conjonctif composé de fibroblastes et de collagène, dans lequel on observe les artérioles, veinules et vaisseaux lymphatiques sépare les *acini* (**Figure 2**).

Lors du développement mammaire physiologique, les canalicules bourgeonnent à leur extrémité pour former les *acini*.

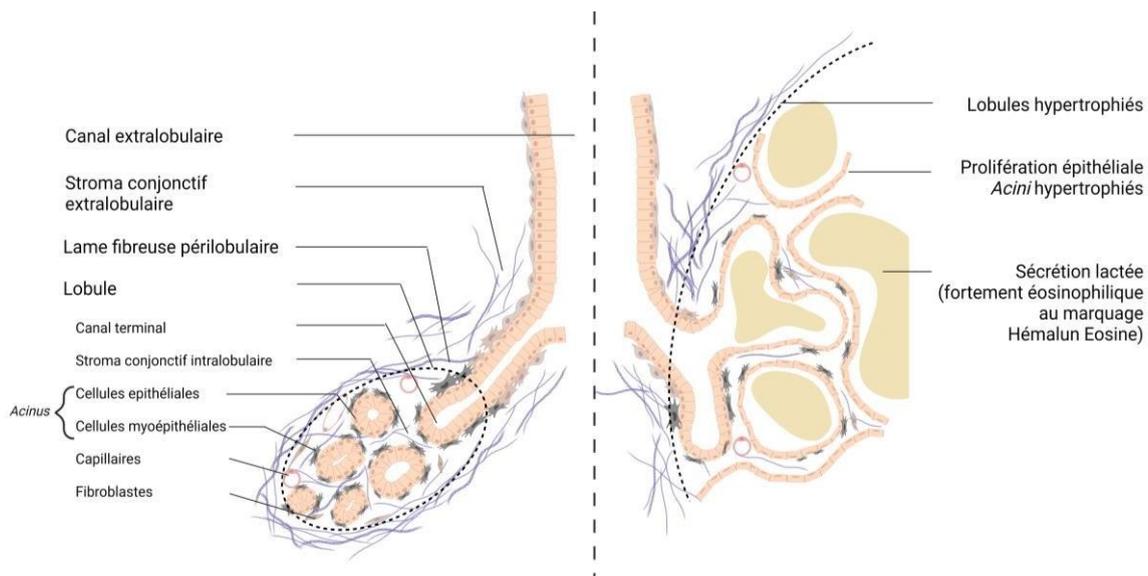


Figure 2 : Histologie de la mamelle de la chienne aux stades de pro-œstrus et de diœstrus.

D'après Zapulli et al. (6)

Le lobule au repos est constitué d'acini formés de cellules épithéliales et myoépithéliales, entouré de stroma conjonctif riche en fibroblastes et en vaisseaux capillaires et délimité par une lame fibreuse périlobulaire. En phase de sécrétion, les lobules sont hypertrophiés avec une importante prolifération épithéliale dans les acini.

Au cours du cycle reproductif, le parenchyme mammaire évolue progressivement entre un état de régression complète en pro-œstrus (les cellules épithéliales sécrétrices au repos sont de petite taille, aplaties ou cubiques avec un cytoplasme vacuolisé et l'infiltrat lymphocytaire et macrophagique dans le tissu conjonctif péri acineux est minime à modéré, **Figure 3A**) et un état de pleine activité en fin de diœstrus (*acini* de grande taille, tapissés par de nombreuses cellules épithéliales cubiques, et dont la lumière, large, contient une sécrétion fortement éosinophile après coloration à l'Hémalun Éosine, **Figure 3B - C**).

Le parenchyme mammaire canin est un bon modèle histologique du parenchyme mammaire humain, également composé de canaux et d'*acini* terminaux formés de cellules épithéliales sécrétrices entourées de cellules musculaires lisses (9).

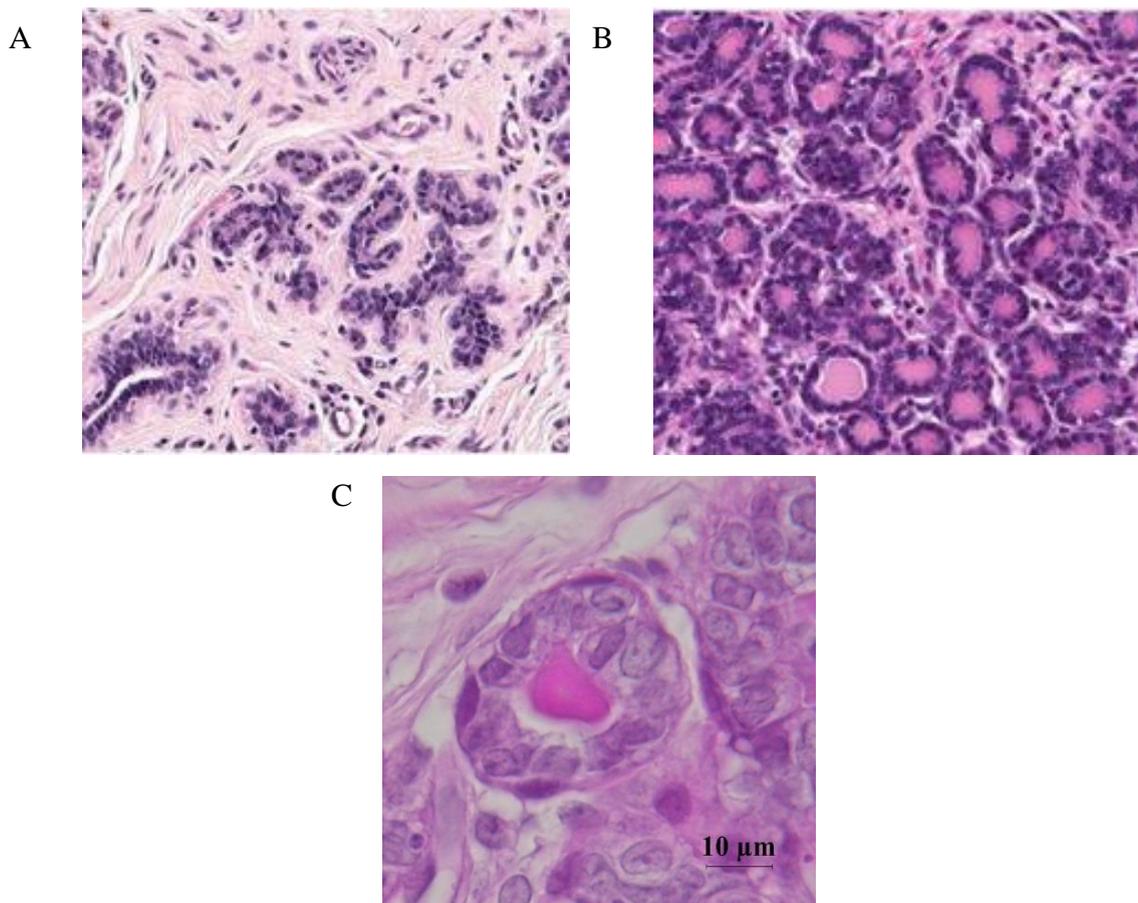


Figure 3 : Comparaison histologique du tissu mammaire de la chienne en phases de pro-œstrus et de diœstrus. Sources : Chandra et al, 2012 (A, B) (10); Laboratoire d'Histopathologie VetagroSup (C).

Au repos, les acini sont de petite taille et entourés d'un stroma peu infiltré (A). En phase de diœstrus, les acini sont de grande taille, tapissés de nombreuses cellules épithéliales cubiques et contiennent une sécrétion fortement éosinophile après coloration à l'Hémalun Éosine (B). Un acinus est formé de cellules épithéliales et de cellules myoépithéliales localisées sur la membrane basale (C).

2. Régulation hormonale du développement du parenchyme

a. Lors du cycle œstral

Le développement de la glande mammaire est régulé par les hormones produites aux différents stades du cycle reproducteur.

Le cycle reproducteur de la chienne adulte dure environ 6 mois à un an. Il est composé de quatre phases. Durant la phase de pro-œstrus, les follicules ovariens se développent et mûrissent. La phase d'œstrus correspond à la période d'ovulation et est associée à un pic d'œstrogènes, qui induisent une prolifération mammaire stromale et ductale. Suite à l'ovulation, en phase de diœstrus, les follicules deviennent des corps jaunes, qui sécrètent de la progestérone pendant environ deux mois suite à l'ovulation. La progestérone est associée à une prolifération mammaire alvéolaire et à une sécrétion lactée physiologique au niveau de l'*acinus* (mais pas nécessairement à une lactation). En fin de diœstrus, en l'absence de fécondation, la glande mammaire régresse, puis reste quiescente en phase d'anœstrus (phase de repos) (9).

Le cycle reproducteur de la femme est lui beaucoup plus court (28 jours en moyenne), mais se compose des mêmes phases et est associé aux mêmes évolutions du parenchyme mammaire (11).

b. Lors de la gestation

Le développement mammaire est progressif lors de la gestation. Suite à la fécondation, l'exposition des cellules épithéliales acinaires à de forts taux de progestérone (sécrétée par le corps jaune puis le placenta), de cortisol et d'insuline induit leur prolifération, jusqu'à l'hyperplasie des *acini*, ainsi qu'une augmentation de l'expression des récepteurs à la prolactine. La forte sécrétion de dopamine par l'hypothalamus inhibe la sécrétion de prolactine et d'hormone de croissance.

c. Lors de la lactation

La diminution de sécrétion de la progestérone précédant la mise bas ou l'accouchement lève l'inhibition sur la prolactine et l'hormone de croissance, sécrétées par l'hypophyse. Cela permet la sécrétion lactée initiale par les *acini* – la montée de lait. La sécrétion lactée est ensuite entretenue par les réflexes neuro-

hormonaux déclenchés par la tétée (stimulation hypothalamique à l'origine de synthèse de prolactine par l'hypophyse antérieure entretenant la galactopoïèse).

Dans le cas des lactations de pseudo-gestation, le corps jaune développé suite aux chaleurs sécrète de la progestérone pendant environ deux mois, induisant le développement du parenchyme mammaire. La dégradation du corps jaune est un phénomène physiologique du cycle reproductif dont la rapidité est individu-dépendante. La dégradation brutale du corps jaune chez certaines chiennes cause le relargage de fortes doses de prolactine, simulant une parturition et induisant une montée de lait en l'absence de fécondation.

On notera que chez la chienne les lactations de pseudo-gestation peuvent être relativement fréquentes selon les races, bien qu'aucune donnée récente sur l'incidence ne soit disponible (incidence de 10 à 20% chez certaines races en 2011) (12).

3. Surveillance immunitaire physiologique du parenchyme mammaire sain de la chienne

Physiologiquement, le tissu mammaire canin est infiltré par différentes populations immunitaires. La nature de l'infiltrat immunitaire varie selon le stade du cycle reproducteur.

Lors de la régression mammaire physiologique, la fuite de protéines et d'acides gras du lait dans les tissus est à l'origine d'une inflammation locale et du recrutement de macrophages. La présence de lymphocytes, de plasmocytes et de macrophages est observée chez la chienne lors de l'anœstrus mais sans aucune mesure quantitative (13).

Chez la femme, Arruvito *et al* ont mis en évidence une corrélation très nette entre l'infiltration mammaire par des lymphocytes T régulateurs et le taux d'œstradiol (E2) sanguin, avec une infiltration maximale en phase d'œstrus (14).

Chez la souris, des études ont également démontré le rôle essentiel des macrophages dans la prolifération alvéolaire et le développement mammaire comme dans le processus de régression (15).

II. Épidémiologie des tumeurs mammaires simples de la chienne

1. Epidémiologie générale

Les CMT sont les tumeurs les plus fréquentes chez la chienne, souvent décrites comme représentant 10% des tumeurs canines en général (16) et 50% des tumeurs des chiennes en particulier (17). Leur incidence est d'environ 300 (2) à 1600 (18) sur 100 000 chiennes, mais est réduite dans les pays pratiquant fréquemment l'ovariectomie ou l'ovario-hystérectomie préventives. L'âge moyen d'occurrence chez la chienne est de 8.5 (tumeurs bénignes) à 9.5 ans (tumeurs malignes) (19). Le pronostic dépend du sous-type histologique et du grade, allant d'une survie moyenne supérieure à 2 ans (tumeurs bénignes) à une survie de trois mois pour les tumeurs les plus agressives (carcinome anaplastique et carcino-sarcome) (5).

50% des tumeurs mammaires sont malignes (20), et 70% des chiennes développant des CMT présentent de multiples tumeurs. L'hypothèse d'une progression du parenchyme mammaire vers la malignité, passant par les stades d'hyperplasie, de lésion pré-néoplasique et de lésion néoplasique bénigne, a été avancée sur la base de la corrélation du grade tumoral avec l'âge de l'animal au diagnostic et la taille tumorale, et du risque accru de développer une CMT maligne chez les chiennes présentant déjà des lésions pré- néoplasiques ou des CMT. Ces observations pourraient également être expliquées par le rôle important de l'imprégnation hormonale : toutes les cellules du parenchyme exposées aux hormones présentant un risque accru de transformation tumorale, le développement de multiples foyers tumoraux indépendant est fréquent (19, 21).

Le développement de carcinomes de bas grade, au comportement bénin mais aux caractéristiques histologiques modérément malignes, au cœur de tumeurs bénignes, décrit par Rasotto *et al* (5), étaye la thèse de la progression des lésions pré-néoplasiques et des tumeurs bénignes vers la malignité.

Le développement de plusieurs foyers tumoraux mammaires indépendants présentant des caractéristiques histologiques distinctes est fréquent chez la chienne. Il est peut-être dû au nombre plus important de paires de mamelles chez la chienne que chez la femme. On notera que chez la femme les cancers du sein bilatéraux représentent 2 à 11 % des cas (22) et les cancers du sein multifocaux (plus d'une concentration

tumorale synchrone dans un même cadran du même sein) ou multicentriques (plus d'une concentration tumorale synchrone dans différents cadrans du sein) environ 25% des cas (23, 24). Les CMT semblent sur ce point un excellent modèle des tumeurs mammaires humaines. L'impact du développement de cancers multifocaux sur d'importants facteurs pronostiques tels que le développement de métastases ou le monitoring immunitaire n'a pas encore été étudié et semble un paramètre important.

2. Facteurs de risque

De nombreux facteurs peuvent jouer un rôle dans le processus de tumorigénèse, en jouant sur les capacités des cellules à proliférer, répondre aux signaux de mort cellulaire, migrer, etc. Les facteurs de risques des CMT sont résumés dans le **Tableau I**.

a. L'âge

L'âge est un facteur de risque important pour le développement de nombreuses tumeurs (**Tableau I**). Une chienne âgée présente plus de risque de développer une tumeur mammaire, et plus de risque que cette tumeur soit maligne (25).

b. L'imprégnation hormonale

Les chiennes entières, ou stérilisées après l'occurrence de leurs deuxièmes chaleurs, sont prédisposées au développement de tumeurs mammaires (26). Lors de l'œstrus, de forts taux d'œstrogènes sont présents dans le sang de la chienne, favorisant le développement canalaire. Le complexe E2 – récepteur de l'E2 (ER) agit après internalisation comme facteur de transcription pour de nombreux gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire et régule le signal d'autres récepteurs hormonaux, tels que le Récepteur de l'Endothelial Growth Factor (EGFR) et de l'Insulin-like Growth Factor (IGFR). Ces trois voies interagissent entre elles et semblent favoriser la tumorigénèse des cellules épithéliales activées (27). L'effet exocrine et paracrine des œstrogènes, activateurs des métallo-protéases extracellulaires, pourrait également expliquer le rôle différenciel de l'imprégnation hormonale initiale dans la prédisposition au développement tumoral. La production importante de stéroïdes par

le tissu tumoral suggère que ces hormones jouent également un rôle auto- et intra-crine d'entretien du développement tumoral.

Les gestations et lactations physiologiques ne sont pas décrites comme des facteurs de risques indépendants de l'absence de stérilisation pour le développement des tumeurs mammaires. Les lactations de pseudo-gestations ont cependant été récemment identifiées comme des facteurs de risques indépendants (28). De manière intéressante, chez la chienne (29) comme chez la femme (30), la nulliparité est un facteur de risque des tumeurs mammaires. L'impact des lactations physiologiques n'est donc pas clair, puisqu'elles sont liées au facteur protecteur qu'est la gestation. Cet effet protecteur pourrait être lié à l'inhibition du cycle reproductif habituel pour la durée de la gestation. On notera cependant que chez la femme, la gestation est associée à une augmentation du risque de cancer à court terme, avant l'effet protecteur à long terme (31). Cette dualité pourrait être liée à la lactation post-gestation.

Une étude récente de Sorenmo *et al.* suggère que les œstrogènes pourraient également jouer un rôle protecteur contre la progression tumorale et le phénomène métastatique, notamment chez les chiennes présentant des tumeurs ER négatives (voir **Partie II. 3. e.**). Les mécanismes impliqués restent à investiguer mais l'autrice suggère une implication d'effets non- récepteur induits (21).

c. L'exposition aux traitements hormonaux supprimeurs de l'œstrus

La suppression ou le retardement temporaire de l'œstrus peut être souhaité par les propriétaires pour des raisons dites « de convenance ». L'administration de progestines (acétate de médroxy-progestérone et proligestone) était prescrite dans ce but jusque dans les années 1980. Cependant, il a été depuis démontré que l'administration de progestines induit de hauts niveaux d'Hormone de Croissance (GH) et d'Insulin-like Growth Factor (IGF1) et est associée au développement de tumeurs mammaires chez les chiennes entières (**Tableau I**).

Ces acteurs physiologiques du développement mammaire ont un rôle dans le développement de lésions pré-néoplasiques et néoplasiques démontré chez la souris et la femme, notamment par l'effet de la GH sur la division des cellules souches (32), l'effet mitogène, anti-apoptotique et anti-angiogénique des axes GH/Récepteur de la

GH et IGF1/IGF1R et l'induction de ER et du Récepteur de la Progestérone (PR). Ces mécanismes médient probablement le développement de tumeurs mammaires suite à l'administration de progestines (33). L'administration de progestines pour la suppression et le retardement de l'œstrus n'est donc plus indiquée chez la chienne.

d. La prédisposition génétique

Les races canines sont caractérisées par leurs phénotypes particuliers. Les croisements répétés d'individus génétiquement similaires pour l'obtention d'hypertypes ou la conservation de caractères d'intérêt a conduit à une augmentation de la fréquence de certaines mutations chez les chiens des différentes races. Il est en effet démontré que la race est un facteur de risque plus important chez les chiennes de pure race que chez les chiennes croisées (34). La prédisposition de certaines de ces races au développement de tumeurs mammaires (comme les petites races en général (34) : Shih Tzu (35), Caniches (16, 36), Yorkshire Terriers (36), *etc*, mais également quelques autres races telles que les Boxers (37) et les Bergers Allemands (16), *etc*) suggère une contribution génétique (**Tableau I**). Chez la femme, la contribution génétique au développement du cancer du sein est importante. Il est généralement admis qu'environ 5% des cancers du sein sont associés à une ou plusieurs mutations héréditaires. Parmi ces mutations, les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont à elles seules responsables d'environ 15% des cas de cancer du sein et de l'ovaire associés à des risques familiaux (38).

Si une corrélation directe entre mutations spécifiques à la race et développement de CMT n'a pas encore été prouvée chez le chien, la fréquence importante de polymorphismes nucléotidiques du gène *BRCA2* (39) chez les races prédisposées semble confirmer la contribution de ces gènes au développement tumoral mammaire chez la chienne.

e. Le surpoids et l'obésité

Comme chez la femme, le surpoids et l'obésité sont significativement associés à des stades tumoraux avancés, à un développement tumoral plus précoce et à une moins bonne survie des chiennes présentant des tumeurs mammaires (**Tableau I**) (40).

Tableau I : Facteurs de risque pour le développement de tumeurs mammaires canines et similarités avec les tumeurs mammaires humaines. D'après Gray et al (41).

Facteur de risque	Impact sur le risque	Similarités avec le cancer du sein
Age	Grade tumoral élevé (25)	Risque augmenté (42)
Imprégnation hormonale physiologique	Risque augmenté (43)	Gestations associées à un OR réduit Première gestation avant 20 ans ou tardive associée à un OR augmenté (44)
Imprégnation hormonale exogène	Risque augmenté Précocité du développement tumoral (43)	OR augmenté (45)
Prédisposition génétique	Risque augmenté (34, 35)	OR augmenté (46)
Surpoids et obésité	Précocité du développement tumoral (47) Grade tumoral élevé (40)	OR augmenté (48)

3. Indicateurs pronostiques

a. Le grade

Par définition, le grade est un outil pour évaluer le pronostic. Il est entièrement basé sur des critères influant sur le pronostic. Une tumeur de haut grade présentera plus de caractéristiques histologiques associées avec un mauvais pronostic qu'une tumeur de bas grade.

Peña *et al* (49) ont défini en 2013 une grille d'évaluation du grade des tumeurs mammaires canines, avec une très bonne corrélation au pronostic. Cette grille est basée sur la quantification pour les cellules épithéliales luminales de trois critères : la formation de tubules, la proportion d'atypies cytonucléaires et le nombre de mitoses (**Tableau II**). Ces critères évaluent la transformation des cellules épithéliales jointives

et faiblement répliquatives en cellules tumorales dédifférenciées, répliquatives et capables de franchir la membrane basale pour infiltrer d'autres tissus.

Cette grille n'est donc pas applicable aux tumeurs non épithéliales, pour lesquelles sont surtout pris en compte l'index mitotique et les atypies cytonucléaires.

Ce système d'évaluation du grade est similaire au système appliqué au cancer du sein de la femme, quoiqu'un peu simplifié car il ne prend pas en compte la taille de la tumeur. Le grade a une place moins centrale dans la détermination du pronostic chez la femme, car d'autres facteurs (notamment l'expression de récepteurs hormonaux, voir **Partie II. 3. e.**) sont pris en compte.

On notera que les critères n'étant ni systématiquement associés, ni mutuellement exclusifs, ni clairement quantitatifs, des tumeurs peuvent présenter des caractéristiques intermédiaires. L'anatomopathologiste effectuant le diagnostic est ainsi une source de variabilité dans le diagnostic.

b. La présence d'emboles lymphatiques

La présence d'emboles lymphatiques (constitués de cellules tumorales) sur une coupe histologique démontre la capacité des cellules tumorales, fortement transformées, à envahir d'autres tissus, par opposition au phénotype de base des cellules épithéliales jointives. L'acquisition par les cellules tumorales d'un phénotype très éloigné de leur phénotype initial est corrélée à la durée de développement de la tumeur et à sa vitesse d'évolution. C'est pourquoi la présence d'emboles lymphatiques est un critère de détermination d'un grade plus avancé.

Leur présence dans les canaux lymphatiques révèle la probable infiltration du ganglion lymphatique, voire d'autres tissus drainés par ce ganglion lymphatique (tels que les poumons, le foie, les reins, la peau, etc) (50). C'est un marqueur de mauvais pronostic, car elle indique la probable présence d'un développement tumoral secondaire dans ces divers organes. La mortalité à deux ans post-chirurgie est huit fois plus importante chez les chiennes présentant des emboles lymphatiques à l'analyse histologique (51).

Tableau II : Grade des tumeurs mammaires épithéliales canines. D'après Peña et al (49)

Critère	Points
A - Formation de tubules	
>75% de la tumeur sont constitués de tubules	1
10-75% de la tumeur sont constitués de tubules	2
<10% de la tumeur sont constitués de tubules	3
B - Pléomorphismes nucléaires	
Petits noyaux uniformes et réguliers, présentant rarement de petits nucléoles	1
Forme et taille des noyaux modérément variables, noyaux hyperchromatiques, présence de nucléoles (parfois de grande taille)	2
Taille des noyaux fortement variable; noyaux hyperchromatiques, avec souvent au moins un nucléole de grande taille	3
C - Index mitotique (nombre / 10 Champs à fort grossissement (HPF))	
0-9 mitoses / 10 HPF	1
10 – 19 mitoses / 10 HPF	2
>19 mitoses / 10 HPF	3
Grading (Score total = A + B + C)	Total
I (bas grade, bien différencié)	3 – 5
II (grade intermédiaire, moyennement différencié)	6 – 7
III (haut grade, faiblement différencié)	8 - 9

c. La présence de métastases macroscopiques

Une métastase représente le développement secondaire d'un foyer tumoral à distance du foyer tumoral primaire. Elle implique la dissémination de cellules tumorales, par voie lymphatique ou veineuse. Chez la chienne, la voie lymphatique est prépondérante et impliquée dans l'invasion des ganglions lymphatiques axillaires et inguinaux, ainsi que des cavités thoracique (poumons) et abdominale (foie) (52). L'invasion du système lymphatique du derme est également possible et caractérise le carcinome mammaire inflammatoire canin, une des tumeurs mammaires canines les plus agressives (53).

La présence de métastases macroscopiques au diagnostic est corrélée à un très mauvais pronostic, avec une mortalité à deux ans post-chirurgie 72 fois plus importante (51). La présence de métastases macroscopiques perturbe également le fonctionnement des organes envahis, diminuant à la fois les chances de survie et la qualité de vie des animaux atteints, souvent pris en charge par des traitements palliatifs.

On notera qu'un outil de classification récapitulant ces derniers points est utilisé pour les tumeurs du sein humaines : le stade TNM. Cet outil se base sur la taille du nodule (T), l'invasion des ganglions lymphatiques drainants (N) et la présence ou non de métastases macroscopiques (M) (54). Cet outil est également utilisé en médecine vétérinaire, mais présente l'inconvénient de ne pas permettre de distinction entre les cas sans invasion à distance, dont le pronostic peut être très variable, et reste donc moins précis que la classification histologique et le grade (55).

d. La taille de la tumeur

Chez la chienne, la taille de la tumeur mammaire au moment du diagnostic est un indicateur pronostique important. Une tumeur de taille plus importante est associée à la malignité et à une mortalité à deux ans post-chirurgie augmentée (51). Cette corrélation taille – malignité est en accord avec l'hypothèse selon laquelle les tumeurs mammaires canines bénignes peuvent progresser vers la malignité. Cependant, la démonstration directe de cette progression reste impossible, car l'échantillonnage d'une même tumeur à plusieurs stades de progression empêcherait la bonne prise en charge des chiennes. La taille de la tumeur au moment du diagnostic ne fait donc pas partie des critères de gradation des tumeurs mammaires canines, mais reste un facteur pronostique important.

e. L'expression de récepteurs hormonaux

Chez la chienne, l'expression des récepteurs hormonaux n'est pas couramment utilisée comme indicateur pronostic.

Il est pourtant prouvé que l'expression des récepteurs hormonaux tels que les récepteurs PR et ER mais aussi la surexpression de Human Endothelial Growth Factor Receptor 2 (HER2) sont des biomarqueurs d'intérêt. La perte de leur expression par les cellules tumorales est associée à un phénotype plus agressif, au développement de métastases et à une survie plus courte, chez la chienne comme chez la femme (55).

L'expression de ces récepteurs peut être utilisée pour définir des sous-types moléculaires (ER/PR⁺ HER2^{neg} pour le type Luminal A, ER/PR⁺ HER2⁺ pour le type Luminal B, ER/PR^{neg} HER2^{+/neg} pour les types triple négatif (TNBC) et basal-like) qui sont associés au pronostic (56).

L'analyse immuno-histochimique (IHC) des CMT est rarement réalisée dans le cadre du suivi clinique, car les résultats obtenus n'affectent pas la prise en charge clinique de l'animal et ces marquages représentent une charge financière supplémentaire pour les propriétaires. Cependant, la validation des CMT comme modèle du cancer du sein nécessitera sans doute la validation des similarités entre tumeurs humaines et canines pour chaque sous-type et l'inclusion d'une caractérisation de ces sous-types moléculaires dans les futures études.

On notera que quelques différences ont été caractérisées au niveau des fréquences de chaque sous-type entre les deux espèces, notamment la composition du sous-type basal-like, qui seront à garder à l'esprit dans le cadre de l'utilisation du modèle CMT de la chienne pour modéliser les cancers du sein de la femme (57).

Tableau III : Facteurs pronostiques pour le développement de tumeurs mammaires canines et similarités avec les tumeurs mammaires humaines. D'après Gray et al (41).

Facteur pronostique	Impact sur le pronostic	Similarités avec le cancer du sein
Age	Survie Globale (OS) et Survie sans maladie (DFS) réduites	OS réduite (58)
Taille de la tumeur	OS et DFS réduites	OS réduite (59)
Ulcération cutanée	OS et DFS réduites	Pas d'association significative (60)
Sous-type histologique	Comédocarcinomes, carcinomes adénoquameux associés à une OS réduite (61)	Comédocarcinome associé à une récurrence locale plus fréquente (62) Carcinomes adénoquameux associés à une meilleure survie à 5 ans (63)
Stade tumoral	OS réduite	OS réduite (58)
Grade	Survie à 2 ans post-chirurgie réduite	OS réduite (58)
Métastase du ganglion lymphatique drainant	Survie à 2 ans post-chirurgie réduite	OS réduite (58)
Métastase à distance	OS réduite	Mortalité augmentée (64)
Faible expression des récepteurs hormonaux	OS et DFS réduites	OS réduite (58)
Expression de la Cyclooxygénase-2	OS et DFS réduites	OS et DFS réduites (65)
Expression de marqueurs de prolifération	OS et DFS réduites Risque métastatique augmenté	Survie réduite (66)
Surpoids et obésité	Survie spécifique réduite (40)	OS et survie spécifique réduite (67)
Infiltrat immunitaire		
	Riche en Tregs, En macrophages de type 2	Survie réduite (68) Grade élevé, invasivité (69, 70) Grade élevé, prolifération tumorale (71)
	Riche en lymphocytes T CD8 ⁺ , en DC	Survie augmentée (68) DFS augmentée (72) Survie sans progression augmentée (73)
	Riche en lymphocytes B	Risque métastatique augmenté (68) Survie augmentée (74)

f. La composition de l'infiltrat immunitaire

L'infiltrat immunitaire joue un rôle essentiel dans le développement ou non des cancers. La tumorigénèse est un phénomène progressif, impliquant l'accumulation de mutations modifiant notamment la capacité des cellules à proliférer et à migrer et induisant l'expression d'antigènes (Ag) tumoraux spécifiques. La réponse anti-tumorale est entre autres médiée par les lymphocytes Natural Killer (NK) et les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques qui produisent des molécules cytotoxiques (perforine, granzyme B), induisent l'apoptose des cellules tumorales ou produisent des cytokines pro-inflammatoires. La pression de sélection exercée sur les cellules tumorales mène parfois à l'acquisition de mécanismes de résistance, tels que la perte d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou l'expression de points de contrôle immunitaires (ICP) CTLA-4 ou PD-L1 à la surface des cellules tumorales, qui limitent la réponse effectrice anti-tumorale. C'est le phénomène d'échappement de la tumeur au contrôle du système immunitaire. Parmi les nombreux autres mécanismes tumoraux d'échappement, le détournement par la tumeur de mécanismes physiologiques de tolérance (lymphocytes T régulateurs (Tregs) (75), macrophages régulateurs (70), etc) est souvent corrélé à un mauvais pronostic (**Figure 4**).

Le système immunitaire étant un outil extrêmement efficace, le concept de base des immunothérapies est de réactiver la réponse immunitaire anti-tumorale par différents moyens (déplétion des cellules régulatrices, réactivation de la réponse anti-tumorale, entre autres). Une telle approche est envisageable en médecine vétérinaire, car l'infiltrat immunitaire des CMT, bien que moins précisément caractérisé, semble assez proche de celui des tumeurs mammaires humaines.

Régulation par les cellules myéloïdes dans le TME

Dans le cancer du sein, plusieurs populations myéloïdes ont été identifiées comme jouant un rôle majeur dans la réponse immunitaire pro-tumorale : les macrophages et les cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde (MDSCs) par exemple (70, 76).

Les macrophages sont des cellules aux fonctions variables (phagocytose, sécrétion de signaux pro- ou anti-inflammatoires), fortement influencées par les conditions environnementales. Chez l'humain, il existe en effet un spectre de polarisation des

macrophages variant d'un phénotype fortement pro-inflammatoire (producteurs de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-6, IFN de type I, *etc*) dans des environnements riches en IFN- α , à des phénotypes fortement régulateurs (producteurs d'IL-10, de monoxyde d'azote (NO) et de chimiokines telles que CXCL1 (77) ou CCL22 (78) permettant le recrutement d'acteurs régulateurs de l'immunité adaptative) dans des environnements riches en IL-4, IL-10, IL-13, *etc* (**Figure 4**) (70). Chow *et al* ont récemment démontré, au niveau transcriptomique, la similarité des phénotypes de macrophages canins et humains (79).

Comme chez la femme, la présence de macrophages dans les tumeurs mammaires canines est corrélée au grade (80) et au facteur de risque qu'est le surpoids (81). Parisi *et al* décrivent plus spécifiquement des macrophages exprimant CD204, associés au grade, à l'invasion lymphatique et à une survie réduite (82, 83). Il est probable que les macrophages canins contribuent au climat régulateur du TME, par la sécrétion de cytokines régulatrices telles que l'IL-10.

Nous caractériserons les macrophages par l'utilisation du marqueur de macrophages activés IBA-1. Il est également connu qu'IBA-1 peut être exprimé par les cellules de Langerhans, une population généralement décrite comme de bon pronostic dans différents types de carcinomes (84–86), de même que par certaines cellules dendritiques (DCs) chez le chien (87). Considérant tout cela, nous faisons l'hypothèse que ces cellules sont probablement majoritairement des macrophages, mais ne pouvons exclure qu'une partie de la population IBA-1⁺ soit constituée de DCs ou de cellules de Langerhans.

Les DCs sont constituées de différentes sous-populations : les DCs plasmacytoïdes (pDCs) qui sécrètent des interférons de type I mais sont décrites comme pro-tumorales (88); DCs conventionnelles de type 1 (cDC1s), dont la fonction principale est la présentation croisée d'Ag aux lymphocytes T CD8⁺, et de type 2 (cDC2s) dont la fonction principale est la présentation d'Ag aux T CD4⁺, toutes deux décrites comme nécessaires à la réponse anti-tumorale et de bon pronostic (**Figure 4**) (89, 90).

Les MDSCs identifient une population très hétérogène dérivée des granulocytes et des monocytes, dont la fonctionnalité est fortement dépendante des signaux solubles présents dans l'environnement tumoral. Comme les macrophages, leur activité régulatrice est médiée par la production de NO et de cytokines immunosuppressives (76) (**Figure 4**). De par leur origine similaire, MDSCs et macrophages peuvent

présenter un phénotype proche, et, chez le chien, les MDSCs restent encore peu décrites indépendamment des macrophages. On notera que chez les chiennes atteintes de tumeurs mammaires, Mucha *et al* ont décrit une population de MDSCs apparentée aux granulocytes ($CD11b^+ Gr1^+ CD33^+$) circulantes sécrétant de grandes quantités de la cytokine régulatrice IL-28 (91), suggérant un rôle possible de cette population dans le monitoring immunitaire du développement tumoral.

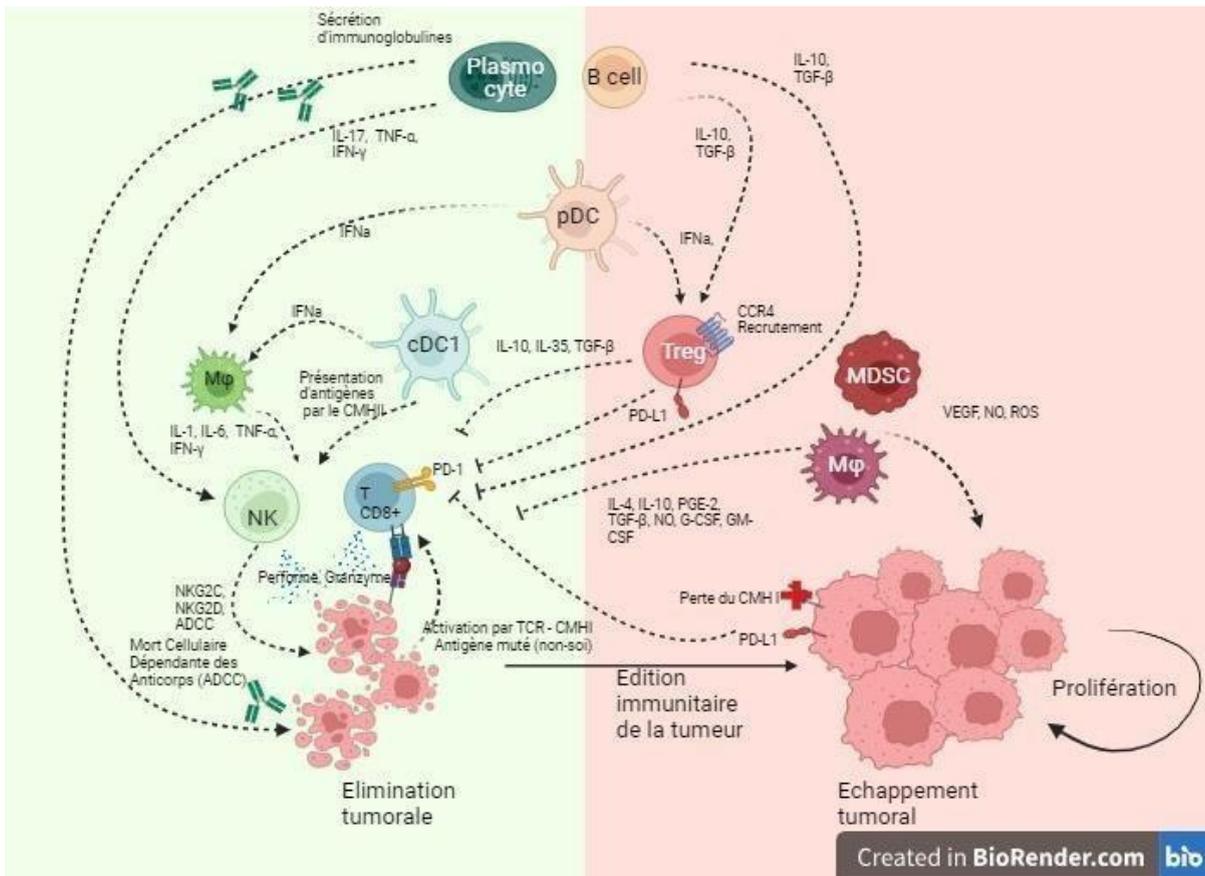


Figure 4 : Rôle des différentes populations immunitaires dans les réponses pro- et anti-tumorales. D'après Lei M. M. L. et al, 2021 (92)

L'immunité anti-tumorale est permise par les NK et les lymphocytes T CD8⁺ (sécrétion de molécules cytotoxiques, mort cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) produits par les plasmocytes, etc), activés par des cellules présentatrices d'antigènes (cDC1) et par des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF-α, IFN-γ, etc). Avec le développement tumoral, des mécanismes de recrutement d'échappement au système immunitaire se mettent en place (perte du CMH de type I par les cellules tumorales, accumulation de macrophages, MDSC et Tregs, etc). L'expression de PD-L1 par les Tregs et la sécrétion de cytokines régulatrices (IL-10, TGF-β) contribuent à un climat régulateur inhibant les T CD8⁺ et les NK.

Régulation par les cellules lymphoïdes dans le TME

Parmi les acteurs du maintien du climat régulateur dans le TME, les Tregs jouent un rôle central. Cette population de lymphocytes T CD4⁺ joue un rôle majeur dans les processus de cicatrisation et de tolérance dans de nombreux contextes physiologiques

(blessure, digestion, gestation, *etc*) en limitant l'activation des cellules effectrices de l'inflammation. Wu *et al* ont démontré la similarité du transcriptome des Tregs chez des donneurs sains canins et humains (93).

L'impact pronostic délétère des Tregs est depuis longtemps démontré dans le cancer du sein de la femme (corrélation avec le grade, l'invasivité, la densité en micro-vaisseaux, *etc* (69, 94)). Il est désormais connu que, comme chez la femme, les tumeurs mammaires sont plus infiltrées par les Tregs que le tissu mammaire sain chez la chienne, et qu'une forte infiltration par les Tregs est associée à un mauvais pronostic (fort index mitotique, nécrose, grade, emboles lymphatiques (95), invasion des ganglions lymphatiques drainant les tumeurs mammaires, *etc* (96)). L'importance de l'axe CCL17/CCL22/CCR4 dans le recrutement des Tregs dans le TME du cancer du sein est démontrée (75). Chez la chienne, CCR4 est surexprimé au niveau transcriptomique par les Tregs circulants (93) et au niveau protéique par les Tregs infiltrant les carcinomes canins, dont les CMT (97).

Chez la femme, non seulement la présence des Tregs mais aussi un phénotype fortement activé de ces Tregs sont associés à un mauvais pronostic. Les Tregs inhibent les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs (Teff) par divers mécanismes (**Figure 5**) (98). Leur forte expression du récepteur de haute affinité à l'IL-2 IL2R α /CD25 leur permet de consommer l'IL-2 présente dans le milieu, privant les Teff d'un facteur de survie et d'activation et induisant leur apoptose. Les Tregs produisent également divers signaux régulateurs (sécrétion d'IL-10 et de TGF- β , participation à la production d'adénosine extracellulaire par l'expression de l'ectonucléotidase CD39, *etc*) et limitent la transduction du signal du récepteur des lymphocytes T (TCR) par la séquestration des co-récepteurs CD80/CD86 par CTLA-4. La production d'IL-10, l'expression de CD25, l'expression de CTLA-4 ont été observés au niveau transcriptomique dans les Tregs canins (93). Par ailleurs, l'expression par les Tregs intratumoraux de CCR8, qui est impliqué dans la maturation et le recrutement (99), est associée à une forte activité suppressive et à un mauvais pronostic. CCR8 fait également partie d'une signature spécifique des Tregs activés chez le chien sain au niveau transcriptomique (93). Cependant, certains de ces mécanismes régulateurs n'ont pas encore été étudiés chez les Tregs canins au niveau protéique : l'expression de CD39, TIM-3 et CCR8 sur les Tregs canins reste à démontrer.

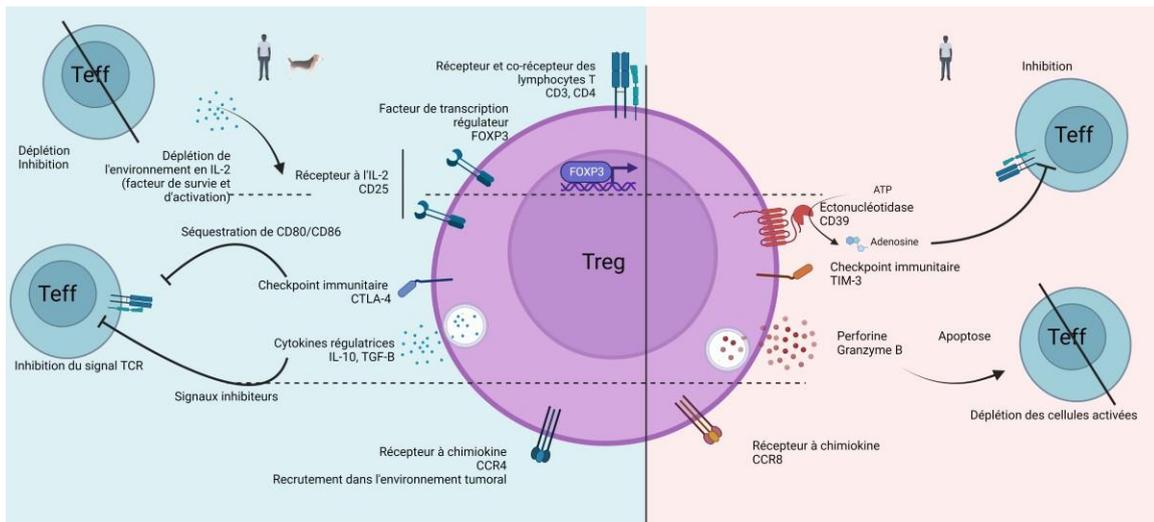


Figure 5 : Mécanismes effecteurs de la régulation des Teff par les Tregs. (93, 100)

Caractéristiques des Tregs communes chez le chien et chez l'humain : expression de CD3 et CD4, du facteur de transcription FOXP3 et du récepteur à l'IL-2 CD25. Mécanismes effecteurs partagés par les Tregs canins et humains à gauche (fond bleu) : déplétion en IL-2 du milieu par surexpression de CD25, sécrétion de cytokines régulatrices (IL-10, TGF-β), surexpression de l'ICP CTLA-4, etc. Mécanismes uniquement étudiés chez l'humain à ce jour à droite (fond rouge) : enrichissement du milieu en adénosine par l'expression de CD39, sécrétion de molécules cytotoxiques (Perforine, Granzyme B), surexpression de l'ICP TIM-3. Expression de récepteurs à chimiokines CCR4 sur les Tregs du chien et de l'humain et CCR8 sur les Tregs humains. Source : ETERRADOSSI Julia, BioRender.

Le phénotype des Tregs infiltrant les CMT n'a pas encore été beaucoup étudié au niveau protéique. On peut penser qu'il est similaire au phénotype des Tregs fortement activés infiltrant les cancers du sein de la femme. Les Tregs étant des acteurs majeurs de la réponse immunitaire pro-tumorale, le développement d'immunothérapies canines ciblant cette population demande une meilleure connaissance du phénotype de ces cellules.

Chez la chienne présentant une CMT, les lymphocytes B semblent associés à un mauvais pronostic (associé au développement métastatique, **Tableau III**) (68). Par ailleurs, la positivité en immunoglobulines de type G (IgG) des CMT corrèle avec la malignité (sans que la production des IgG par les lymphocytes B infiltrant les CMT ait pu être démontrée) (101). Les mécanismes par lesquels les lymphocytes B auraient un effet pro-tumoral n'ont pas encore été étudiés dans les CMT.

Chez la femme, les lymphocytes B sont à l'inverse associés à un bon pronostic dans le cancer du sein (**Tableau III**) (102). Les lymphocytes B intra-tumoraux semblent avoir

des fonctions versatiles et très dépendantes de l'environnement, pouvant être à la fois anti-tumorales avec la production d'immunoglobulines (reconnaissant des antigènes tumoraux et permettant la réponse anti-tumorale médiée par ces immunoglobulines) et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IFN γ , IL-17, etc) et pro-tumorales avec la production de cytokines régulatrices (IL-10, TGF- β , **Figure 4**) (102). Une telle diversité fonctionnelle souligne l'importance de l'environnement tumoral. La validation de l'utilisation des CMT comme modèles des cancers du sein requerra une étude précise du TME et des fonctions des lymphocytes B dans les CMT.

Impact de l'organisation spatiale de l'infiltrat immunitaire

Chez la femme, l'organisation spatiale de l'infiltrat immunitaire influe également sur l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale. La présence de structures dites structures lymphoïdes tertiaires (TLS), caractérisées par la présence d'une zone enrichie en lymphocytes B (exprimant le marqueur de surface CD20) et d'une zone enrichie en lymphocytes T (exprimant le marqueur de surface CD3) bien définies, de cellules myéloïdes (exprimant DC-Lamp) et de veinules post capillaires (HEVs) est associée au pronostic dans de nombreux types tumoraux (103–105).

Si la présence de TLS a longtemps été considérée comme de pronostic favorable et comme un indicateur de la réponse anti-tumorale, un enrichissement de ces structures en Tregs a été observé dans des tumeurs de haut grade de la prostate (106). Cette variabilité du pronostic associé aux TLS peut être expliquée par la définition de différents stades de maturation des TLS. On distingue les structures immatures (agrégat simple de lymphocytes B et T), les TLS primaires (agrégat de lymphocytes B et T en zone distinctes, associés à des HEVs) et les TLS secondaires (agrégat de lymphocytes B et T en zones distinctes, associés à des HEVs, avec présence de plasmocytes et centre germinatif avec lymphocytes B en prolifération) (**Figure 6**) (107). Il semblerait que dans certains types tumoraux, le stade de maturation du TLS ait un impact sur le pronostic (108).

Dans le cancer du sein, Gobert *et al* ont démontré que l'infiltrat Treg n'a pas d'impact sur le pronostic lorsqu'il est présent dans le tissu tumoral alors que la présence de ces cellules dans des agrégats lymphoïdes qui pourraient représenter des TLS est associée à un phénotype fortement activé et un mauvais pronostic (75). **Ces données**

suggèrent que la nature de l'infiltrat immunitaire mais aussi son organisation spatiale et sa localisation dans la tumeur sont des facteurs pronostiques importants.

Curieusement, la caractérisation de TLS dans les tumeurs canines est extrêmement récente. Giambrone *et al* montrent que des structures péri-vasculaires enrichies en lymphocytes B et T, qui pourraient être des TLS, sont présentes à proximité des proliférations épithéliales dans cinquante cas de carcinome simple chez le chien (101). La caractérisation de différents stades de maturation des TLS et une démonstration formelle de la corrélation de la présence des TLS avec le grade, la malignité ou le pronostic n'ont pas encore été réalisées chez le chien.

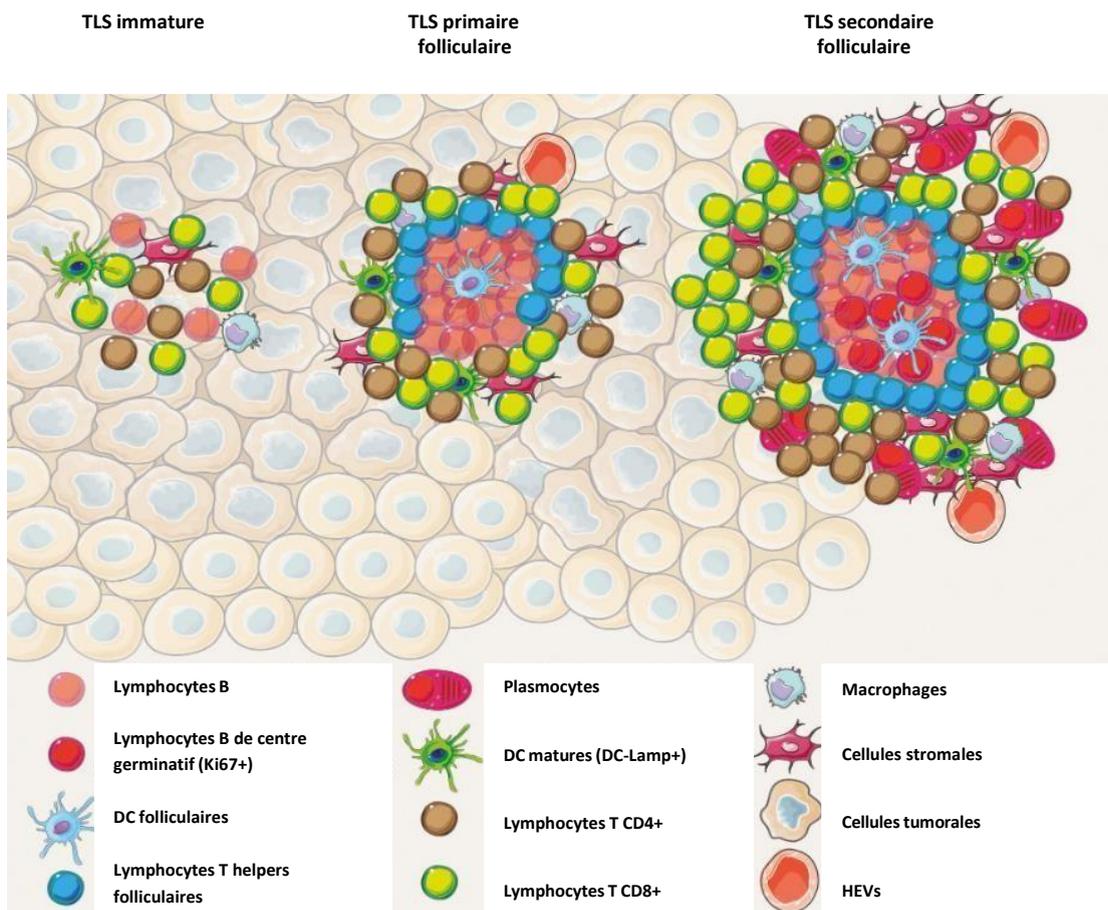


Figure 6 : Différents stades de maturation des TLS associés à des fonctions immunitaires distinctes. D'après Jacquelot N. et al, 2021

Les TLS évoluent de structures immatures désorganisées à des structures primaires organisées en follicules riches en lymphocytes B et T et en HEVs, puis en structures secondaires organisées en follicules riches en lymphocytes B et T avec un centre germinatif, en HEVs et en plasmocytes.

III. Classification histologique des tumeurs mammaires simples de la chienne

L'observation d'une coupe histologique colorée à l'hémalun-éosine d'une tumeur fixée au formol et incluse en paraffine (FFPE) permet sur la base de critères morphologiques et architecturaux de classer les tumeurs mammaires de la chienne (**Tableau III**) (109).

La classification de Goldschmidt (109) définit les sous-types histologiques selon l'origine des populations cellulaires qui se tumorisent (épithéliale ou myoépithéliale pour les carcinomes, mésenchymateuse pour les sarcomes), et analyse l'organisation spatiale des cellules tumorales (tubulaires, papillaire, en crible) (**Annexe I**). Chaque sous-type est associé à un pronostic : les carcinomes anaplastiques, les comédo-carcinomes, les carcino-sarcomes et les carcinomes adénosquameux sont tous associés à un mauvais pronostic (61). Ces sous-types n'ont pas été étudiés ici, mais leur étude (notamment en regard de l'infiltrat immunitaire) serait pertinente.

La transformation tumorale maligne simultanée de plusieurs populations cellulaires (épithéliale et mésenchymateuse) est relativement rare chez la chienne et conduit au développement de carcino-sarcomes. Cependant on observe parfois la présence d'une population tumorale épithéliale (bénigne ou maligne) et d'une population tumorale myoépithéliale bénigne. On parle alors de tumeurs complexes. Ce sous-type de tumeurs mammaires existe également chez la femme, chez laquelle il représente moins de 0,2% des tumeurs mammaires malignes et est associé à un phénotype agressif (110).

La classification de Goldschmidt permet aussi d'identifier un autre type histologique : les tumeurs mixtes, formées d'une composante épithéliale bénigne ou maligne et d'une composante myoépithéliale bénigne mais qui montrent des signes de dysplasie osseuse, cartilagineuse ou mésenchymateuse. Le pronostic associé à ce type tumoral est très variable (111), probablement en lien avec la composition variable en cellules malignes et avec la sensibilité de ce diagnostic très dépendante des anatomopathologistes. Ce sous-type n'a pas été inclus dans notre cohorte.

IV. Prise en charge thérapeutique des néoplasies mammaires de la chienne

1. Gold Standard – Exérèse complète de la chaîne mammaire

Les recommandations de prise en charge des tumeurs mammaires canines ont évolué ces dernières années. La nodulectomie n'est recommandée que dans le cas d'un unique nodule bénin, de petite taille (<0.5cm) (7).

Le caractère bénin ou malin n'étant déterminé qu'après l'analyse histologique du nodule, et certains nodules n'étant détectés qu'à la palpation directe de la chaîne mammaire post-résection, dans un souci de bien-être animal et d'économie de moyens, il est recommandé de ne procéder qu'à une chirurgie de mastectomie complète ou une hémi-mastectomie.

2. Chimiothérapies

Le traitement des CMT par chimiothérapie n'est pas systématique. Il est proposé, notamment dans le cas de tumeurs de haut grade ou métastatiques pour lesquelles le traitement gold standard seul est insuffisant.

Certaines chimiothérapies visent à limiter la prolifération des cellules tumorales, particulièrement celles basées sur une toxicité spécifique aux cellules en prolifération. On notera que si Campos *et al* n'ont pas observé d'influence de la chimiothérapie simple (carboplatine) sur la survie, une association de la chimiothérapie à des traitements adjuvants (thalidomide, dose métronomique de cyclophosphamide) augmente la durée de survie (112).

Une autre approche vise à lever autant que possible l'environnement tumoral régulateur. L'administration d'un inhibiteur de la Cox-2 tel que le firocoxib, qui limite la production des prostaglandines, permet d'augmenter la survie des chiennes atteintes de CMT de haut grade (113).

3. Perspectives de traitements disponibles ou envisagées en médecine humaine

Considérant l'absence de traitements spécifiques aux CMT de haut grade chez la chienne et leur faible survie, même après administration du traitement gold-standard, le développement de nouveaux traitements pour ces affections, sur la base de traitements envisagés en médecine humaine par exemple, paraît une question d'importance.

Selon le stade tumoral, des traitements inhibiteurs des récepteurs hormonaux (anti-HER2, Trastuzumab) ou d'inhibiteurs d'ICP (ICPb) (anti-PD-1, Pembrolizumab) sont parfois prescrits pour une thérapie adjuvante ou néo-adjuvante, notamment chez les femmes atteintes de cancers de stade 2 ou plus. (114, 115) Ces ICPb lèvent l'inhibition des cellules immunitaires effectrices en bloquant les signaux régulateurs transmis par les récepteurs PD-1 et CTLA4 sur les lymphocytes T activés.

L'argument du coût élevé de ces traitements est souvent avancé comme facteur limitant leur applicabilité en médecine vétérinaire : en médecine humaine, le coût d'un an de traitement par ICPb est d'environ 1 000 euros par an/kg (116). Rapporté au poids d'un animal, un traitement par ICPb pourrait donc être envisagé pour un prix similaire à la chimiothérapie (qui revient à quelques centaines d'euros par cure en incluant les frais d'hospitalisation) pour les chiens de petit gabarit. Si l'on prend en compte le fait que la monothérapie par anti-PD-1 implique une administration toutes les 3 semaines, pendant 2 ans, le coût associé semble important mais envisageable. On peut aussi s'intéresser aux immunothérapies sous des modalités néo-adjuvantes (dans une période restreinte précédant de la chirurgie). Par exemple l'administration de pembrolizumab en quatre cycles dans la période précédant la chirurgie plus neuf cycles après la chirurgie suffit pour améliorer significativement la survie sans progression de patientes présentant des TNBC de stade II ou III (117). De telles modalités de traitement pourraient présenter d'importants bénéfices pour les chiennes présentant des CMT de haut grade. Bien sûr, le principal obstacle au traitement néo-adjuvant est qu'en médecine vétérinaire, le diagnostic est actuellement réalisé sur pièce d'exérèse, après la chirurgie curative. Considérant tout ceci, une immunothérapie pourrait sans doute au moins présenter un intérêt pour le traitement post-opératoire des CMT de haut grade.

L'expression de PD-L1 par les cellules de CMT (118) et la surexpression de CTLA-4 et PD-1 par les lymphocytes T circulants de chiens atteints de cancer (119, 120) suggèrent que l'immunothérapie par anti-PD-1 pourrait présenter un bénéfice clinique pour les chiennes présentant des CMT de haut grade. En effet, l'administration d'anti-PD1 caninisé (toutes les huit semaines, jusqu'à 12 cycles) à des chiens présentant des mélanomes oraux de stade IV ou d'autres carcinomes a significativement augmenté la survie des animaux traités et maintenu une réponse complète sur plus d'une année (121, 122).

Un autre outil disponible est l'anticorps anti-CCR4 (mogamulizumab, approuvé pour le traitement de lymphomes T) qui permet la déplétion des cellules exprimant CCR4. Il pourrait notamment présenter un intérêt chez des patients atteints de tumeurs solides (étude clinique de phase I/II NCT02281409 en cours), et possiblement chez le chien. Comme mentionné précédemment, les Tregs infiltrant les CMT et autres carcinomes du chien surexpriment CCR4. Le blocage du recrutement des Tregs dans les CMT par administration d'anti-CCR4 déplétant est donc une piste thérapeutique envisageable, qui permet d'augmenter significativement la survie de chiens présentant des tumeurs de la vessie (123) ou de la prostate (100). Les études précédemment réalisées ne permettent pas de quantifier le niveau d'expression de CCR4 sur les Tregs et les autres populations cellulaires dans les CMT, ce qui apporterait des informations sur l'efficacité potentielle et la spécificité d'une thérapie inhibitrice de l'axe CCR4 et la probabilité d'effets secondaires dus à une toxicité sur les autres populations cellulaires exprimant CCR4 (la déplétion en lymphocytes T cutanés et en Tregs circulants (93) pourrait générer des troubles auto-immuns et cutanés).

V. Pertinence des tumeurs mammaires spontanées de la chienne pour la modélisation du cancer du sein humain

1. Dissimilarités entre tumeurs mammaires murines et humaines

Les tumeurs mammaires spontanées ou induites de la souris sont fréquemment utilisées pour modéliser le développement des tumeurs mammaires humaines, car elles présentent de nombreux avantages expérimentaux. Outre les considérations purement matérielles (faible coût, homogénéité des résultats, praticité, manipulabilité, tumeurs se développant rapidement), le modèle murin apporte la possibilité d'inactivation d'un gène dans l'organisme entier (lignée murine knock-out) ou restreinte à une population cellulaire en particulier (lignée cellulaire knock-out par le système de recombinaison Cre-Lox).

Le modèle d'implantation orthotopique (qui étudie le développement de tumeurs humaines dans l'organisme murin dont le système immunitaire est humanisé) présente de très nombreux inconvénients, dont le principal est que le système immunitaire étudié n'est pas physiologique ni adapté à l'organisme.

Le modèle de tumeurs mammaires murines spontanées (comme le modèle PYMT) présente lui aussi des différences importantes avec le cancer du sein de la femme : l'induction directe de tumeurs mammaires empêche par exemple la modélisation des facteurs de risques, limite la possibilité de modéliser les interactions au long-terme du système immunitaire avec la tumeur. Un nombre important d'études récentes évaluent la pertinence de différentes options thérapeutiques pour le traitement des types de cancers du sein de mauvais pronostic (TNBC notamment). Or la pertinence du modèle murin sur ce point peut être remise en question, toujours dans l'optique de la modélisation de la réponse à long terme.

De nouveaux modèles murins, plus proches du processus de tumorigénèse du cancer du sein de la femme, sont en développement pour pouvoir étudier la progression du développement tumoral. Cependant, ces modèles restent limités du point de vue des facteurs de risques, des expositions environnementales, des prédispositions génétiques, du rôle du microbiote notamment.

2. Similarités entre tumeurs mammaires canines et humaines

Certains types de tumeurs mammaires canines semblent de bons candidats pour modéliser les cancers du sein de la femme, notamment les adénocarcinomes simples.

On rappellera que l'incidence, l'âge « physiologique » d'occurrence, le pronostic des tumeurs mammaires sont similaires chez la chienne et la femme (55), de même que nombre de facteurs de risques et facteurs pronostiques, tels que l'imprégnation hormonale physiologique et exogène, l'âge, le surpoids, qui sont corrélés à un risque plus important de tumeurs mammaires et/ou à un mauvais pronostic chez la chienne et la femme (**Tableau III**).

Le modèle canin est également histologiquement très proche du cancer du sein. Certains sous-types histologiques sont similaires chez la femme et la chienne, et peuvent être classifiés selon l'expression ou non des récepteurs hormonaux ER, PR et HER-2, qui sont similairement associés au pronostic (**Tableau III**).

Comme discuté plus haut, l'interaction du système immunitaire avec les tumeurs mammaires canines et humaines semble similaire, à l'exception du rôle contrasté des lymphocytes B. (**Tableau III**).

Enfin, les chiens vivant au quotidien dans le même environnement que les propriétaires sont notamment exposés aux mêmes facteurs de risques environnementaux et partagent une partie de leur microbiote intestinal.

Toutes ces similarités, associées au développement plus rapide des tumeurs canines et à l'absence des biais liés aux conditions d'élevage en animalerie, sont autant d'arguments pour l'utilisation des CMT comme modèle du cancer du sein.

3. Particularités canines pouvant limiter la pertinence du modèle canin

Il existe pourtant quelques différences majeures entre les tumeurs mammaires de ces deux espèces.

Chez les chiennes non stérilisées comme chez la femme, chaque phase de dioestrus est associée à une hypertrophie des glandes mammaires. Le cycle reproductif de la chienne est sensiblement plus long que celui de la femme, et l'espérance de vie de la chienne plus courte : le nombre de cycles reproductifs d'une chienne est inférieur à celui d'une femme. Le développement du tissu mammaire et la tumorigénèse étant liés à l'imprégnation hormonale, il s'agit d'une distinction majeure entre chienne et femme. Cette différence est encore augmentée par la stérilisation des chiennes de plus en plus fréquente en médecine vétérinaire. Les études récentes prennent en compte cette limite, mais les études plus anciennes (antérieures aux années 2000 par exemple) pourraient présenter un biais. La pertinence des CMT comme modèle de recherche translationnelle devra sur ce point être examinée.

Une autre particularité canine est le développement fréquent de tumeurs mixtes. Les cohortes d'études translationnelles sont généralement composées de chiennes atteintes de tumeurs simples pour une meilleure similarité aux tumeurs humaines, ce qui évite le biais. Cependant, dans le cas où une thérapie de médecine humaine serait appliquée à des chiennes atteintes de CMT, une attention particulière devrait être apportée à la réponse des chiennes atteintes de tumeurs mixtes.

La validation des CMT comme modèle d'étude des tumeurs humaines nécessite une étude plus approfondie de l'infiltrat immunitaire (similarités des mécanismes effecteurs, existence des mêmes sous-populations) et notamment de l'organisation spatiale de cet infiltrat, sur laquelle très peu de données sont actuellement disponibles. C'est l'objectif de notre projet de recherche.

Par ailleurs, les outils disponibles en recherche biomédicale humaine et recherche vétérinaire sont encore très différents. Le marquage d'IHC en recherche vétérinaire est généralement automatisé puis son analyse réalisée par l'anatomopathologiste visuellement, avec la sélection de 10 champs de grossissement x40 représentatifs de l'ensemble de la lame. Cette sélection est faite par l'anatomopathologiste, donc rarement en double aveugle, et représente un biais non négligeable : la représentativité est une notion subjective et problématique en cas d'hétérogénéité de

la lame. Il est en effet démontré que la sélection de zones d'intérêt et l'identification de figures mitotiques peut varier selon l'observateur·trice, et qu'une assistance par un algorithme de prédiction automatisé peut réduire les erreurs et la variabilité sur ces deux points (124, 125). En recherche de médecine humaine, les études récentes centrées sur des marquages IHC et de multi-immunofluorescence (mIF) sont basées sur une analyse semi-automatique des lames, parfois basée sur des modules d'intelligence artificielle. Pour aller plus loin dans les perspectives de cette modélisation, on notera que l'analyse des tumeurs humaines et murines dans les projets de recherche les plus récents se base sur une détection automatique des noyaux cellulaires et des phénotypes de chaque cellule (sur la base de la présence de marquage positif dans une zone environnant le noyau, par exemple), avec une identification des zones épithéliales et stromales. Ces procédés sont très en avance sur les techniques actuellement validées et utilisées en recherche vétérinaire.

Une revue rapide de la littérature montre que les outils d'analyse automatisée de marquages IHC chez le chien incluent généralement une analyse pixel par pixel ou de surface pour les plus anciens (126, 127) ou une identification du phénotype cellule par cellule (128, 129) d'après un procédé dont les modalités pratiques ne sont pas toujours décrites et donc parfois difficilement reproductibles pour les plus récents (130). A notre connaissance, aucune étude basée sur une analyse automatisée n'a à ce jour été réalisée sur marquages IHC de CMT, ne permettant pas d'évaluer la pertinence de ces méthodes d'analyses en tenant compte des spécificités des CMT. L'évaluation de la pertinence du modèle canin nécessitera probablement la validation chez le chien des outils les plus fréquemment utilisés à l'heure actuelle pour l'étude des tumeurs mammaires humaines.

En conclusion, il est généralement accepté que les CMT seraient un bon modèle de recherche translationnelle des tumeurs mammaires humaines. La partie expérimentale de cette thèse vise à mieux caractériser le phénotype et la topographie de l'infiltrat immunitaire dans les CMT, notamment par l'utilisation de concepts et d'outils validés dans la recherche en médecine humaine. Le but est d'évaluer la pertinence des CMT comme modèle translationnel et la possibilité de transposer des thérapies utilisées en médecine humaine en médecine vétérinaire, avec une attention particulière sur l'impact du développement de tumeurs multifocales.

PARTIE 2

CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX DES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES INFILTRANT LES TUMEURS MAMMAIRES CANINES

L'objectif est de mieux caractériser l'infiltrat immunitaire et notamment l'infiltrat lymphocytaire chez les chiennes atteintes de tumeurs mammaires, pour le comparer à l'infiltrat des tumeurs mammaires humaines.

Malheureusement, les outils immunologiques disponibles pour étudier spécifiquement l'infiltrat lymphocytaire canin sont encore peu nombreux. La première partie de ce travail de thèse a donc consisté à évaluer sur des cellules lymphoïdes de chien provenant de sang circulant, de tissus ganglionnaires lymphatiques et de tissus mammaires sain ou néoplasique soumis à une dilacération mécanique puis à une digestion enzymatique, la réactivité et la spécificité d'anticorps habituellement utilisés chez l'homme en recherche biomédicale.

I. Matériels et méthodes

1. Échantillons biologiques

L'utilisation pour ce projet de ganglions lymphatiques drainants (NLd) et de tissu mammaire sain et tumoral de chiennes présentant un ou des nodules mammaires issus d'une prise en charge par hémi-mastectomie ou mastectomie complète a été approuvée par le comité d'éthique en expérimentation animale de VetagroSup. Après obtention du consentement éclairé des propriétaires, les chiennes présentant au moins une tumeur mammaire et traitées par hémi- mastectomie ou mastectomie complète au service de reproduction de VetagroSup ou dans une clinique partenaire ont été incluses dans la cohorte prospective.

Après résection, les chaînes mammaires ont été conservées dans du milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) - glutamax complémenté de 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF, Eurobio), et des antibiotiques : pénicilline (100 UI/mL) et streptomycine (100 UI/mL) (Eurobio)) (RPMIc). Les échantillons de tissu sain, de NLD et de tumeur ont été prélevés par le Pr T. Marchal (VetAgroSup). Six animaux ont été inclus dans l'étude.

Le prélèvement de 15mL de sang de chiens sains de race Beagle de l'Institut Claude Bourgelat, dans le respect des règles de bien-être animal, pour la validation de nouveaux réactifs destinés à la recherche par le laboratoire d'Anatomopathologie de VetAgroSup a été approuvée par le comité d'éthique en expérimentation animale de VetAgroSup. Cinq animaux ont été utilisés : deux pour la phase de mise au point et trois pour l'analyse.

L'étude prospective inclut des chiennes de races Léonberg, Rhodesian Ridgeback, Terrier et croisées (**Tableau IV**).

2. Digestion enzymatique des tissus et obtention de suspensions cellulaires de CMT

Les échantillons de NLD, de tissu mammaire sain et de tumeurs des six chiens ont été dilacérés en fragments de 1mm puis incubés 45 minutes à 37°C dans du RPMI contenant des enzymes (DNAse I (0.25 U/mL) et Collagénase IV (4.5 mg/mL) (Sigma-Aldrich)). La suspension obtenue a été filtrée sur filtres de 100µm (Corning) et rincée avec 20mL de RPMIc. Après centrifugation de cinq minutes à 1200rpm à RT, le culot a été re-suspendu dans du SVF contenant 10% de DMSO puis congelé à -80°C.

3. Isolement des lymphocytes circulants

15mL de sang de cinq chiens sains ont été immédiatement dilués au demi dans du PBS, déposé sur 20mL de milieu de séparation de lymphocytes (Eurobio) et centrifugé 30 minutes à 1800rpm à température ambiante (RT). Les cellules mononucléées de sang périphérique (PBMCs) récoltées à l'interface ont été lavées avec 50mL de PBS.

Tableau IV : Diagnostics histologiques et caractéristiques biologiques des cas inclus dans la cohorte prospective.

Caractéristiques biologiques		Nombre de cas inclus dans la cohorte
Diagnostic histologique		
	Adénocarcinome simple	n=3
	Carcinome simple	n=1
	Adénome simple	n=2
Grade		
	NA	n=2
	Grade I	n=3
	Grade II	n=1
	Grade III	n=0
Observation d'embolies lymphatiques		
	Oui	n=0
	Non	n=6
Présence de métastases macroscopiques		
	Oui	n=0
	Non	n=6
Age moyen en années (\pm SD)		8,8 \pm 3,1
Race		
	Leonberg	n=1
	Rhodesian Ridgeback	n=1
	Jack Russell Terrier	n=2
	Yorkshire Terrier	n=1
	Croisé	n=1
Statut reproducteur		
	Chienne entière	n=5
	Chienne stérilisée	n=1
	ND	n=0

Certaines caractéristiques sont non applicables à certaines cohortes (NA) ou indéterminées (ND).

4. Activation lymphocytaire

Les PBMCs ont été mises en culture dans du RPMIc à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules/mL dans des plaques 96 puits à fond rond, puis pour la moitié des puits de la concanavaline A (ConA, 5 μ g/mL, Sigma-Aldrich) a été rajoutée pour provoquer une activation lymphocytaire alors que pour l'autre moitié (contrôle) rien n'a été rajouté. 16h après le début de l'incubation les cellules ont été récoltées et analysées après immunomarquage en cytométrie en flux.

5. Marquages en cytométrie en flux (FC)

➤ Marquages des PBMCs

Chez la femme, l'infiltration du cancer du sein par des lymphocytes Tregs et l'augmentation dans l'infiltrat du ratio Tregs /lymphocytes T CD8⁺ sont deux facteurs de mauvais pronostic (75, 131). De plus, le phénotype de ces cellules est également associé au pronostic : des Tregs fortement suppresseurs, prolifératifs, exprimant plus fortement les marqueurs d'activation CTLA-4 et CD25 et le récepteur CCR8 sont de mauvais pronostic dans le cancer du sein de la femme (132) et la présence de lymphocytes T CD8⁺ épuisés (co-exprimant PD-1 et CTLA-4) est un indicateur pronostique de réponse positive à l'immunothérapie (133). Pour évaluer le phénotype des lymphocytes T infiltrant les CMT, seconde partie de notre travail expérimental, et vérifier s'il est similaire à celui des lymphocytes T infiltrant les cancers du sein, nous avons d'abord évalué, sur des PBMC de chiens sains activés (n=2) ou non (n=3) la spécificité de sept Ac reconnaissant des marqueurs d'activation de lymphocytes T, marqueurs exprimés à la fois par les lymphocytes effecteurs et régulateurs (l'ectonucléotidase CD39, les récepteurs co-stimulateurs OX-40, 4-1BB, GITR, les ICP CTLA-4 et TIGIT et le récepteur à chimiokines CCR4 ou des marqueurs d'activation plus spécifiques des Tregs (récepteur à chimiokine CCR8), fortement exprimés par les Tregs les tumeurs mammaires de la femme, et exprimés spécifiquement, au moins au niveau transcriptomique par les Tregs canins (**Tableau V**) (93).

Les quatre autres Ac utilisés (anti-CD3, CD4, CD25 et CD194) sont déjà vuidés chez le chien et utilisables en cytométrie de flux (**Tableau V**). L'Ac anti-CCR4 nous a servi de contrôle (123), les Ac anti-CD3 et anti-CD4 nous ont permis d'identifier la population T CD3⁺ CD4⁺, incluant la sous-population Treg d'intérêt (comme définis par la stratégie de gating présentée **Figure 7A**). L'Ac anti-CD25 nous a permis de vérifier la surexpression de CD25 par les PBMC activés par la ConA (**Figure 7B**), et donc de confirmer l'efficacité de l'activation.

Les PBMCs récoltées ont été lavées en PBS 1X et incubées 15min à 4°C en Zombie Yellow Fixable Viability Kit (BioLegend, 423103, 1/500 en PBS 1X) pour évaluer la viabilité cellulaire, puis incubées 30min à 4°C avec des Ac anti-**CD3**-FITC (BioRad, CA17.2A12, 1:25), anti-**CD4**-PE-Cy7 (eBiosciences, YKIX302.9, 1:20), anti-**CD25**-eFluor660 (eBiosciences, P4A10, 1:20), anti-**hCD39**-PerCP-eF710 (eBiosciences,

A1, 1:25), anti-**hCD134**-APC-Vio770 (Miltenyi, REA621, 1:50), anti-**CTLA-4**-PE (BD, BNI3, 1:20), anti-**hTIGIT**-PerCP-Cy5.5(BD, A15153G, 1:20), anti-**hCD137**-BV421 (BioLegend, 4B4-1, 1:50) et anti-**GITR**-PE (RnD, 100416, 1:10) puis incubées 20min à 37°C avec les Ac anti-**hCCR8**-BB700 (BD,433H, 1:40), et anti-**hCCR4**-PE (BD, 1G1, 1:10) et enfin fixées en formaldéhyde 4% (SigmaAldrich) (**Tableau V**).

Tableau V : Anticorps évalués par cytométrie en flux sur PBMCs canins.

Anticorps	Antigène reconnu	Autres noms de l'antigène	Population exprimant l'antigène chez l'homme
Anti-CD3 FITC	CD3	-	Lymphocytes T
Anti-CD4 PE-Cy7	CD4	-	Lymphocytes T CD4 ⁺
Anti-CD25 eFluor660	CD25	IL2RA	Tregs, Lymphocytes T activés
Anti-CD39 PerCP-eF710	CD39	Ecto-ATPase 1	Tregs, Lymphocytes T
Anti-CD134 APC-Vio770	CD134	OX-40	Lymphocytes T activés, Lymphocytes B, DCs, éosinophiles.
Anti-CTLA-4 PE	CD152	CTLA-4	Tregs, Lymphocytes T activés
Anti-TIGIT PerCP-Cy5.5	-	TIGIT	Tregs, Lymphocytes T activés, NK
Anti-CD137 BV421	CD137	4-1BB	Lymphocytes T activés, NK
Anti-GITR PE	CD357	GITR	Tregs, Lymphocytes T activés
Anti-CCR8 BB700	CD198	CCR8	Tregs intratumoraux, Lymphocytes T cutanés Lymphocytes T helpers de type 2 (Th2),
Anti-CCR4 PE	CD194	CCR4	Tregs circulants, Lymphocytes T cutanés Lymphocytes Th2,

➤ Marquage des suspensions cellulaires de CMT

Il serait intéressant pour la médecine vétérinaire de pouvoir transposer des thérapies utilisées ou envisagées en médecine, plus particulièrement les thérapies inhibitrices des axes CCL17/CCL22/CCR4 et PD-1/PD-L1, désormais indiquées chez l'homme pour le traitement de certains cancers du sein très agressifs, au traitement de CMT

de haut grade, et d'évaluer l'applicabilité chez le chien de nombreuses autres immunothérapies actuellement à l'étude chez l'homme, en particulier celles ciblant les récepteurs CTLA-4, TIM-3 ou TIGIT. L'éventuelle indication de ces thérapies pour le chien dépendra entre autres du niveau d'expression de ces molécules sur l'infiltrat lymphocytaire des CMT.

Prenant en compte la faible disponibilité d'outils validés chez le chien, nous avons pu étudier trois récepteurs à la surface de lymphocytes T infiltrant les CMT : CCR4, PD-1 et TIM-3, grâce à des réactifs validés chez le chien et utilisables en cytométrie en flux (123, 134-136).

Ces trois protéines sont surexprimées par les Tregs infiltrant les cancers du sein et leur présence n'a pas encore été étudiée à la surface des lymphocytes T infiltrant les CMT. Par ailleurs, ces trois marqueurs représentent des pistes thérapeutiques non explorées chez le chien.

Dans cette partie de notre travail, nous avons dans un premier temps étudié sur les suspensions cellulaires de nos trois tissus d'intérêt les effectifs relatifs des sous-populations lymphocytaires T suivantes : T CD4⁺ (CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD8^{neg}), Tregs (CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD8^{neg} FOXP3⁺), Teff (CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD8^{neg} FOXP3^{neg}) et T CD8⁺ (CD45⁺ CD3⁺ CD4^{neg} CD8⁺) ainsi que le ratio des FOXP3⁺/CD8⁺ parmi nos trois tissus d'intérêt. Dans un second temps, nous nous sommes attachés à évaluer l'expression des marqueurs PD-1, TIM3 et CCR4 sur ces populations.

Les suspensions cellulaires de CMT, LNd, et tissu mammaire, ont été décongelés en RPMIc préalablement chauffé, lavés en RPMIc puis en PBS, incubés 15 min à 4°C avec du Zombie NIR Fixable Viability Kit (BioLegend, 423106, 1/4000 dilué en PBS 1X), incubés avec les Ac anti-**CD45**-AF700 (Novus, YKIX716.13, 1/50), anti-**CD4**-SB436 (eBiosciences, clone YKIX302.9, 1/25), anti-**CD3**-FITC (BioRad, CA17.2A12, 1/25), anti-**CD8**-SB600 (eBiosciences, clone YCATE55.9 1/25), anti-**CD25**-PE-Cy7 (eBiosciences, clone P4A10, 1/25), anti-**TIM3** (ab47997, Abcam, goat polyclonal antibody, 1/25), anti-**PD-1**-AF647 (Novus, clone 4F12, 1/25), incubés 25 min à 37°C avec l'Ac anti-**CCR4**-BV786 (BD, 1G1, 1:25) dilués en PBS 1X contenant 2 mmol/L d'EDTA et 2% de SVF, fixés 20min en solution de fixation/perméabilisation (Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set, Invitrogen) et incubés 35 min à 4°C avec l'Ac anti-**FOXP3**-PerCP-eF710 (eBiosciences, clone FJK16S, 1/25) dilué en tampon de perméabilisation (Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set, Invitrogen) (**Tableau VI**). L'Ac anti-TIM3 non couplé a été manuellement couplé au fluorochrome

CF538 en utilisant le kit Biotium Mix-n-stain labeling kit (Biotium) avant son évaluation dans le panel.

Les données ont été acquises sur le cytomètre en flux Fortessa-LSRII (BD) et analysées sur le logiciel FlowJo V10.9 (Tree Star).

Tableau VI : Anticorps évalués par cytométrie en flux sur suspensions cellulaires de CMT, LNd et tissu sain.

Anticorps	Antigène reconnu	Autres noms de l'antigène	Population exprimant l'antigène chez l'homme
Anti-CD45 AF700	CD45	-	Cellules immunes
Anti-CD3 FITC	CD3	-	Lymphocytes T
Anti-CD4 PE-Cy7	CD4	-	Lymphocytes T CD4 ⁺
Anti-CD8 SB600	CD8	-	Lymphocytes T CD8 ⁺
Anti-CD25 PE-Cy7	CD25	IL2RA	Tregs, Lymphocytes T activés
Anti- FOXP3 PerCP- eF710	FOXP3	-	Tregs
Anti-TIM3	CD366	TIM3	Lymphocytes T activés,
Anti-PD1 AF647	CD279	PD1	Lymphocytes T activés
Anti-CCR4 BV786	CD194	CCR4	Tregs circulants, Lymphocytes T cutanés Lymphocytes Th2,

6. Analyse statistique

Les résultats ont été analysés par un test non paramétrique de rangs Wilcoxon païré (comparaisons intra-individuelles) ou un test de Kruskal-Wallis non païré avec correction pour comparaisons multiples (comparaison inter-individuelle) sur GraphPad Prism (V7).

La taille réduite des cohortes limite la significativité des résultats, bien que les outils statistiques adaptés aient été utilisés.

II. Résultats

1. Screening sur PBMCs de chiens sains d'un panel d'Ac validés chez l'homme

L'activation des PBMC par la culture pendant 16h en présence de ConA induit une augmentation d'environ 40% de la proportion de T CD4⁺ CD25^{high}. Ceci nous permet de confirmer que l'activation a fonctionné (**Figure 7B**).

Deux anticorps parmi les sept nouveaux anticorps testés, les anti-CCR8 anti-TIGIT, nous ont donné un signal positif à la surface des lymphocytes canins, alors qu'avec les cinq autres, les anti-CD39, anti-CD134, anti-CD137, anti-CD357 et anti-CD152, nous n'avons obtenu aucun signal en particulier sur notre population cible Treg (**Figure 8**).

Bien que le faible nombre d'échantillons analysés empêche de tirer des conclusions définitives sur la base d'une analyse statistique, on observe une augmentation de l'expression de CCR4 et CCR8 par les T CD4⁺ CD25^{high} après activation et une expression plus importante de TIGIT par les CD25^{high} par rapport au CD25^{low} avant et après activation (**Figure 7C**). On notera que l'augmentation de CCR4 et CCR8 est spécifique des lymphocytes CD3⁺ CD4⁺ CD25^{high}, ce qui est cohérent avec une population composée de lymphocytes T activés et de Tregs.

2. Identification et quantification par FC de l'infiltrat lymphocytaire des CMT

La proportion de Tregs (CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺) est assez faible et ne semble pas varier significativement entre le ganglion, le tissu sain et le tissu tumoral (**Figure 9A**).

Les T CD4⁺ et les Teff (CD4⁺ CD25^{low}) semblent enrichis de manière non significative dans le ganglion et le tissu tumoral par rapport au tissu sain (**Figure 9A**).

Les T CD8⁺ semblent enrichis de manière non significative dans le ganglion par rapport aux tissus sain et tumoral (**Figure 9A**).

On observe une tendance non significative à un plus fort ratio FOXP3⁺/CD8⁺ dans les tumeurs par rapport au tissu sain et au NLd (**Figure 9B**).

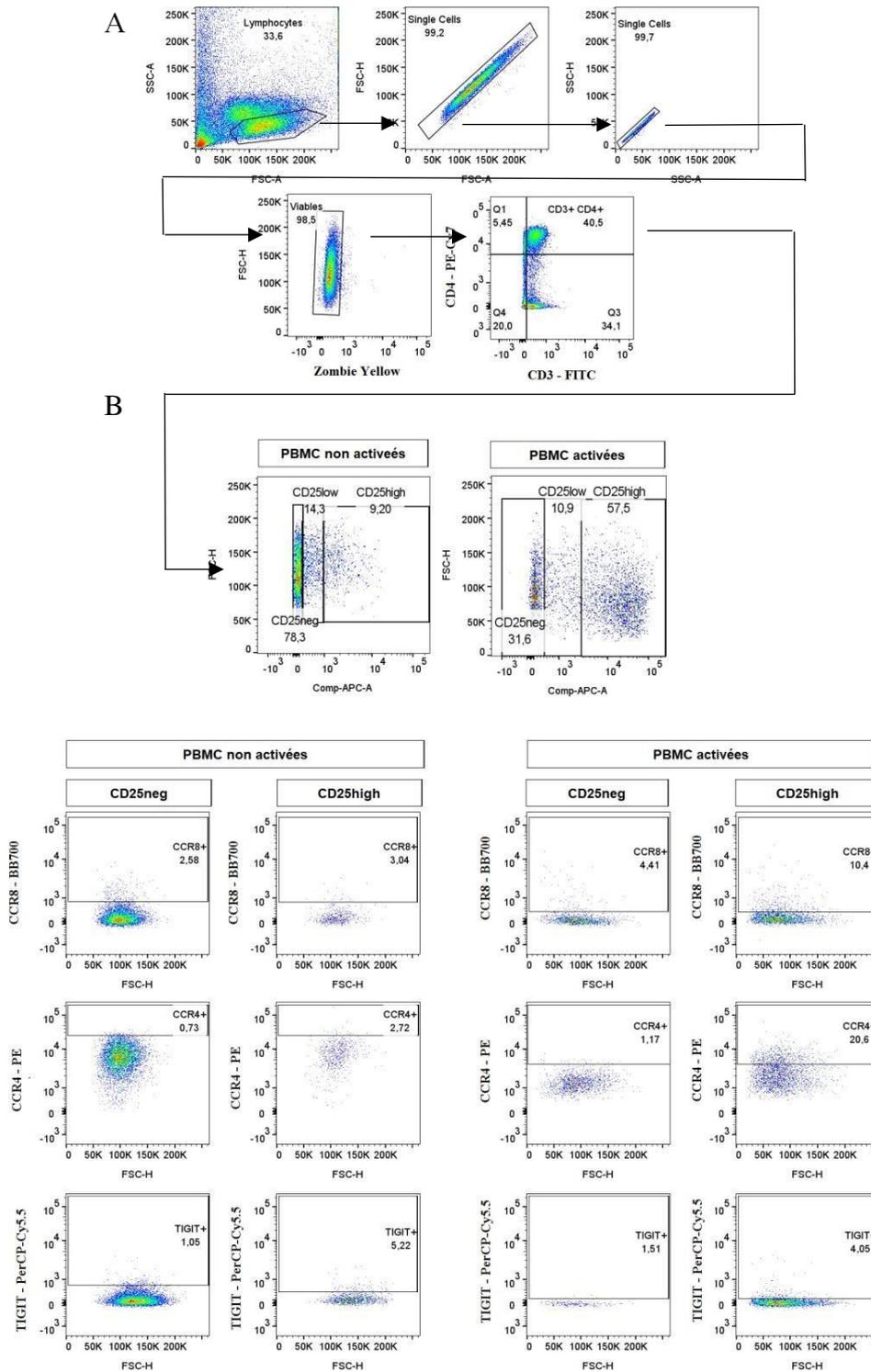


Figure 7 : Exemple représentatif d'un screening d'anticorps reconnaissant des marqueurs d'activation des lymphocytes T sur des PBMC des chiens sains activés ou non. Activation par culture 16h en RPMIc (témoin) ou RPMIc + ConA (activé, 5µg/mL). (A). L'expression des marqueurs d'activation est évaluée sur les lymphocytes T CD4⁺ (CD3⁺ CD4⁺) définis selon la stratégie de gating décrite. (B) L'activation induit une expression de CD25 par les lymphocytes T circulants canins. (C) Les anticorps anti-hCCR4, anti-hCCR8 et anti-hTIGIT reconnaissent un marqueur de surfaces surexprimé par les CD25^{high} après activation.

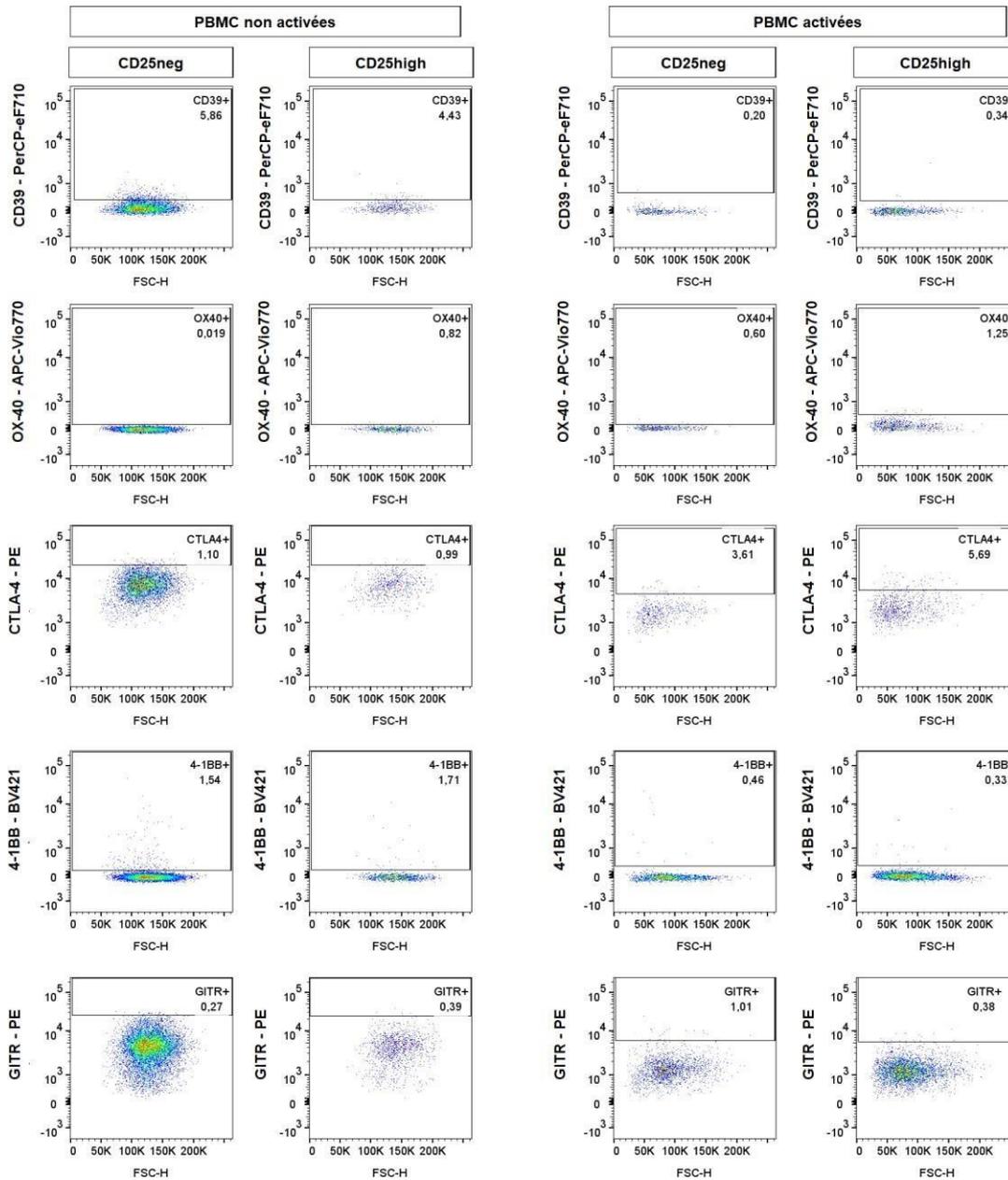


Figure 8 : Exemple représentatif du screening d'anticorps reconnaissant les marqueurs CD39, OX-40, CTLA-4, 4-1BB et GITR humains sur des lymphocytes T CD3⁺ CD4⁺ de chiens sains activés ou non. Activation par culture 16h en RPMIc (témoin) ou RPMIc + ConA (activé, 5µg/mL).

CCR4 semble surexprimé sur toutes les populations lymphocytaires du tissu tumoral, en comparaison aux tissus ganglionnaire et sain, mais cette surexpression n'est pas significative (**Figure 9C**).

TIM-3 est surexprimé par les lymphocytes T CD8⁺ des trois tissus étudiés en comparaison aux Teff et aux T CD4⁺. Il semble également fortement exprimé sur les Tregs du ganglion et du tissu sain mais pas sur ceux du tissu tumoral (**Figure 9D**).

PD-1 semble surexprimé par les lymphocytes T CD8⁺ des trois tissus (ganglion, tissu sain et tissu tumoral, **Figure 9E**).

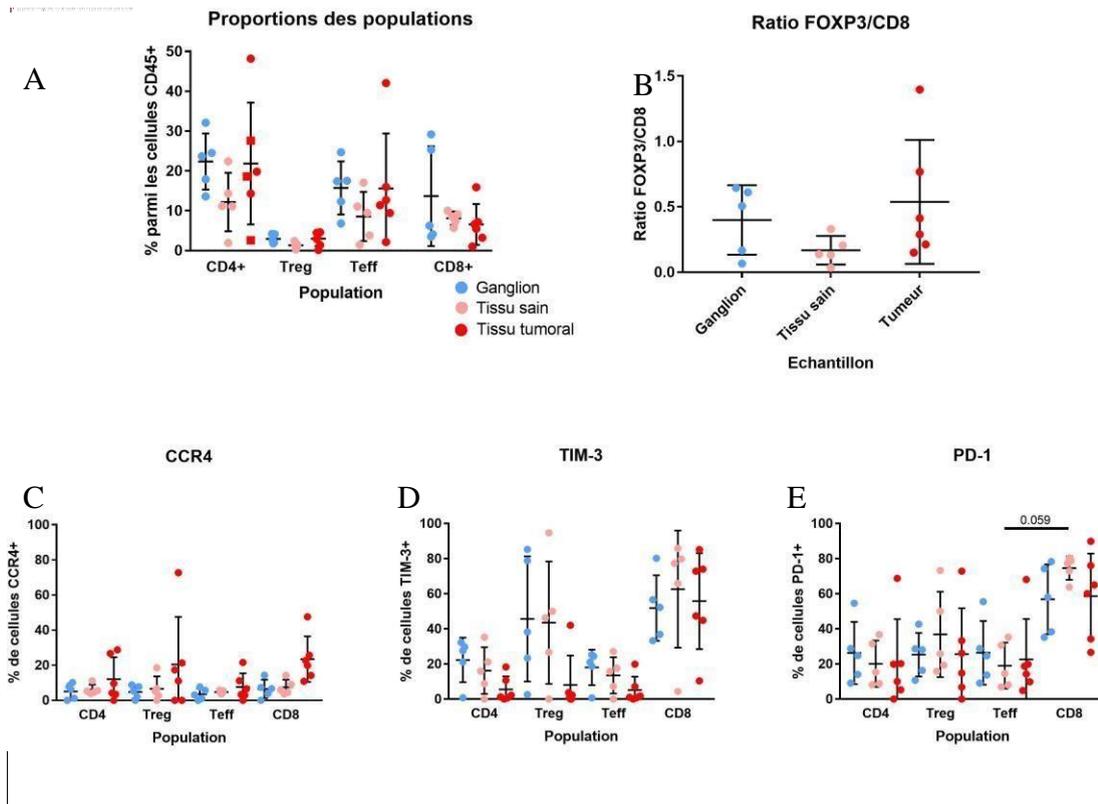


Figure 9 : CCR4, TIM-3 et PD-1 sont surexprimés par les lymphocytes T CD8⁺ dans les CMT. Proportions des différentes sous-populations lymphocytaires parmi l'infiltrat immunitaire CD45⁺ (A). Rapport des effectifs de Tregs et T CD8⁺ infiltrants (Tregs/CD8⁺, B). Expression parmi les populations lymphocytaires CD4⁺, Tregs (CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺), Teff (CD4⁺ CD25^{low}) et CD8⁺ de CCR4 (C), TIM3 (D) et PD1 (E).

III. Discussion

Ce projet de recherche avait pour objectif une première approche en vue d'une meilleure caractérisation de l'infiltrat immunitaire des tumeurs mammaires canines, pour permettre une évaluation de la pertinence des CMT comme modèle d'étude des cancers du sein de la femme et pour évaluer l'applicabilité des traitements novateurs utilisés en médecine humaine aux traitements des CMT.

La première partie de ce travail avait pour but d'évaluer sur du sang de chiens la réactivité et la spécificité d'anticorps habituellement utilisés chez l'homme en recherche biomédicale, afin de déterminer si ces outils pourraient être utilisés en médecine vétérinaire.

Ce screening nous a permis d'identifier deux candidats potentiels utilisables chez le chien, reconnaissant les récepteurs CCR8 et TIGIT. Nous avons également pu vérifier à cette occasion l'intérêt de l'Ac anti-CCR4 déjà utilisé chez le chien.

L'absence d'expression de CCR4 par les Tregs circulants non activés chez le chien est une différence majeure avec l'homme (75). Maeda et al ont démontré que CCR4 est surexprimé par les lymphocytes T CD4⁺ et plus spécifiquement par les Tregs circulants chez les chiens présentant des tumeurs (100, 123), et CCR4 est surexprimé par les Tregs circulants de chiens sains au niveau transcriptomique (93). On s'attendrait donc à une surexpression de CCR4 par les Tregs circulants non activés que nous n'observons pas ici. L'Ac utilisé a été validé par cytométrie de flux sur des Tregs circulants de chiens présentant des tumeurs : peut-être sa sensibilité au CCR4 canin est-elle moindre que sa sensibilité au CCR4 humain, ce qui pourrait nous empêcher de détecter une surexpression sur les Tregs de chiens sains. Un autre facteur explicatif est le fort signal observé dans le canal PE sans addition de l'anticorps : on constate que le signal PE est déjà d'une intensité d'environ 10^3 ou 10^4 dans le puits témoin (limite basse de la fenêtre de positivité beaucoup plus haute dans le canal PE que dans les autres canaux), ce qui peut être lié à une fuite d'un autre signal dans ce canal (le signal PE- Cy7, par exemple). Nous n'avons pas réussi à éliminer ce bruit de fond et n'avons donc pas pu étudier un éventuel signal PE de faible intensité.

On sait que CCR8 est actuellement un des marqueurs protéiques les plus spécifiques des Tregs intratumoraux (140), et de nombreux projets ont démontré chez la souris le bénéfice sur la survie globale de la déplétion des Tregs intratumoraux par le ciblage de CCR8. La spécificité de l'expression de CCR8 par les Tregs intratumoraux chez le chien a été démontrée au niveau transcriptomique par Wu *et al* (93). Nos résultats suggèrent que le clone 433H est le premier Ac testé en cytométrie de flux présentant une possible spécificité pour le CCR8 canin. Pour définitivement valider ces résultats, il sera nécessaire de tester l'Ac sur une lignée cellulaire transfectée avec le gène CCR8 canin. Cette validation représente une étape cruciale pour le développement d'une immunothérapie anti-CCR8 chez le chien, d'intérêt notamment pour les tumeurs de haut grade dont le traitement actuel n'est pas associé à un très bon pronostic.

Enfin, nous avons identifié sur les suspensions de PBMC un dernier Ac présentant une possible spécificité croisée chez le chien : l'anti-TIGIT. TIGIT est une protéine de surface exprimée par les lymphocytes T et NK, induisant un signal inhibiteur. Le ciblage de TIGIT en addition à d'autres immunothérapies dans un essai clinique de phase II a permis une survie sans progression et une survie globale plus longues chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules exprimant PD-L1. La caractérisation de l'expression de TIGIT par les lymphocytes T infiltrant les CMT sera nécessaire à l'évaluation de l'intérêt de traitements anti-TIGIT pour les chiennes présentant des CMT. Nous observons une possible spécificité croisée du clone A15153G anti-TIGIT chez le chien, suggérant que cet outil pourrait être utilisé pour caractériser l'infiltrat immunitaire des CMT. Comme pour l'anti-CCR8, la validation définitive de cet outil demandera son évaluation sur une lignée transfectée avec le gène *TIGIT* canin.

Les autres anticorps testés ne semblent pas présenter une spécificité croisée pour les antigènes canins. Nous ne pouvons exclure que l'absence de marquage observée sur les PBMCs activés soit liée à l'absence d'expression des antigènes canins par les PBMCs activés. Une évaluation sur lignée transfectée avec les gènes canins permettrait de déterminer si l'absence de signal est due à un manque de spécificité des Ac ou à une absence d'expression des marqueurs par les PBMCs activés canins.

Dans la suite de cette étude, les Ac testés ci-dessus n'étant pas définitivement validés chez le chien, et la sensibilité de ces Ac vis-à-vis des Ag canins pouvant être plus faible et représenter un biais dans l'analyse du niveau d'expression des marqueurs, nous avons choisi d'utiliser des Ac anti-CCR4, anti-TIM3 et anti-PD-1 dont la spécificité chez le chien en cytométrie en flux avait déjà été prouvée (123, 134–136).

Les résultats obtenus dans cette partie de notre étude sont cohérents avec la surexpression de CCR4 par les Tregs intratumoraux observée dans les cancers de la prostate canins (97) ainsi qu'avec le rôle démontré de CCR4 dans le recrutement des lymphocytes dans le tissu tumoral du cancer du sein (75) et l'expression de CCR4 par les T CD8⁺ mémoires centraux (137) chez l'humain.

De même, l'expression de TIM-3 et PD-1 par les lymphocytes T CD8⁺ dans l'environnement tumoral est cohérente avec les données existantes chez la femme. Dans les tumeurs du sein agressives, PD-1 est surexprimé par les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ (138) et l'expression de TIM-3 par les lymphocytes T CD8⁺ de l'environnement tumoral corrèle avec le grade (139). Cependant, l'absence de différence significative d'expression de PD-1 et TIM-3 entre les infiltrats lymphocytaires du tissu sain et du tissu tumoral est surprenante. Elle est peut-être due à la taille réduite de la cohorte prospective étudiée, ou à la nature des échantillons de tissu sain : ici un tissu adjacent, non macroscopiquement envahi, mais prélevé sur des chiennes atteintes de tumeurs mammaires (par opposition à des chiennes atteintes de pathologies non tumorales ou saines). La forte expression de PD-1 et TIM-3 par l'infiltrat immunitaire du tissu sain pourrait donc également être liée à une modification de l'infiltrat immunitaire du tissu mammaire en général, même du tissu sain, chez les chiennes atteintes de tumeurs mammaires.

Un autre résultat surprenant est la relativement faible expression de PD-1 par les Tregs et T CD4⁺ de l'environnement tumoral chez le chien. Chez l'humain, le niveau d'expression de PD-1 est très élevé sur toutes les populations T dans l'environnement tumoral (résultats non publiés internes à l'équipe). Il pourrait ici s'agir d'une différence entre l'humain et la chienne, mais nous ne pouvons exclure une plus faible sensibilité de l'Ac utilisé à l'antigène PD-1 canin ou un problème de taille réduite de la cohorte étudiée.

Ici, on peut aussi s'interroger sur la significativité de nos résultats. En effet, même une différence telle que la différence d'expression de PD-1 par les lymphocytes Teff et

CD8⁺ du tissu sain (**Figure 9E**), qui est visuellement marquée, se révèle non significative (p-value de 0,059) après analyse statistique utilisant le test de Kruskal-Wallis (un test de rang non paramétrique du fait de la petite taille de l'échantillon et non pairé car tous les tissus ne sont pas systématiquement exploitables pour l'ensemble des cas, avec correction pour comparaisons multiples). Pour confirmer les tendances observées, une étude sur une cohorte plus large ou plus homogène sera donc nécessaire.

Nous n'avons pas pu ici comparer le niveau d'expression de PD-1 sur les différentes populations T circulants ou infiltrant le tissu mammaire d'individus sains (par opposition au tissu mammaire sain d'individus présentant par ailleurs des CMT), mais avons observé un niveau d'expression de PD-1 et de CCR4 plus élevé sur les lymphocytes T CD8⁺ de tous les tissus chez les chiennes porteuses de CMT, ce qui suggère que le ciblage de CCR4 ou de PD-1 pourrait réactiver l'immunité anti-tumorale médiée par les T CD8⁺ mais pourrait aussi avoir des effets secondaires liés à la réactivation de ces lymphocytes CD8⁺ présents dans les tissus sains. En effet, si le bénéfice pronostique d'une thérapie anti-PD-1 caninisée pour les chiens atteints de mélanomes oraux a été démontré par Igase *et al* (121) et celui d'une thérapie anti-CCR4 chez les chiens atteints de tumeurs de la vessie et de la prostate par Maeda *et al* (100, 123), l'applicabilité de cette thérapie au traitement des CMT dépendra notamment de l'importance des effets indésirables liés au ciblage des différentes populations lymphocytaires infiltrant le parenchyme mammaire sain. Deux de ces études incluant des femelles il semblerait que ces thérapies n'aient pas d'effets indésirables spécifiques au parenchyme mammaire. Ceci confirme l'intérêt que pourraient présenter les immunothérapies anti-PD1 et anti-CCR4 pour le traitement de CMT de haut grade.

Un argument fréquemment avancé contre l'application en médecine vétérinaire de traitements disponibles en médecine humaine est la prise en charge des frais de traitement par les propriétaires. Cependant, considérant l'évolution du coût des traitements, le poids beaucoup plus faible des animaux (souvent des chiennes de petites races) et le coût d'autres traitements tels que la chimiothérapie, un traitement des chiennes présentant des tumeurs mammaires de haut grade pourrait être proposé. Le facteur limitant à ce jour n'est sans doute pas tant le coût d'administration de tels traitements, que le coût de développement d'Ac sous format caninisé, pour éviter la réponse immunitaire visant les immunoglobulines d'autres espèces qui dégraderait le

traitement. Igase *et al* ont déjà procédé au développement d'outils caninisés et à leur évaluation chez le chien, avec des résultats très prometteurs. On peut donc supposer que ces réactifs sont disponibles (ou du moins que leur production est réalisable en laboratoire sous des délais raisonnables) et qu'ils pourraient être évalués dans des essais cliniques pour le traitement de tumeurs mammaires de haut grade chez la chienne.

Enfin, nos résultats présentent certains biais : le transport et la prise en charge technique des échantillons ayant été réalisés sur plusieurs heures et les suspensions cellulaires issues de la dissociation tumorale ayant été congelées à -80°C puis déplacées sur un autre site pour la suite de la prise en charge, la conservation des échantillons de la cohorte prospective n'a pas été optimale et pourrait être à l'origine d'une activation artéfactuelle des cellules. De plus, du fait du faible nombre d'échantillons analysés (n=6), nous n'avons pu tirer de conclusions significatives. La réalisation d'une nouvelle étude, avec centralisation de tous les réactifs et toutes les manipulations sur un même site, étendue sur une durée plus longue, incluant un plus grand nombre de cas et comparant avec des cas pris en charge pour mammectomie sans développement de CMT serait nécessaire pour confirmer les résultats obtenus ici et nous affranchir des éventuels biais.

PARTIE 3

CARACTÉRISATION PAR IMMUNOHISTOCHIMIE DES POPULATIONS IMMUNITAIRES INFILTRANT LES TUMEURS MAMMAIRES SIMPLES BÉNIGNES ET MALIGNES DE LA CHIENNE

Comme mentionné plus haut, il est très important, dans l'optique d'évaluer la pertinence du modèle canin, de valider d'abord les outils immunologiques utilisables dans ce modèle. Cette seconde partie de mon travail a donc eu pour objectif d'évaluer l'applicabilité des méthodes d'analyses automatisées aux marquages immunohistochimiques réalisés sur des tumeurs mammaires canines simples bénignes et malignes.

Pour cela, nous avons caractérisé l'infiltrat immunitaire macrophagique, lymphocytaire T, T cytotoxique, Treg et B, sur la base de l'expression des marqueurs IBA-1, CD3, CD8, FOXP3 et CD20 respectivement, et évalué la pertinence du procédé d'analyse semi-automatisé utilisé en recherche biomédicale en comparant les résultats obtenus par ce procédé avec les données de la littérature.

Par ailleurs, le développement de multiples foyers tumoraux dans des mamelles différentes est fréquent chez la chienne et le développement simultané de foyers tumoraux dans plusieurs cadrans mammaires a récemment été décrit comme assez fréquent chez la femme. Nous avons émis l'hypothèse que le développement à distance dans une autre mamelle d'une tumeur mammaire maligne influençait la composition de l'infiltrat immunitaire de tumeurs mammaires bénignes présentes dans une première mamelle. En effet, la surveillance immunitaire lors du développement d'une tumeur maligne induit une immunité systémique spécifique de cette tumeur. Il paraît alors probable que la composition des populations immunitaires présentes dans le sang ainsi que la nature des cellules recrutées sur un second site tumoral soient influencées et modifiées par la présence de cette première tumeur. Ceci n'est pas anodin, car cette influence est plutôt de nature tolérogène vis-à-vis du

développement tumoral, et pourrait donc réduire le contrôle de l'immunosurveillance sur le site bénin, favorisant ainsi une progression vers la malignité.

Enfin, chez la femme, l'organisation de l'infiltrat immunitaire en larges structures, contenant des zones riches en lymphocytes B et des zones riches en lymphocytes T, et irriguées par des HEVs correspond à des TLS. Ces structures ont longtemps été considérées comme de bon pronostic dans divers types de tumeurs (103–105). Des avancées récentes ont cependant permis de déterminer qu'un enrichissement du TLS en plasmocytes et lymphocytes B prolifératifs est associée à un bon pronostic, alors qu'un enrichissement des TLS en Tregs est associé à un mauvais pronostic. (141). Chez la chienne, la caractérisation de structures lymphoïdes tertiaires dans des carcinomes mammaires simples a été rapportée pour la première fois par Giambrone et al en 2022 (101), alors que nous avons déjà bien avancé notre travail de thèse. Nous avons dans le cadre de ce travail identifié des structures similaires à des TLS et avons caractérisé l'infiltrat les composant.

I. Matériel et méthodes

1. Échantillons biologiques

Pour évaluer si l'infiltrat immunitaire des tumeurs bénignes varie significativement selon que la tumeur bénigne se développe en présence de tumeurs malignes ou seule, nous avons sélectionné une cohorte de chiennes présentant des tumeurs mammaires bénignes isolées (Cohorte B) et une cohorte de chiennes présentant plusieurs tumeurs, dont au moins une tumeur bénigne et une tumeur maligne (Cohorte BM). Par la suite, les tumeurs bénignes de la cohorte BM seront désignées par le terme « Bénin (BM) » et les tumeurs malignes de la cohorte BM par le terme « Malin (BM) ». Nous avons par ailleurs construit une cohorte constituée de chiennes présentant des lésions mammaires de nature non néoplasique, cohorte désignée par le terme S.

Cette étude, rétrospective, a inclus au total 26 chiennes. La cohorte BM est composée de dix chiennes ayant présenté au moins un adénome simple et un adénocarcinome simple ou un carcinome simple (**Tableau VII**). La cohorte B est composée de huit chiennes ayant développé seulement des adénomes simples (**Tableau VII**). La cohorte S est composée de huit chiennes ayant présenté des lésions non tumorales (**Tableau VII**).

Les diagnostics histologiques ont été confirmés par le Pr. T Marchal (VetAgro Sup). Les échantillons biologiques sont constitués des blocs de tissus fixés dans le formol puis inclus en paraffine (FFPE) disponibles dans la collection du Laboratoire d'Histopathologie de VetAgro Sup.

Les cohortes sont composées de chiennes de différentes races (**Tableau VII**). L'âge des animaux inclus dans ces cohortes n'est pas significativement différent, bien que les animaux présentant des tumeurs malignes soient légèrement plus âgés.

2. Marquages IHC sur coupes FFPE

Dix coupes sériées de chacun des blocs FFPE sélectionnés inclus dans chaque cohorte ont été déparaffinées et réhydratées après incubations successives dans des bains de Ottix Plus (trois fois 10 min, Diapath), Ottix Shaper (10 min, Diapath) et Ethanol pur (10 min, VWR), puis ont subi un démasquage antigénique pendant 40 min à 95°C en solution Dako targetretrieval (Dako, pH9) ou Citrate buffer (Diapath, pH6) en fonction de la nature de l'anticorps primaire utilisé. Les peroxydases endogènes ont été bloquées par incubation 10 min dans 200µL par lame l'H₂O₂ 10 Volumes diluée en eau déminéralisée (Savetis, 1/3). Le signal aspécifique observé dans les expériences préliminaires a été éliminé par incubation pendant 15 min avec un kit bloquant les sites avidines et biotine (Avidin/biotin blocking kit (Abcam). Les lames ont ensuite été incubées pendant 30 min à température ambiante avec 200µL d'Ac anti-**CD3** (BioRad, CD3-12, 1/100), anti-**CD20** (ThermoFisher, L26, 1/300), anti-**FOXP3** (eBioscience, FJK16S, 1/100), anti-**CD8** (Abcam, CAL66, 1/250), anti-**IBA-1** (Abcam, EPR16589, 1/8000), anti-**cytokératine** (CK) (Agilent, AE1AE3, 1/50), anti-**Ki67** (Dako, MIB-1, 1/25) et anti- **Lsélectine/PNAd/Meca-79** (BD, MECA-79, 1/100) dilués dans une solution d'Antibody diluent (Zyto MedSystems), puis après rinçage avec une solution de tampon PBS, incubées une heure dans 200µL de UltraTek Anti-Polyvalent (ScyTek, ABN008 ready-to-use), rincées dans deux bains de PBS, incubées 30 min avec 200µL de UltraTek HRP (ScyTek, ABL008, ready to use), rincées en deux bains de 10 min de PBS, incubées 30 min en 200µL de DAB Chromogen (ScyTek, ACB003, ready-to-use) puis révélées deux à cinq minutes dans 200µL par lame de Vector® NovaRED® substrate kit (Vector Labs), lavées à l'eau courante et contre colorées avec de l'hémalum. Les lames ont ensuite été déshydratées par un passage de cinq secondes dans de l'alcool pur, 30 secondes en

Ottix Shaper, trois fois cinq minutes en Ottix Plus, séchées puis montées avec une lamelle.

Tableau VII : Diagnostics histologiques et caractéristiques biologiques des cas inclus dans la cohorte rétrospective.

Caractéristiques biologiques	Cohorte BM	Cohorte B	Cohorte S
Diagnostic histologique			
Adénocarcinome simple	n=6	n=0	n=0
Carcinome simple	n=4	n=0	n=0
Adénome simple	n=10	n=8	n=0
Hyperplasie	n=0	n=0	n=7
Kyste	n=0	n=0	n=1
Grade			
Grade I	n=3	NA	NA
Grade II	n=3		
Grade III	n=4		
Observation d'embolies lymphatiques			
Oui	n=0	n=0	NA
Non	n=10	n=8	
Présence de métastases macroscopiques			
Oui	n=1	NA	NA
Non	n=9		
Age moyen en années (\pm SD)	10,7 \pm 2,7	9,4 \pm 3,5	8,1 \pm 2,9
Race			
Leonberg	n=1	n=0	n=0
Caniche	n=2	n=1	n=0
Jack Russell Terrier	n=1	n=0	n=0
Fox Terrier	n=1	n=3	n=1
Berger Allemand	n=1	n=0	n=0
Pinscher	n=1	n=0	n=0
Chihuahua	n=0	n=1	n=0
Yorkshire Terrier	n=0	n=1	n=0
Shi Tzu	n=0	n=1	n=1
Cane Corso	n=0	n=0	n=1
Lhasa Apso	n=0	n=0	n=2
Bouledogue Français	n=0	n=0	n=1
Boxer	n=0	n=0	n=1
Croisés	n=3	n=1	n=0
ND	n=0	n=0	n=1
Statut reproducteur			
Chienne entière	n=2	n=6	n=4
Chienne stérilisée	n=2	n=1	n=0
ND	n=6	n=1	n=4

Certaines caractéristiques sont non applicables à certaines cohortes (NA) ou indéterminées (ND). Les chiennes ne présentant des tumeurs mammaires malignes et bénignes forment la cohorte BM, les chiennes ne présentant que des tumeurs bénignes forment la cohorte B et les chiennes ne présentant pas de tumeurs forment la cohorte S.

3. Quantification des marquages IHC

Les lames marquées ont été scannées au grossissement x20 sur un scanner Panoramic (3D Histec, **Figure 10A - F**). Les zones d'intérêt ont été définies sur le logiciel HALO (Indica lab). Un algorithme « Forest Analysis » a été entraîné sur les lames marquées avec l'anticorps anti-CK pour définir la segmentation tissulaire en **parenchyme** (présence de structures épithéliales glandulaires organisées en lobules, marquées positivement par l'anti-CK) et en **stroma** (tissu conjonctif entourant les lobules de parenchyme). Cette segmentation a été transposée sur toutes les lames sériées du même bloc grâce à l'outil de synchronisation du logiciel Halo et corrigée manuellement. Un second algorithme « Forest Analysis » a ensuite été entraîné sur chaque lame pour détecter les artéfacts. Un troisième algorithme Area « Indica Labs algorithm » (marquage IBA-1) ou « Forest Analysis » (autres marqueurs) a été entraîné à détecter les noyaux cellulaires et le marquage IHC (description du processus dans la **Figure 10G - L**).

Pour les lames présentant des structures lymphoïdes tertiaires, ces structures ont été identifiées par confirmation visuelle sur les lames CD20 et CD3 de deux zones adjacentes infiltrées par des vaisseaux. Pour l'analyse de la composition de l'infiltrat constituant les TLS, nous avons sélectionné aléatoirement parmi les cas présentant des TLS quatre cas de la cohorte « Malin (BM) », deux cas de la cohorte « Bénin (BM) », deux cas de la cohorte B et un cas de la cohorte S. Les zones ont été délimitées manuellement (Zone TLS), ainsi que des zones de stroma sain (Zone Stroma) sur les lames CD20 et transposées sur les lames CD8, FOXP3 et Ki67.

4. Analyse statistique

Les résultats ont été analysés par un test non paramétrique de rangs Wilcoxon pairés sur le logiciel R (comparaisons intra-individuelles) ou un test de Kruskal-Wallis non pairé avec correction pour comparaisons multiples (comparaison inter-individuelle) sur GraphPad Prism (V7). La taille réduite des cohortes limite la significativité des résultats, bien que les outils statistiques adaptés aient été utilisés.

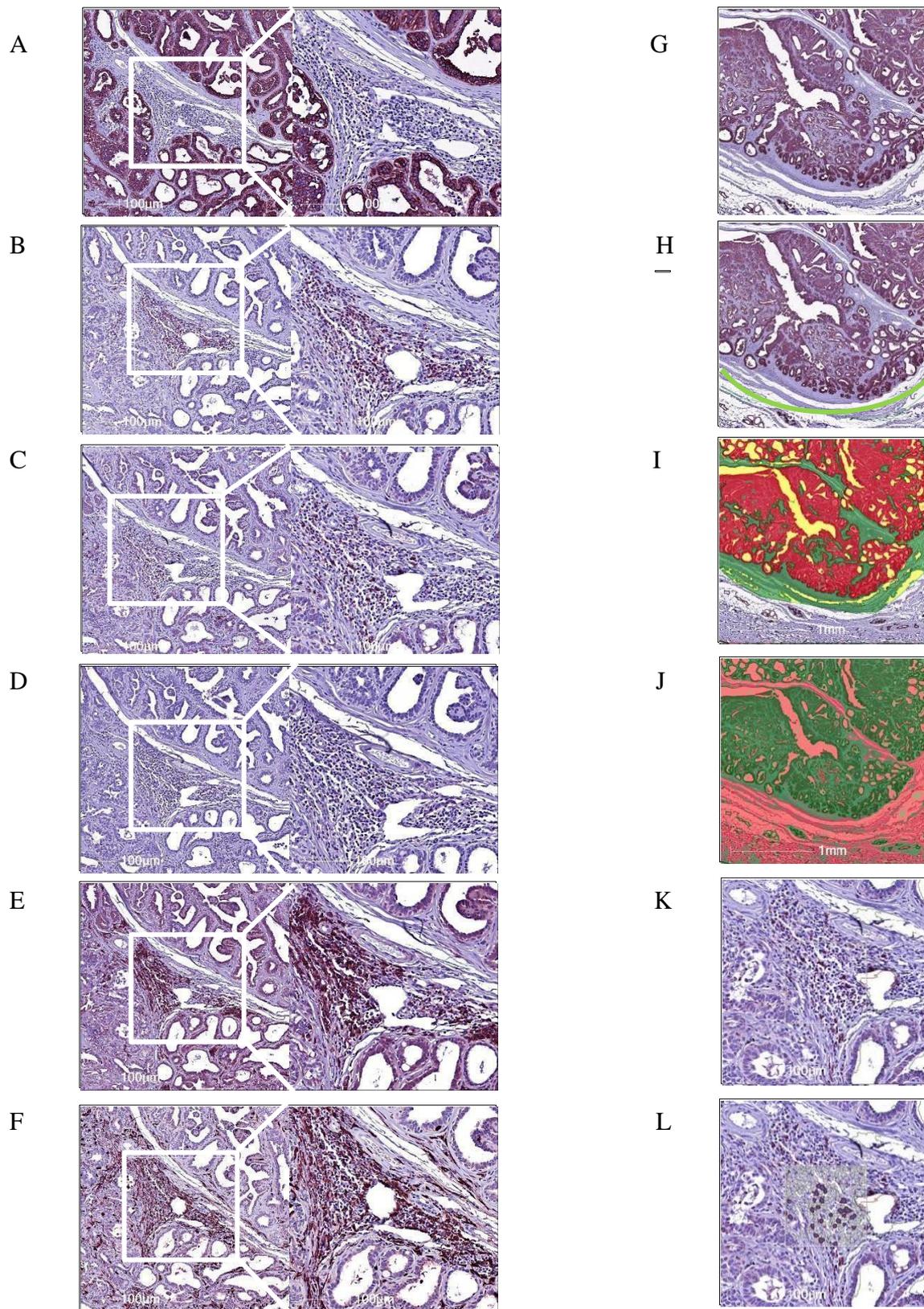


Figure 10 : Exemples de marquages IHC et procédure d'analyse d'une lame avec le logiciel Halo. Des coupes d'adénocarcinome mammaire canin ont été marquées pour détecter le parenchyme (CK+, A), la présence de lymphocytes T totaux (CD3+, Panneau B), T CD8⁺ (C), Tregs (FOXP3⁺, D), Lymphocytes B (CD20⁺, E) et macrophages et cellules dendritiques (IBA-1⁺, F). Les zones de la lame marquée avec l'anti-CK (G) correspondant à du tissu mammaire

sain ou tumoral qui ont été délimitées manuellement (H), le tissu stromal et le tissu épithélial ont été identifiés par un algorithme entraîné sur les lames marquées avec un anticorps anti-cytokératine (I, tissu épithélial en rouge, tissu stromal en vert, fond en jaune). Les artefacts ont ensuite été exclus (J, zone rouge). Enfin, un algorithme a été appliqué aux lames marquées pour la détection des noyaux et du marquage. Une confirmation visuelle de la correspondance entre la lame marquée (K) et le phénotype détecté par l'algorithme (L, phénotype négatif [noyau bleu et cytoplasme blanc] ou positif [noyau bleu et cytoplasme marron]) a été réalisée.

II. Résultats

1. Applicabilité de l'analyse automatique aux marquages IHC en recherche vétérinaire

Nous avons ici voulu vérifier que l'analyse automatisée de marquages IHC anti-IBA1, anti-CD20, anti-CD3, anti-CD8 et anti-FOXP3 (**Figure 10B - F**) sur coupes de CMT produit des résultats cohérents avec les données précédemment obtenues dans la littérature par analyse non automatisée.

Nous observons pour la cohorte BM (bénin et malin) une tendance non significative à un enrichissement d'environ 20% du parenchyme et du stroma en cellules IBA-1⁺ (macrophages et DCs) par rapport aux cohortes B et S (**Figure 11A**).

Nous observons également une tendance non significative à un enrichissement en lymphocytes B dans le parenchyme tumoral (8,6% dans le parenchyme tumoral de la cohorte « Malin (BM) » contre 2,5% dans le parenchyme de la cohorte S) et le stroma des lésions malignes (26,0% dans le stroma tumoral de la cohorte « Malin (BM) » contre 2,9% dans le stroma de la cohorte S) (**Figure 11B**).

Le stroma des cohortes « Bénin (BM) » et « Malin (BM) » semble enrichi de manière non significative en lymphocytes T CD3⁺ en comparaison de la cohorte S (7,3% de cellules CD3⁺ dans le stroma « Malin (BM) » ; 3,9% dans le stroma de la cohorte S) (**Figure 11C**), alors que l'infiltrat CD3⁺ semble diminuer dans le parenchyme mammaire de ces cohortes (1,9% des cellules CD3⁺ dans le parenchyme « Malin (BM) » contre 5,9% dans le stroma de la cohorte S).

Les lymphocytes T CD3⁺ incluent à la fois des lymphocytes T CD8⁺ et des Tregs. On n'observe aucune variation de l'infiltrat CD8⁺ dans le parenchyme en fonction des cohortes (2,9% de cellules CD8⁺ dans le parenchyme des cohortes S et « malin (BM) », 2,3% dans le parenchyme de la cohorte B, 3,2% dans le parenchyme de la

cohorte « Bénin (BM) ») (**Figure 11D**) et une augmentation non significative de celui-ci dans le stroma de la cohorte « Malin (BM) » (2,1% dans le stroma de la cohorte S ; 3,3% dans le stroma de la cohorte B ; 2,7% dans le stroma de la cohorte « Bénin (BM) » ; 4,0% dans le stroma de la cohorte « Malin (BM) »).

L'infiltrat FOXP3⁺ évolue de manière similaire à l'infiltrat T global CD3⁺, toujours de manière non significative (1,9% dans le parenchyme de la cohorte S contre 0,66% de FOXP3⁺ dans le parenchyme de la cohorte « Malin (BM) » ; 2,2% dans le stroma de la cohorte S contre 3,4% de FOXP3⁺ dans le stroma de la cohorte « Malin (BM) ») (**Figure 11E**).

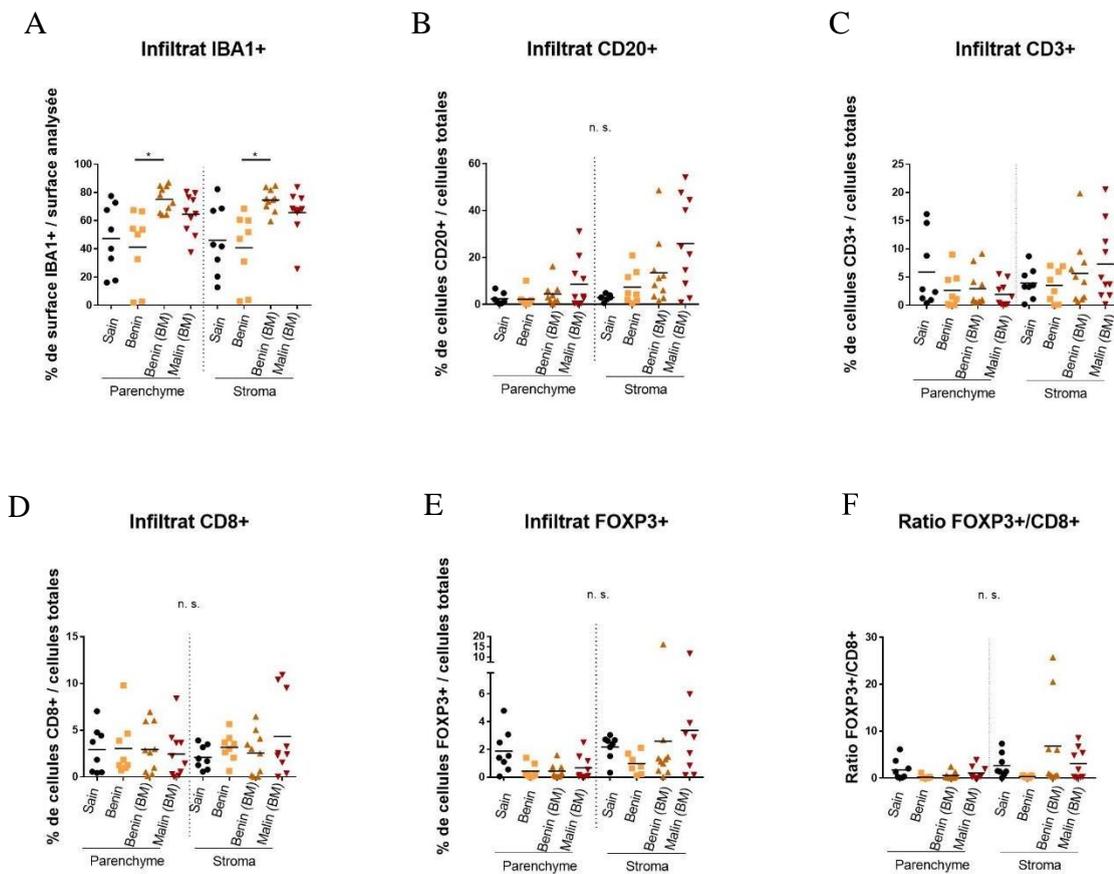


Figure 11 : Comparaison de l'infiltrat immunitaire du stroma et du parenchyme des tissu sain, tumeurs bénignes et tumeurs malignes des cohortes S, B et BM. Pourcentage de la surface IBA-1⁺ parmi la surface totale (A) et pourcentage parmi les cellules totales des cellules CD20⁺ (B), CD3⁺ (C), CD8⁺ (D) et FOXP3⁺ (E), et du ratio des infiltrats FOXP3⁺ et CD8⁺ (F) dans le parenchyme et le stroma de tissu mammaire des chiennes des cohortes S (Sain), B (Bénin) et BM (« Bénin (BM) ») et « Malin(BM) »). Les traits horizontaux représentent la moyenne des valeurs pour chaque population. Les astérisques (*) marquent une différence significative ($p < 0,05$) par test de Kruskal-Wallis non paillé.

Le ratio FOXP3⁺ / CD8⁺ n'est pas univoque : s'il semble augmenté dans le stroma de la cohorte « Malin (BM) » (ratio de 3,1 dans le stroma de la cohorte « Malin (BM) », contre 2,7 dans le stroma de la cohorte S) (**Figure 11F**), il est plus faible dans le parenchyme de la cohorte « Malin (BM) » que dans le parenchyme de la cohorte S (1,1 et 1,8 respectivement) et beaucoup plus faible dans le parenchyme et le stroma de la cohorte B (0,6 dans le parenchyme et 0,8 dans le stroma) que dans le parenchyme et le stroma de la cohorte S (1,8 dans le parenchyme et 2,7 dans le stroma).

2. Impact du développement simultané sur le même animal de plusieurs foyers tumoraux dont au moins un bénin et un malin

L'infiltrat IBA-1⁺ est significativement plus important dans le parenchyme (74,9% contre 46,8%) et dans le stroma (73,5% contre 46,2%) des tumeurs bénignes de la cohorte BM que dans le parenchyme et le stroma des tumeurs bénignes isolées de la cohorte B.

De même l'infiltrat en lymphocytes CD20⁺ semble légèrement augmenté de façon non significative dans le parenchyme (4,5% contre 2,2%) et le stroma (13,5% contre 7,4%) de la cohorte « Bénin (BM) » en comparaison de la cohorte B.

La faible puissance statistique et la forte variabilité dans notre étude ne nous permet pas d'identifier de tendance dans la variation de l'infiltrat T total (CD3⁺) (**Figure 11C**), T CD8⁺ (**Figure 11D**) et Tregs (FOXP3⁺) (**Figure 11E**).

On constate une augmentation non significative du ratio FOXP3⁺ / CD8⁺ dans le stroma des tumeurs de la cohorte « Bénin (BM) » (0,6 dans le parenchyme, 6,8 dans le stroma) en comparaison de la cohorte B (0,2 dans le parenchyme, 0,3 dans le stroma).

Nous pouvons donc conclure que l'infiltrat immunitaire d'une tumeur bénigne qui se développe simultanément à une tumeur maligne est significativement plus riche en macrophages, et semble présenter un enrichissement non significatif en lymphocytes B et un plus fort ratio FOXP3⁺ / CD8⁺.

3. Identification et caractérisation dans le stroma de structures lymphoïdes tertiaires chez les chiennes présentant des tumeurs mammaires

Nous avons pu caractériser l'organisation spatiale de l'infiltrat immunitaire de ces tumeurs et en particulier identifier des formations lymphoïdes tertiaires.

Lors de l'analyse de nos différents marquages, nous avons remarqué que la plupart des zones parenchymateuses malignes étaient entourées de zones stromales très riches en infiltrat immunitaire.

Dans cet infiltrat, nous observons des zones distinctes enrichies respectivement en lymphocytes B CD20⁺ (**Figure 12A**, ovale jaune) et en lymphocytes T CD3⁺ (**Figure 12B**, ovale vert). Ces lymphocytes T sont principalement des T CD8⁺ (**Figure 12C**) alors que les lymphocytes Treg sont absents ou rares (**Figure 12D**). Le marquage de la L-selectine (CD62L/PNAd/MECA-79) nous permet d'identifier des HEVs infiltrant ces structures (**Figure 12E**) et donc d'affirmer la nature de ces amas lymphoïdes en tant que tissu lymphoïde tertiaire. Cependant, nous n'observons pas la formation au sein des zones B de centres germinatifs.

Ces structures similaires aux TLS sont significativement plus fréquentes dans le stroma de la cohorte « Malin (BM) » que dans le stroma de la cohorte S (**Figure 13A**) et non-significativement plus fréquentes que dans le stroma associé à du parenchyme bénin des cohorte B et « Bénin (BM) ».

Par ailleurs l'analyse de la composition cellulaire de ces TLS nous montre qu'ils sont significativement enrichis en lymphocytes T CD8⁺ par comparaison au stroma environnant (**Figure 13B**), mais pas en Tregs (**Figure 13C**) et que les cellules présentes ne prolifèrent pas plus que les cellules du stroma environnant, ce qui confirme l'absence de centre germinatif (**Figure 13D**).

Du fait de la taille réduite de nos cohortes et du faible nombre de cas présentant des TLS analysés pour chaque cohorte, nous n'avons pas comparé la composition des TLS dans chaque cohorte.

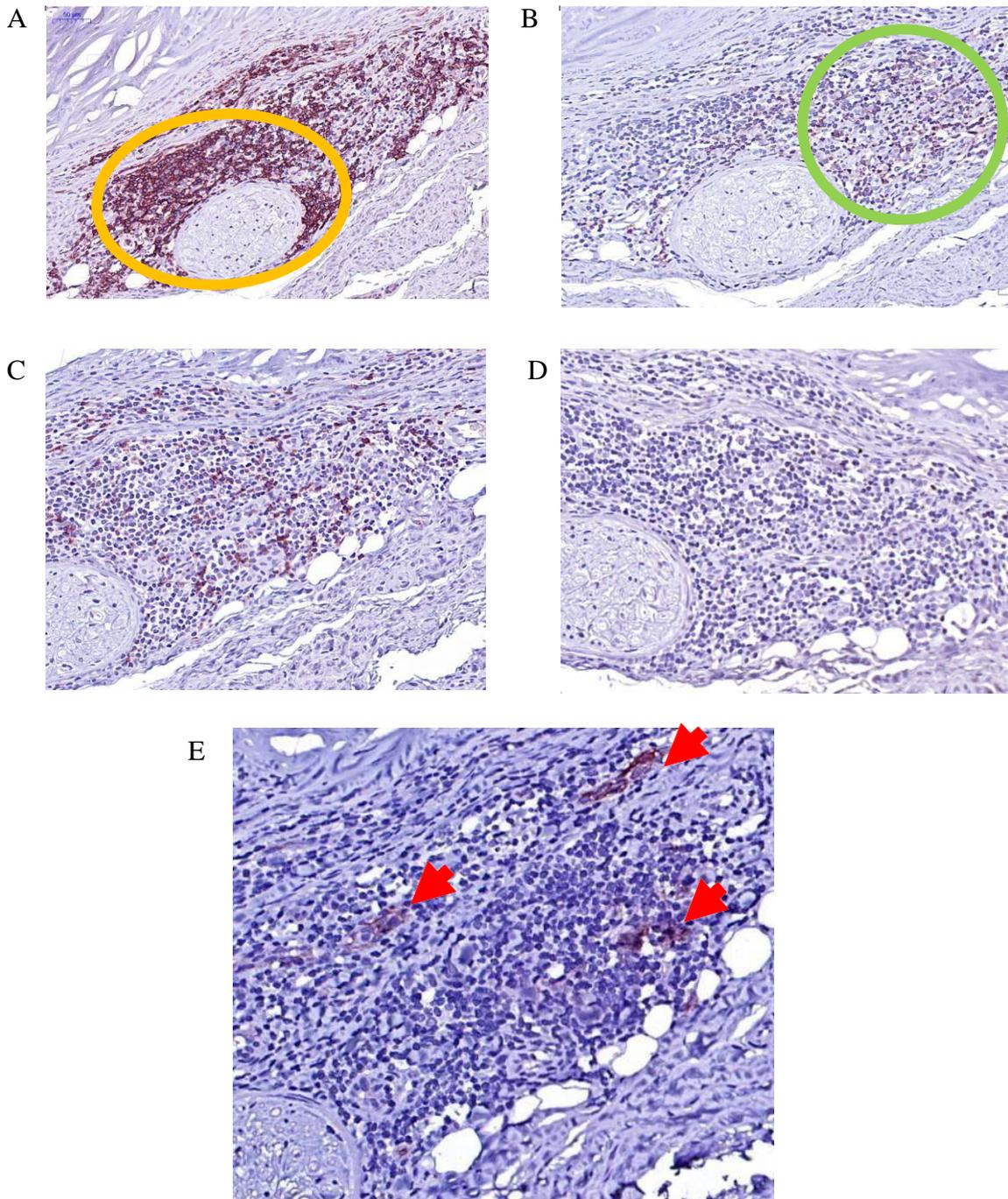


Figure 12 : Observation de structures similaires à des TLS dans le stroma mammaire des chiennes présentant des CMT. Structures lymphoïdes comprenant deux zones mutuellement exclusives enrichies en lymphocytes B (A, ovale jaune) et T (B, ovale vert) respectivement, riches en lymphocytes T CD8⁺ (C) mais pas en Tregs (D) et contenant des structures vasculaires présentant des similarités histologiques avec les veinules post capillaires (HEVs) exprimant le marqueur MECA79 (E, pointes de flèches rouges).

III. Discussion

La seconde partie de ce travail visait à évaluer l'applicabilité à la recherche vétérinaire des méthodes d'analyses et des réactifs immuno-histochimiques utilisées dans le cadre de la recherche biomédicale humaine.

Les techniques actuellement utilisées en recherche humaines se basent notamment sur les techniques de mIF, *i. e.* des marquages similaires à ceux utilisés en IHC, mais réalisés successivement et révélés par des Ac secondaires couplés à divers fluorochromes. La mise en place de telles techniques est très longue, et nous avons préféré opter pour l'analyse sur des lames sériées pour lesquelles nous avons appliqué le processus d'analyse automatisé utilisé en routine au laboratoire.

Les publications vétérinaires se basant sur une analyse automatique sont assez rares, notamment pour l'étude du tissu mammaire, et peu font état des difficultés rencontrées. Ici, l'analyse automatique a été laborieuse, du fait de plusieurs facteurs. Premièrement, les marquages IHC ont été réalisés manuellement, ce qui a contribué à la dégradation du stroma (**Figure 14A**), générant des biais non négligeables avec une partie du stroma non analysable et la dégradation particulièrement importante du stroma péri-tumoral. Sur la base des analyses préliminaires nous avons jugé cette dégradation trop importante pour poursuivre notre analyse du stroma selon une segmentation intra- ou péri-tumorale, ce qui nous aurait permis d'évaluer si notre cohorte présentait des similarités avec d'autres études réalisées précédemment et d'analyser plus finement nos résultats. Deuxièmement, le tissu mammaire présente quelques spécificités générant des artéfacts. L'hétérogénéité des carcinomes mammaires étant importante, nous n'avons pas réussi à générer un algorithme unique permettant l'analyse de toutes les lames. Nous avons donc dû procéder à l'entraînement, pour chaque lame, d'un algorithme de segmentation parenchyme- stroma, d'un algorithme diagnostiquant les artéfacts et d'un algorithme de segmentation cellulaire et de détection du marquage. Ceci n'a fait que reporter, à l'étape du développement des algorithmes, le biais et l'hétérogénéité dépendants des manipulateurs-trices, reprochés aux analyses visuelles habituellement réalisées en histologie vétérinaire. La présence de sécrétion lactée fortement éosinophile (**Figure 14B**), associée aux variations histologiques à l'échelle microscopique entre deux lames sériées, a généré de nombreux faux positifs qui ont nécessité l'entraînement d'un algorithme détectant les artéfacts sur chaque lame. Les macrophages infiltrant les tissus tumoraux

présentent une coloration brun doré due à une accumulation intracytoplasmique de pigments (**Figure 14C**). Les similarités phénotypiques entre le marquage réel (**Figure 14D**) et ces artéfacts a empêché leur inclusion dans l'algorithme détectant les artéfacts. Nous avons dû identifier la couleur de ce marquage artéfactuel (légèrement distincte de celle du marquage d'intérêt) comme un second marquage, qui a été exclu du phénotype des cellules positives. Pour les quelques lames pour lesquelles l'algorithme ne permettait pas de différencier de ces deux marquages, les zones enrichies en marquage artéfactuel ont été exclues manuellement, ce qui a généré un autre biais.

Finalement, l'analyse et l'annotation des lames étant très chronophage, elle a été réalisée par moi-même, qui ne suis pas anatomopathologiste de formation, d'après les observations du Pr T Marchal (VetAgroSup). Outre le biais important d'erreur que cette méthode a généré, il m'a été impossible de procéder à cette analyse en double aveugle. Considérant que le seuil de positivité a été déterminé manuellement après confirmation visuelle, ce biais est à prendre en compte.

Enfin, l'hétérogénéité phénotypique des cellules tumorales (**Figure 14E**) et non-tumorales (**Figure 14F**) (taille du cytoplasme, densité de la chromatine, densité du marquage nucléaire, etc) a empêché l'entraînement d'un algorithme commun au stroma et à l'épithélium.

En conclusion, nous estimons que les spécificités du tissu mammaire canin ont généré de nombreux artefacts limitant l'application de la procédure standard d'analyse automatisée sur lame entière. Ces mêmes limitations nous ont empêché de réaliser les analyses de localisation (stroma intra- et péri-tumoral) et de distance (distance moyenne entre différents types cellulaires après synchronisation et fusion des lames) que nous avions initialement prévues. On peut supposer qu'une sélection moins large de cas plus similaires entre eux à inclure dans la cohorte (un seul type de carcinome simple : canalaire ou tubulaire seulement, par exemple) pourrait permettre une meilleure applicabilité de cette procédure. Ici, nous avons exploré l'intégralité des échantillons disponibles dans la bibliothèque du service d'anatomopathologie de VetAgroSup. La construction d'une cohorte plus homogène exigerait donc d'avoir accès à une banque de cas plus large, ou de se focaliser sur des cas de carcinomes simples pour la partie applicabilité de l'analyse automatique.

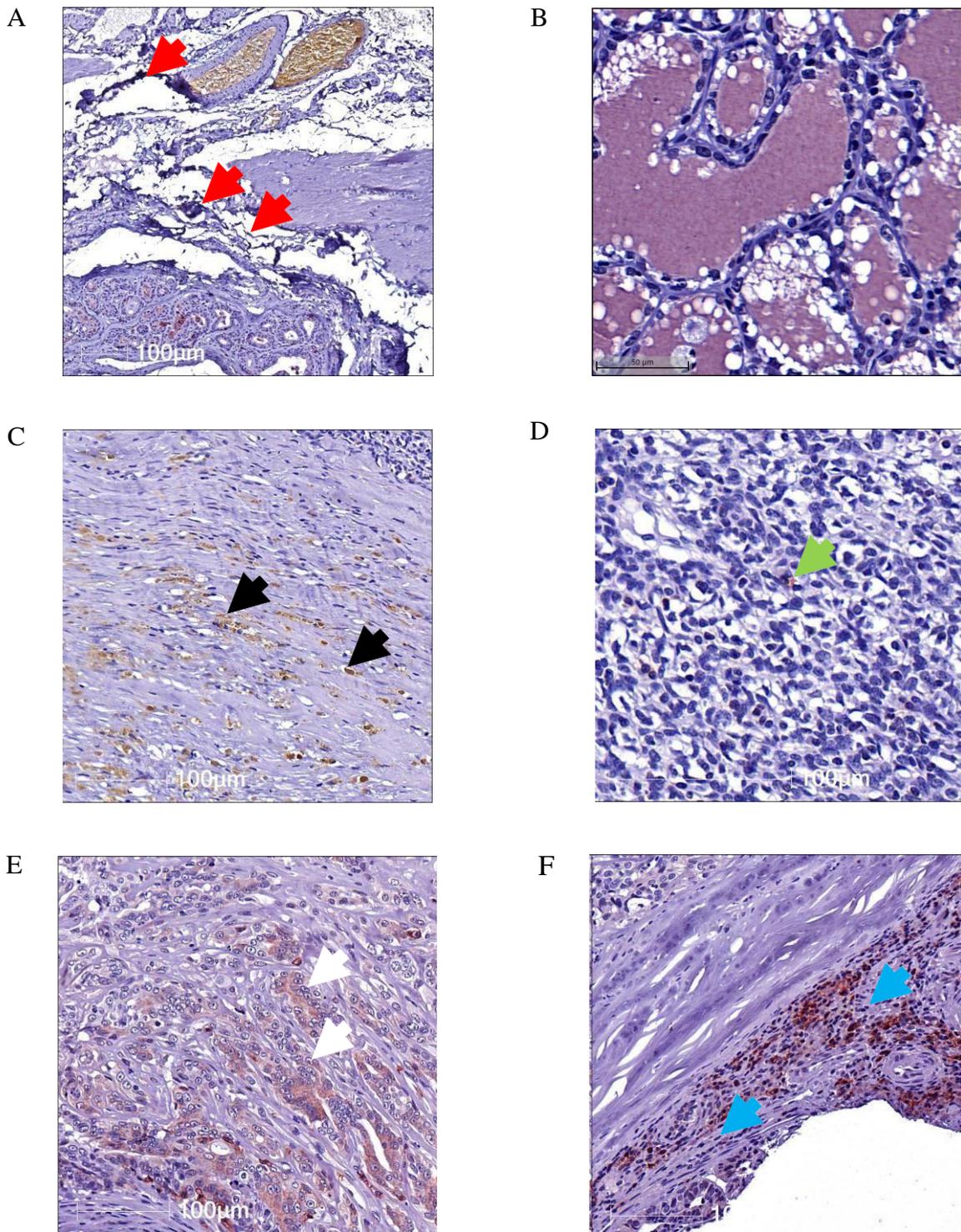


Figure 14 : Exemples d'artefacts devant être pris en compte lors du développement d'un outil d'analyse automatisé commun aux différents blocs et tissus composant notre cohorte. (A) Effilochement du stroma (pointes de flèche rouge). (B) Présence dans les acini de sécrétion lactée éosinophile. (C) Signal positif dans le cytoplasme des macrophages infiltrants (pointes de flèches noires), d'une couleur similaire et d'une intensité parfois similaire au marquage réel (D, marquage anti-CD8, pointe de flèche verte). (E) Faible intensité de la coloration à l'Hémalun des noyaux de cellules tumorales liée à la décondensation de leur chromatine (pointes de flèches blanches, marquage anti-CD3), différant fortement de l'intensité de la coloration des noyaux des cellules stromales (F, pointes de flèches bleues, marquage anti-CD3).

Malgré ces biais, les résultats que nous obtenons sont globalement cohérents avec les données de la littérature : l'enrichissement progressif en macrophages, bien que non significatif, du parenchyme et du stroma avec la malignité (infiltrat plus important dans les tumeurs de la cohorte « Malin (BM) » que dans les tumeurs de la cohorte B. Ceci est cohérent avec le mauvais pronostic associé à l'infiltration stromale ou intra-tumorale des CMT par les macrophages (83). Pour confirmer nos observations et démontrer plus précisément la similarité de l'infiltrat immunitaire des CMT et du cancer du sein, il serait intéressant d'approfondir notre travail par un marquage IHC permettant la différenciation des macrophages et des DCs (CD64 pour les macrophages, XCR1 et CD1c pour les cDC1 et cDC2 respectivement, par exemple).

L'augmentation de l'infiltrat lymphocytaire B dans les tumeurs de la cohorte « Malin (BM) » en comparaison des tumeurs des cohortes B et S est également cohérente avec la corrélation démontrée de l'infiltration par les lymphocytes B avec la malignité des CMT(142). Ceci représente une différence majeure avec les cancers du sein de l'homme, dans lesquels l'infiltration du parenchyme par les lymphocytes B et l'organisation de ces lymphocytes en TLS dans le stroma sont de bon pronostic (74, 143). On sait que le lait est riche en immunoglobulines sécrétées par les plasmocytes infiltrant la glande mammaire. Les lactations de pseudo-gestation étant assez fréquentes chez la chienne, notamment la chienne non stérilisée, et étant un facteur de risque pour le développement de tumeurs mammaires (28), on constate qu'une infiltration par les lymphocytes B et la transformation tumorale du parenchyme mammaire pourraient être indirectement corrélées (sans lien de causalité) chez la chienne. La différence majeure d'occurrence des lactations de pseudo-gestation entre la chienne (25% chez les Dachshungs et les Boxers (28) par exemple) et la femme (six pseudo-gestations pour 22 000 gestations, avec 56 gestations pour 1 000 femmes en moyenne, soit 1,5 pseudo-gestations pour 10 000 femmes environ) pourrait être à l'origine de la composition variable de l'infiltrat immunitaire du tissu mammaire entre les deux espèces. Cette distinction majeure est à garder en tête lors de l'évaluation de la pertinence du modèle canin.

La légère diminution de la proportion de l'infiltrat T CD3⁺ dans le parenchyme des cohortes « Bénin (BM) » et « Malin (BM) » par rapport à la cohorte S est inattendue. Nous ne savons pas dans quelle mesure elle est interprétable : elle n'est pas

significative, et la confirmation de ce résultat sur une plus large cohorte serait nécessaire pour conclure que l'infiltrat CD3⁺ varie.

L'absence de variation significative de l'infiltrat CD8⁺ dans les différentes cohortes n'est pas surprenante. Il est connu que les infiltrats FOXP3⁺ et CD8⁺ ne sont pas des outils optimaux pour évaluer le pronostic. L'impact sur le pronostic de ces deux populations étant lié, l'outil généralement utilisé est le ratio FOXP3⁺/CD8⁺. On constate une légère augmentation du ratio FOXP3⁺/CD8⁺ dans le stroma des tumeurs de la cohorte « Malin (BM) » par rapport au stroma de la cohorte B. Il est curieux que l'infiltrat FOXP3⁺ et le ratio FOXP3⁺/CD8⁺ soient plus importants dans le tissu sain, parenchyme et stroma de la cohorte S, que dans le parenchyme ou le stroma des tumeurs bénignes, mais soient moins élevés que dans le stroma des tumeurs bénignes de la cohorte « Bénin (BM) ». Il n'est pas exclu que cette observation soit liée à la composition de notre cohorte rétrospective. En effet, les échantillons FFPE de tissus mammaires sains disponibles sont assez rares, et nous avons dû inclure dans notre cohorte saine des échantillons non cancéreux, mais atteints d'autres pathologies inflammatoires (hyperplasie, kyste) dont l'infiltrat immunitaire pourrait être biaisé vers une inflammation chronique.

Dans l'ensemble, les tendances de l'infiltrat en lymphocytes T sont très faibles, et non exploitables sur une cohorte de taille aussi réduite. L'enrichissement du stroma et du parenchyme en macrophages et cellules CD20⁺ est plus marqué et nous paraît plus fiable. Nos résultats, quoique non significatifs, sont cohérents avec un rôle de marqueur pronostique de l'infiltrat en macrophages et en lymphocytes B des tumeurs mammaires canines. Ceci semble montrer un rôle très différent des lymphocytes B dans la surveillance immunitaire du développement tumoral chez la chienne et chez la femme. Ceci suggère qu'une analyse plus précise du phénotype des lymphocytes B (production d'immunoglobulines, sécrétion de cytokines telles que l'IL-10, etc) infiltrant les tumeurs mammaires malignes canines et une comparaison effective avec l'infiltrat des tumeurs humaines sont nécessaires pour valider le modèle canin comme modèle du cancer du sein. Ici, il nous semble évident que l'infiltrat en lymphocyte B observé dans le stroma est lié à la présence de structures TLS. Considérant que ces structures sont également significativement associées à la malignité, il est possible qu'elles jouent un rôle différent dans les tumeurs mammaires canines et humaines.

Nous avons également pu démontrer que l'infiltrat immunitaire des tumeurs bénignes variait significativement selon que les chiennes développaient simultanément ou non des tumeurs malignes à distance. Notamment, l'infiltrat en macrophages du parenchyme et du stroma des tumeurs bénignes de la cohorte BM est significativement plus important que celui des tumeurs bénignes seules (cohorte B). Si l'on ne s'intéresse qu'au stroma, la quantité de lymphocytes B, de lymphocytes T et de Tregs semble plus importante, de manière non significative, dans les lésions de la cohorte « Bénin (BM) » que dans celles de la cohorte B. Ceci semble soutenir l'hypothèse selon laquelle la réponse immunitaire en cas de développement tumoral malin altère le système immunitaire en général, et notamment la surveillance immunitaire vis-à-vis d'autres développements tumoraux simultanés, même bénins, vers une réponse plus favorable au développement tumoral.

Nous admettons que ces résultats ne sont pas de nature à modifier la prise en charge thérapeutique des chiennes, qui présentent des tumeurs mammaires malignes, qui continueront à être traitées par exérèse totale de la chaîne mammaire. Cependant, nos résultats suggèrent que le système immunitaire est altéré à distance des tumeurs malignes. Nous pouvons supposer que cette altération de l'immunité joue un rôle dans le risque accru de développement tumoral chez des animaux ayant déjà présenté des tumeurs par le passé (bien que l'effet de l'exposition à divers facteurs de risque soit impossible à exclure). Dans ce sens, l'exérèse des deux chaînes mammaires ou une recommandation de traitement par chirurgie et chimiothérapie pourraient être proposée plus fréquemment pour les chiennes présentant de multiples foyers tumoraux. La comparaison des cellules immunitaires circulantes chez les chiennes présentant des tumeurs bénignes ou des tumeurs bénignes associées à des tumeurs malignes permettrait de confirmer nos résultats. Bien sûr, un autre résultat d'intérêt serait la caractérisation des infiltrats de tumeurs mammaires malignes se développant seules. Une altération de l'infiltrat immunitaire due au développement multifocal de tumeurs malignes et bénignes pourrait avoir un impact sur le pronostic et être prise en compte dans les thérapies proposées.

Enfin, un dernier résultat novateur de notre étude est l'étude de la fréquence des TLS selon la malignité. On notera qu'à l'initiation de notre étude, les TLS n'avaient jamais été caractérisés chez le chien. En 2022, Giambrone *et al* ont identifié ces structures comme des structures lymphoïdes concentriques présentant une zone B (enrichie en

CD20⁺ et produisant des IgG) entourée d'une zone T, et vascularisée par des HEVs (101). Notre étude reproduit cette répartition en zones B et T, vascularisées par des HEVs, et **démontre la corrélation de ces structures avec la malignité. Nous démontrons également l'enrichissement de ces structures en lymphocytes T CD8⁺, et non en Tregs.**

On notera que les structures TLS observées dans deux cas de la cohorte S étaient de taille extrêmement réduite comparée aux structures TLS des autres cohortes. Nous avons considéré que ces structures étaient anecdotiques, et que l'étude de leur composition n'apporterait pas d'information significative.

Nous n'avons pas non plus étudié la composition des TLS séparément dans chaque cohorte. Pourtant, une tendance à l'appauvrissement des TLS en Tregs semble présente dans la cohorte « Malin (BM) » spécifiquement. Une réanalyse de la nature de l'infiltrat dans les zones TLS pour l'ensemble des cas présentant des TLS dans chaque cohorte présenterait un net intérêt (par opposition aux 9 cas sélectionnés ici).

Nous complétons ici les informations apportées par Giambone *et al* en identifiant ces TLS pour la première fois dans le stroma de tumeurs mammaires canins bénignes, et démontrant de manière formelle que **la proportion de TLS augmente significativement dans les tumeurs malignes comparée aux tumeurs bénignes (Figure 13A).**

Nos résultats sont ambigus : la corrélation à la malignité pourrait révéler un mauvais pronostic de ces structures, mais leur enrichissement en lymphocytes T CD8⁺ pourrait être de bon pronostic. Préciser l'association de ces structures au pronostic nous semble un enjeu majeur pour la validation du modèle canin. Si la présence de TLS est une similarité entre chiennes et femmes développant des tumeurs mammaires, le pronostic associé à ces structures est chez la femme dépendant de la composition de ces TLS. L'absence de centres germinatifs dans les TLS dans notre cohorte nous laisse penser qu'il s'agit ici de TLS primaires, avec un moindre impact pronostique et une capacité moindre des lymphocytes B à produire des anticorps et un moindre impact pronostic (144), ce qui est cohérent avec une plus faible participation des lymphocytes B à l'immunité anti-tumorale. Chez les femmes présentant des cancers du sein, les TLS détectés peuvent présenter des centres germinatifs (TLS secondaires) qui sont associés à un bon pronostic (145).

L'approfondissement de ce travail avec une étude plus précise du pronostic des TLS serait extrêmement intéressant mais la petite taille de notre cohorte ne nous permet pas de réaliser ce travail. Pour pouvoir apporter ces réponses, les propriétaires des animaux inclus dans nos cohortes n'ayant pas donné leur consentement à l'utilisation de leurs données personnelles pour une telle étude, la constitution d'une nouvelle cohorte sera nécessaire. Il serait pertinent d'y inclure des chiennes présentant uniquement des tumeurs mammaires malignes, pour évaluer si le développement simultané de tumeurs bénignes impacte la réponse immunitaire aux tumeurs malignes (en comparaison à notre cohorte « Malin (BM) ») et pour avoir un regard d'ensemble sur le monitoring immunitaire des tumeurs malignes. Nous ne pouvons exclure que les tumeurs malignes isolées induisent une réponse immunitaire différente des points de vue de la composition et de l'organisation spatiale.

Ceci nous laisse supposer que ces structures jouent chez la chienne un rôle d'éducation des T CD8⁺ à la réponse anti-tumorale, mais ne sont pas à l'origine d'une réponse immunitaire exactement similaire à celle observée chez l'humain. Pour démontrer de manière formelle cette hypothèse, une étude spécifique du lien entre composition en lymphocytes T CD8⁺, FOXP3⁺, B et plasmocytes de ces structures et le pronostic associé serait nécessaire.

Nos résultats suggèrent pour l'instant que les tumeurs mammaires canines et humaines présentent des similarités importantes, tant au niveau de la nature et du phénotype que de l'organisation spatiale de l'infiltrat immunitaire, et apportent des premiers éléments de réponse sur la pertinence des approches immuno-thérapeutiques chez les chiennes présentant des tumeurs mammaires.

Notre étude semble également confirmer un rôle différent des lymphocytes B dans la surveillance immunitaire des tumeurs mammaires canines et humaines, avec une organisation en TLS enrichis en lymphocytes T CD8⁺ mais ne présentant pas de centres germinatifs, et donc possiblement moins aptes à la réponse immunitaire anti-tumorale chez le chien.

L'exploration plus approfondie du phénotype des lymphocytes T, de la composition des TLS et de l'association des différents infiltrats avec le pronostic semble cependant nécessaire pour pouvoir conclure sur la pertinence du modèle canin et transposer des immunothérapies actuellement envisagées en médecine humaine vers la médecine vétérinaire.

CONCLUSION

Ce projet de recherche avait pour objectif de faire une première évaluation de l'applicabilité de protocoles d'immunothérapies utilisés en médecine humaine au traitement des carcinomes mammaires simples de haut grade de la chienne, en identifiant et comparant l'infiltrat immunitaire présent chez la chienne par rapport à celui décrit dans les cancers du sein de la femme.

Notre travail a permis de valider, au moins partiellement, l'utilisation chez le chien d'anticorps permettant d'identifier en cytométrie en flux, les récepteurs CCR4 (marqueur des lymphocytes Treg et Th2), CCR8 (marqueur des lymphocytes Treg), TIGIT (point de contrôle inhibiteur de la réponse immunitaire) et TIM3 (point de contrôle inhibiteur de la réponse immunitaire).

La surexpression, bien que non significative à l'échelle de la taille des populations que nous avons testées, de PD-1 et de CCR4 par les lymphocytes T CD8⁺ de l'environnement tumoral des CMT analysés suggère que les immunothérapies anti-PD-1 et anti-CCR4, déjà testées en essais cliniques chez des chiens atteints d'autres types de cancers, pourraient également présenter un intérêt pour le traitement des CMT de haut grade.

L'étude rétrospective menée sur des coupes de tissu mammaire de chienne (saine, porteuse de tumeur bénigne seule ou de tumeur bénigne et maligne) a permis d'observer que l'organisation spatiale de l'infiltrat immunitaire des CMT semble assez similaire à celle de l'infiltrat du cancer du sein de la femme. On observe en particulier des TLS primaires enrichis en lymphocytes T CD8⁺. Cependant, le rôle des lymphocytes B, très nombreux dans le stroma et le parenchyme des territoires à plus forte malignité de la chienne, semble dans le cadre de la surveillance immunitaire des CMT différent de ce qui est observé chez la femme.

Nous avons aussi mis en évidence l'impact significatif du développement simultané de tumeurs bénignes et malignes sur la composition de l'infiltrat immunitaire des tumeurs bénignes, et donc établi une preuve de concept de l'importance de la prise en compte des développements tumoraux simultanés dans les études ultérieures. Enfin, notre étude n'a pas permis une application optimale des techniques d'analyses automatisées actuellement utilisées en recherche humaine, application qui demandera probablement une attention particulière, un temps relativement long et une prise en compte des spécificités du tissu mammaire canin et la constitution de cohortes très homogènes.

Nous pouvons donc conclure que l'utilisation d'immunothérapies pour traiter des CMT de haut grade semble pertinente, mais que l'utilisation des CMT comme modèle du cancer du sein devra prendre en compte certaines spécificités du modèle canin.

BIBLIOGRAPHIE

1. KENT, M. S. et al. (2018). Association of cancer-related mortality, age and gonadectomy in golden retriever dogs at a veterinary academic center (1989-2016). [en ligne] *PLOS ONE*. 13, (2). Disponible sur : <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0192578> [consulté le 23 octobre 2023].
2. VASCELLARI, M. et al. (2009). Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. [en ligne] *BMC Veterinary Research*. 5, pp. 39. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2763881/> [consulté le 25 octobre 2023].
3. AUPPERLE-LELLBACH, H. et al. (2022). Tumour Incidence in Dogs in Germany: a Retrospective Analysis of 109,616 Histopathological Diagnoses (2014-2019). *Journal of Comparative Pathology*. 198, pp. 33-55.
4. CHOCTEAU, F. et al. (2021). One-year conditional survival of dogs and cats with invasive mammary carcinomas: A concept inspired from human breast cancer. [en ligne] *Veterinary and Comparative Oncology*. 19, (1), pp. 140-151. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7891631/> [consulté le 20 octobre 2023].
5. RASOTTO, R. et al. (2017). Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. [en ligne] *Veterinary Pathology*. 54, (4), pp. 571-578. Disponible sur : https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985817698208?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed [consulté le 1 novembre 2023].
6. ZAPULLI, V. et al. (2019). *Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals Volume 2: Volume 2: Mammary Tumors: Mammary Tumors*. . Davis Thompson Foundation,
7. PAPAOGLOU, L. G. et al. (2014). Current Surgical Options for Mammary Tumor Removal in Dogs. [en ligne] *Journal of Veterinary Science & Medicine*. 2, (1). Disponible sur : <https://www.avensonline.org/fulltextarticles/jvsm-2325-4645-02-0007.html> [consulté le 1 novembre 2022].
8. PATSIKAS, M. N. et al. (2006). The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. [en ligne] *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 35, (4), pp. 228-234. Disponible sur : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0264.2005.00664.x> [consulté le 1 novembre 2023].
9. FERREIRA, T. et al. (2023). Mammary Glands of Women, Female Dogs and Female Rats: Similarities and Differences to Be Considered in Breast Cancer Research. [en ligne] *Veterinary Sciences*. 10, (6), pp. 379. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10303014/> [consulté le 1 novembre 2023].
10. CHANDRA, S. A., CLINE, M. J. et ADLER, R. R. (2010). Cyclic morphological changes in the beagle mammary gland. *Toxicologic Pathology*. 38, (6), pp. 969-983.
11. ATASHGARAN, V. et al. (2016). Dissecting the Biology of Menstrual Cycle-Associated Breast Cancer Risk. [en ligne] *Frontiers in Oncology*. 6, pp. 267. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5183603/> [consulté le 1 novembre 2022].

12. CONCANNON, P. W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. [en ligne] *Animal Reproduction Science*. 124, (3), pp. 200-210. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432010004124> [consulté le 25 octobre 2023].
13. SANTOS, M., MARCOS, R. et FAUSTINO, A. (2010). Histological Study of Canine Mammary Gland During the Oestrous Cycle. [en ligne] *Reproduction in Domestic Animals*. 45, (5), pp. e146-e154. Disponible sur : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0531.2009.01536.x> [consulté le 31 octobre 2023].
14. ARRUVITO, L. et al. (2007). Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. [en ligne] *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 178, (4), pp. 2572-2578. Disponible sur : <https://journals.aai.org/jimmunol/article/178/4/2572/75426/Expansion-of-CD4-CD25-and-FOXP3-Regulatory-T-Cells> [consulté le 1 novembre 2023].
15. CHUA, A. C. L. et al. (2010). Dual roles for macrophages in ovarian cycle-associated development and remodelling of the mammary gland epithelium. [en ligne] *Development (Cambridge, England)*. 137, (24), pp. 4229-4238. Disponible sur : <https://journals.biologists.com/dev/article/137/24/4229/44088/Dual-roles-for-macrophages-in-ovarian-cycle> [consulté le 1 novembre 2023].
16. MITCHELL, L et al. (1974). Mammary tumors in dogs: survey of clinical and pathological characteristics. [en ligne] *The Canadian Veterinary Journal*. 15, (5), pp. 131-138. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1696500/> [consulté le 20 octobre 2023].
17. DORN, C. R. et al. (1968). Survey of Animal Neoplasms In Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer Morbidity in Dogs and Cats From Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute*. 40, (2), pp. 307-318.
18. BAIONI, E. et al. (2017). Estimating canine cancer incidence: findings from a population-based tumour registry in northwestern Italy. [en ligne] *BMC Veterinary Research*. 13, pp. 203. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5490209/> [consulté le 1 novembre 2023].
19. SLEECKX, N. et al. (2011). Canine mammary tumours, an overview. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. 46, (6), pp. 1112-1131.
20. BOSTOCK, D.E. (1986). Canine and feline mammary neoplasms. *British Veterinary Journal*. 142, (6), pp. 506-515.
21. SORENMO, K. U. et al. (2009). Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and Comparative Oncology*. 7,(3), pp. 162-172.
22. HAMY, A.-S. et al. (2023). Evolution of synchronous female bilateral breast cancers and response to treatment. [en ligne] *Nature Medicine*. 29, (3), pp. 646-655. Disponible sur : <https://www.nature.com/articles/s41591-023-02216-8> [consulté le 1 novembre 2023].
23. ONISÂI, M. et al. (2020). Synchronous Multiple Breast Cancers—Do We Need to Reshape Staging? [en ligne] *Medicina*. 56, (5), pp. 230. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7279247/> [consulté le 1 novembre 2023].

24. LYNCH, S. P. et al. (2012). Multifocality and multicentricity in breast cancer and survival outcomes. [en ligne] *Annals of Oncology*. 23, (12), pp. 3063-3069. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3501230/> [consulté le 23 octobre 2023].
25. PASTOR, N. et al. (2018). Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. [en ligne] *Austral journal of veterinary sciences*. 50, (3), pp. 143-147. Disponible sur : <https://www.scielo.cl/pdf/australjvs/v50n3/0719-8132-australjvs-50-03-00143.pdf> [consulté le 25 octobre 2023].
26. SCHNEIDER, R., DORN, C. R. et TAYLOR, D. O. (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute*. 43, (6), pp. 1249-1261.
27. TORRES, C. G., ITURRIAGA, M. P. et CRUZ, P. (2021). Hormonal Carcinogenesis in Canine Mammary Cancer: Molecular Mechanisms of Estradiol Involved in Malignant Progression. [en ligne] *Animals: an open access journal from MDPI*. 11, (3), pp. 608. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7996861/> [consulté le 1 novembre 2023].
28. ROMAGNOLI, S. (2009). An Update on Pseudopregnancy. [en ligne] *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings*. Disponible sur : <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?id=4252731&pid=11290&print=1> [consulté le 1 novembre 2023].
29. MULLIGAN, R. M. (1975). Mammary cancer in the dog: a study of 120 cases. *American Journal of Veterinary Research*. 36, (9), pp. 1391-1396.
30. CLAVEL-CHAPELON, F. et GERBER, M. (2002). Reproductive factors and breast cancer risk. Do they differ according to age at diagnosis? [en ligne] *Breast Cancer Research and Treatment*. 72, (2), pp. 107-115. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1925053/> [consulté le 31 octobre 2023].
31. LAMBE, M. et al. (1994). Transient Increase in the Risk of Breast Cancer after Giving Birth. [en ligne] *New England Journal of Medicine*. 331, (1), pp. 5-9. Disponible sur : <https://doi.org/10.1056/NEJM199407073310102> [consulté le 31 octobre 2023].
32. MOL, J. A. et al. (1997). The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*. 51, pp. 339-344.
33. KLEINBERG, D. L. et al. (2009). Growth hormone and insulin-like growth factor-I in the transition from normal mammary development to preneoplastic mammary lesions. *Endocrine Reviews*. 30, (1), pp. 51-74.
34. SALAS, Y. et al. (2015). Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. [en ligne] *PLoS ONE*. 10, (5), pp. e0127381. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4436381/> [consulté le 20 octobre 2023].
35. KIM, H.-W. et al. (2016). Breed- and age-related differences in canine mammary tumors. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. 80, (2), pp. 146-155.

36. EDMUNDS, G. et al. (2023). Associations Between Dog Breed and Clinical Features of Mammary Epithelial Neoplasia in Bitches: an Epidemiological Study of Submissions to a Single Diagnostic Pathology Centre Between 2008–2021. [en ligne] *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 28, (1), pp. 6. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10039094/> [consulté le 20 octobre 2023].
37. BRØNDEN, L. B. et al. (2010). Data from the Danish Veterinary Cancer Registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. [en ligne] *Veterinary Record*. 166, (19), pp. 586-590. Disponible sur : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1136/vr.b4808> [consulté le 20 octobre 2023].
38. STRATTON, M. R. et RAHMAN, N. (2008). The emerging landscape of breast cancer susceptibility. [en ligne] *Nature Genetics*. 40, (1), pp. 17-22. Disponible sur : <https://www.nature.com/articles/ng.2007.53> [consulté le 31 octobre 2023].
39. DE OLIVEIRA, J. R. et al. (2022). Liquid biopsy can detect BRCA2 gene variants in female dogs with mammary neoplasia. *Veterinary and Comparative Oncology*. 20, (1), pp. 164-171.
40. TESI, M. et al. (2020). Role of body condition score and adiponectin expression in the progression of canine mammary carcinomas. *Veterinary Medicine and Science*. 6, (3), pp. 265-271.
41. GRAY, M. et al. (2020). Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. [en ligne] *Frontiers in Oncology*. 10. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7198768/> [consulté le 1 novembre 2023].
42. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. What Are the Risk Factors for Breast Cancer? [en ligne] . (2023). Disponible sur : https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/risk_factors.htm [consulté le 25 octobre 2023].
43. MISDORP, W. (1988). Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *The Veterinary Quarterly*. 10, (1), pp. 26-33.
44. DIERSSEN-SOTOS, T. et al. (2018). Reproductive risk factors in breast cancer and genetic hormonal pathways: a gene-environment interaction in the MCC-Spain project. [en ligne] *BMC Cancer*. 18, (1), pp. 280. Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4182-3> [consulté le 25 octobre 2023].
45. HEIKKINEN, S. et al. (2016). Use of exogenous hormones and the risk of breast cancer: results from self-reported survey data with validity assessment. [en ligne] *Cancer Causes & Control*. 27, (2), pp. 249-258. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s10552-015-0702-5> [consulté le 25 octobre 2023].
46. EASTON, D. F., FORD, D. et BISHOP, D. T. (1995). Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. [en ligne] *American Journal of Human Genetics*. 56, (1), pp. 265-271. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1801337/> [consulté le 25 octobre 2023].
47. LIM, H.-Y. et al. (2015). Effects of Obesity and Obesity-Related Molecules on Canine Mammary Gland Tumors. [en ligne] *Veterinary Pathology*. 52, (6), pp. 1045-1051. Disponible sur : <https://doi.org/10.1177/0300985815579994> [consulté le 25 octobre 2023].

48. LAUBY-SECRETAN, B. et al. (2016). Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. [en ligne] *The New England journal of medicine*. 375, (8), pp. 794-798. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6754861/> [consulté le 25 octobre 2023].
49. PEÑA, L. (2013). Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Veterinary Pathology*. 50, (1), pp. 94-105.
50. THEILEN, G. H. et MADEWELL, B. R. (1987). *Veterinary Cancer Medicine*. Philadelphia : *Lea&Febiger*.
51. MOON, C.-H. et al. (2022). Assessment of prognostic factors in dogs with mammary gland tumors: 60 cases (2014-2020). [en ligne] *Korean Journal of Veterinary Research*. 62, (1). Disponible sur : <http://kjvr.org/journal/view.php?doi=10.14405/kjvr.20210046> [consulté le 1 novembre 2023].
52. BABA, A. I. et CĂTOI, C. (2007). *Comparative Oncology*. Bucharest : *The Publishing House of the Romanian Academy*.
53. PÉREZ ALENZA, M. D., TABANERA, E. et PEÑA, L. (2001). Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 219, (8), pp. 1110-1114.
54. SWAMINATHAN, H., SARAVANAMURALI, K. et YADAV, S. A. (2023). Extensive review on breast cancer its etiology, progression, prognostic markers, and treatment. [en ligne] *Medical Oncology*. 40, (8), pp. 238. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02111-9> [consulté le 25 octobre 2023].
55. VALDIVIA, G. et al. (2021). From Conventional to Precision Therapy in Canine Mammary Cancer: A Comprehensive Review. [en ligne] *Frontiers in Veterinary Science*. 8. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7925635/> [consulté le 1 novembre 2023].
56. ONITILLO, A. A. et al. (2009). Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. [en ligne] *Clinical Medicine & Research*. 7, (1-2), pp. 4-13. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2705275/> [consulté le 25 octobre 2023].
57. WATSON, J. et al. (2023). Human basal-like breast cancer is represented by one of the two mammary tumor subtypes in dogs. [en ligne] *Breast Cancer Research : BCR*. 25, pp. 114. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10546663/> [consulté le 25 octobre 2023].
58. LIU, J. P. et al. (2023). Nomogram predicting overall prognosis for invasive micropapillary carcinoma of the breast: a SEER-based population study. [en ligne] *BMJ Open*. 13, (8). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10407354/> [consulté le 25 octobre 2023].
59. OLFATBAKSH, A. et al. (2022). Long-term Survival and Prognostic Factors of Breast Cancer. *Archives of Iranian Medicine*. 25, (9), pp. 609-616.
60. KHOURY, T. et al. (2018). The role of skin ulceration in breast carcinoma staging and outcome. *The Breast Journal*. 24, (1), pp. 41-50.
61. SEUNG, B.-J. et al. (2021). Impact of Histological Subtype on Survival in Canine Mammary Carcinomas: a Retrospective Analysis of 155 Cases. [en ligne] *Journal of Comparative Pathology*. 186, pp. 23-30. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997521000608> [consulté le 20 octobre 2023].

62. WAI, E. S. et al. (2011). Predictors of Local Recurrence in a Population-Based Cohort of Women with Ductal Carcinoma In Situ Treated with Breast Conserving Surgery Alone. [en ligne] *Annals of Surgical Oncology*. 18, (1), pp. 119-124. Disponible sur : <https://doi.org/10.1245/s10434-010-1214-x> [consulté le 25 octobre 2023].
63. XU, C. et al. (2021). Adenosquamous carcinoma of the breast: a population-based study. [en ligne] *Breast Cancer (Tokyo, Japan)*. 28, (4), pp. 848-858. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8213591/> [consulté le 25 octobre 2023].
64. WU, S.-G. et al. (2020). The longitudinal risk of mortality between invasive ductal carcinoma and metaplastic breast carcinoma. [en ligne] *Scientific Reports*. 10, (1). Disponible sur : <https://www.nature.com/articles/s41598-020-79166-5> [consulté le 25 octobre 2023].
65. XU, F. et al. (2016). Clinicopathological and prognostic significance of COX-2 immunohistochemical expression in breast cancer: a meta-analysis. [en ligne] *Oncotarget*. 8, (4), pp. 6003-6012. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5351608/> [consulté le 25 octobre 2023].
66. STUART-HARRIS, R. et al. (2008). Proliferation markers and survival in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. [en ligne] *The Breast*. 17, (4), pp. 323-334. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960977608000593> [consulté le 25 octobre 2023].
67. PROTANI, M., COORY, M. et MARTIN, J. H. (2010). Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. [en ligne] *Breast Cancer Research and Treatment*. 123, (3), pp. 627-635. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0990-0> [consulté le 25 octobre 2023].
68. ESTRELA-LIMA, A. et al. (2010). Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. [en ligne] *BMC Cancer*. 10, pp. 256. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2894795/> [consulté le 1 novembre 2023].
69. GUPTA, S. et al. (2007). Intratumoral FOXP3 expression in infiltrating breast carcinoma: Its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*. 46, (6), pp. 792-797.
70. MANTOVANI, A. et al. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. [en ligne] *Trends in Immunology*. 23, (11), pp. 549-555. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com.proxy.insermbiblio.inist.fr/science/article/pii/S1471490602023025?via%3Dihub> [consulté le 1 novembre 2023].
71. SOUSA, S. et al. (2015). Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast cancer research: BCR*. 17, (1), pp. 101.
72. EGELSTON, C. A. et al. (2019). Resident memory CD8+ T cells within cancer islands mediate survival in breast cancer patients. [en ligne] *JCI insight*. 4, (19). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6795408/> [consulté le 1 novembre 2023].

73. SZPOR, J. et al. (2021). Dendritic Cells Are Associated with Prognosis and Survival in Breast Cancer. [en ligne] *Diagnostics (Basel, Switzerland)*. 11, (4), pp. 702. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8070803/> [consulté le 1 novembre 2023].
74. HARRIS, R. J. et al. (2021). Tumor-Infiltrating B Lymphocyte Profiling Identifies IgG-Biased, Clonally Expanded Prognostic Phenotypes in Triple-Negative Breast Cancer. [en ligne] *Cancer Research*. 81, (16), pp. 4290-4304. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7611538/> [consulté le 1 novembre 2023].
75. GOBERT, M. et al. (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. [en ligne] *Cancer Research*. 69, (5), pp. 2000-2009. Disponible sur : <https://aacrjournals.org/cancerres/article/69/5/2000/552848/Regulatory-T-Cells-Recruited-through-CCL22-CCR4> [consulté le 1 novembre 2023].
76. CHA, Y. J. et KOO, J. S. (2020). Role of Tumor-Associated Myeloid Cells in Breast Cancer. [en ligne] *Cells*. 9, (8), pp. 1785. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7464644/> [consulté le 20 octobre 2023].
77. WANG, N. et al. (2018). CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF- κ B/SOX4 signaling. [en ligne] *Cell Death & Disease*. 9, (9), pp. 880. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6115425/> [consulté le 31 octobre 2023].
78. WANG, C. et al. (2023). YAP/STAT3 inhibited CD8+ T cells activity in the breast cancer immune microenvironment by inducing M2 polarization of tumor-associated macrophages. [en ligne] *Cancer Medicine*. 12, (15), pp. 16295-16309. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10469732/> [consulté le 1 novembre 2023].
79. CHOW, L. et al. (2022). Canine polarized macrophages express distinct functional and transcriptomic profiles. [en ligne] *Frontiers in Veterinary Science*. 9. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9663804/> [consulté le 20 octobre 2023].
80. SFACTERIA, A. et al. (2021). Immune Cells and Immunoglobulin Expression in the Mammary Gland Tumors of Dog. [en ligne] *Animals: an open access journal from MDPI*. 11, (5), pp. 1189. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8143349/> [consulté le 1 novembre 2023].
81. LIM, H.-Y. et al. (2022). Canine mammary cancer in overweight or obese female dogs is associated with intratumoral microvessel density and macrophage counts. [en ligne] *Veterinary Pathology*. 59, (1), pp. 5-174. Disponible sur : <https://journals.sagepub.com/doi/epub/10.1177/03009858211040481> [consulté le 20 octobre 2023].
82. PARISI, F. et al. (2021). M1 and M2 tumour-associated macrophages subsets in canine malignant mammary tumours: An immunohistochemical study. [en ligne] *Research in Veterinary Science*. 136, pp. 32-38. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528821000436?via%3Dihub> [consulté le 1 novembre 2023].

83. MONTEIRO, L. N. et al. (2018). Tumour-associated macrophages: Relation with progression and invasiveness, and assessment of M1/M2 macrophages in canine mammary tumours. [en ligne] *Veterinary Journal (London, England: 1997)*. 234, pp. 119-125. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023318300571?via%3Dihub> [consulté le 1 novembre 2023].
84. TSUJITANI, S. et al. (1987). Langerhans cells and prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer*. 59, (3), pp. 501-505.
85. SABA, Y. et al. (2022). Early antitumor activity of oral Langerhans cells is compromised by a carcinogen. [en ligne] *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 119, (3). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8784117/> [consulté le 12 octobre 2023].
86. KINDT, N. et al. (2016). Langerhans cell number is a strong and independent prognostic factor for head and neck squamous cell carcinomas. [en ligne] *Oral Oncology*. 62, pp. 1-10. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368837516301440> [consulté le 23 octobre 2023].
87. PORCELLATO, I. et al. (2021). FoxP3, CTLA-4, and IDO in Canine Melanocytic Tumors. [en ligne] *Veterinary Pathology*. 58, (1), pp. 42-52. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023318300571?via%3Dihub> [consulté le 1 novembre 2023].
88. SISIRAK, V. et al. (2012). Impaired IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. [en ligne] *Cancer Research*. 72, (20), pp. 5188-5197. Disponible sur : <https://aacrjournals.org/cancerres/article/72/20/5188/576574/Impaired-IFN-Production-by-Plasmacytoid-Dendritic>
89. BINNEWIES, M. et al. (2019). Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4+ T Cell Immunity. [en ligne] *Cell*. 177, (3), pp. 556-571. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867419301540> [consulté le 31 octobre 2023].
90. SALMON, H. et al. (2016). Expansion and Activation of CD103+ Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. [en ligne] *Immunity*. 44, (4), pp. 924-938. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761316301017> [consulté le 31 octobre 2023].
91. MUCHA, J. et al. (2016). Immunosuppression in Dogs During Mammary Cancer Development. [en ligne] *Veterinary Pathology*. 53, (6), pp. 1147-1153. Disponible sur : https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985816634808?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed [consulté le 1 novembre 2023].
92. LEI, M. M. L. et LEE, T. K. W. (2021). Cancer Stem Cells: Emerging Key Players in Immune Evasion of Cancers. [en ligne] *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9. Disponible sur : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.692940> [consulté le 1 novembre 2023].
93. WU, Y. et al. (2019). Phenotypic characterisation of regulatory T cells in dogs reveals signature transcripts conserved in humans and mice. [en ligne] *Scientific Reports*. 9, (1). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6748983/> [consulté le 1 novembre 2023].

94. CINIÉR, J. et al. (2021). Recruitment and Expansion of Tregs Cells in the Tumor Environment-How to Target Them? [en ligne] *Cancers*. 13, (8). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8069615/> [consulté le 1 novembre 2023].
95. CARVALHO, M. I. et al. (2016). Intratumoral FoxP3 expression is associated with angiogenesis and prognosis in malignant canine mammary tumors. [en ligne] *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 178, pp. 1-9. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242716301155> [consulté le 1 novembre 2023].
96. SAKAI, K. et al. (2018). Association of tumour-infiltrating regulatory T cells with adverse outcomes in dogs with malignant tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*. 16, (3), pp. 330-336.
97. MAEDA, S. et al. (2020). Foxp3+ Regulatory T Cells Associated With CCL17/CCR4 Expression in Carcinomas of Dogs. *Veterinary Pathology*. 57, (4), pp. 497-506.
98. WHITESIDE, T. L. (2014). Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? [en ligne] *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. 63, (1), pp. 67-72. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3888225/> [consulté le 1 novembre 2023].
99. ISLAM, S. A. et al. (2013). Identification of human CCR8 as a CCL18 receptor. [en ligne] *The Journal of Experimental Medicine*. 210, (10), pp. 1889-1898. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3782048/> [consulté le 1 novembre 2023].
100. MAEDA, S. et al. (2022). Anti-CCR4 treatment depletes regulatory T cells and leads to clinical activity in a canine model of advanced prostate cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 10, (2).
101. GIAMBRONE, G. et al. (2022). Does TLS Exist in Canine Mammary Gland Tumours? Preliminary Results in Simple Carcinomas. [en ligne] *Veterinary Sciences*. 9, (11), pp. 628. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9697810/> [consulté le 16 octobre 2023].
102. KURODA, H. et al. (2021). Tumor-infiltrating B cells and T cells correlate with postoperative prognosis in triple-negative carcinoma of the breast. [en ligne] *BMC Cancer*. 21, pp. 286. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7968181/> [consulté le 31 octobre 2023].
103. MARTINET, L. et al. (2011). Human Solid Tumors Contain High Endothelial Venules: Association with T- and B-Lymphocyte Infiltration and Favorable Prognosis in Breast Cancer. [en ligne] *Cancer Research*. 71, (17), pp. 5678-5687. Disponible sur : <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0431> [consulté le 31 octobre 2023].
104. DIEU-NOSJEAN, M.-C. et al. (2008). Long-Term Survival for Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer With Intratumoral Lymphoid Structures. [en ligne] *Journal of Clinical Oncology*. 26, (27), pp. 4410-4417. Disponible sur : <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2007.15.0284> [consulté le 31 octobre 2023].
105. KROEGER, D. R., MILNE, K. et NELSON, B. H. (2016). Tumor-Infiltrating Plasma Cells Are Associated with Tertiary Lymphoid Structures, Cytolytic T-Cell Responses, and Superior Prognosis in Ovarian Cancer. [en ligne] *Clinical Cancer Research*. 22, (12), pp. 3005-3015. Disponible sur : <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2762> [consulté le 31 octobre 2023].

106. GARCÍA-HERNÁNDEZ, M. L. et al. (2017). A Unique Cellular and Molecular Microenvironment Is Present in Tertiary Lymphoid Organs of Patients with Spontaneous Prostate Cancer Regression. [en ligne] *Frontiers in Immunology*. 8, pp. 563. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5434117/> [consulté le 1 novembre 2023].
107. JACQUELOT, N. et al. (2021). Tertiary lymphoid structures and B lymphocytes in cancer prognosis and response to immunotherapies. [en ligne] *Oncoimmunology*. 10, (1). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8018489/> [consulté le 31 octobre 2023].
108. POSCH, F. et al. (2017). Maturation of tertiary lymphoid structures and recurrence of stage II and III colorectal cancer. [en ligne] *Oncoimmunology*. 7, (2). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5798199/> [consulté le 31 octobre 2023].
109. GOLDSCHMIDT, M. et al. (2011). Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. [en ligne] *Veterinary Pathology*. 48, (1), pp. 117-131. Disponible sur : <https://doi.org/10.1177/0300985810393258> [consulté le 24 octobre 2023].
110. GUTMAN, H. et al. (1995). Biologic distinctions and therapeutic implications of sarcomatoid metaplasia of epithelial carcinoma of the breast. *Journal of the American College of Surgeons*. 180, (2), pp. 193-199.
111. NUNES, F. C. et al. (2018). Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. [en ligne] *Veterinary and Animal Science*. 7. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7386670/> [consulté le 20 octobre 2023].
112. DE CAMPOS, C. B. et al. (2018). Adjuvant Thalidomide and Metronomic Chemotherapy for the Treatment of Canine Malignant Mammary Gland Neoplasms. [en ligne] *In Vivo (Athens, Greece)*. 32, (6), pp. 1659-1666. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6365760/> [consulté le 1 novembre 2023].
113. ARENAS, C. et al. (2016). Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case-control prospective study. *The Veterinary Record*. 179, (5), pp. 125.
114. AMERICAN CANCER SOCIETY. Treatment of Triple-negative Breast Cancer | Treatment of TNBC. [en ligne] . Disponible sur : <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/treatment-of-triple-negative.html> [consulté le 23 octobre 2023].
115. CORTES, J. et al. (2020). Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. [en ligne] *The Lancet*. 396, (10265), pp. 1817-1828. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673620325319> [consulté le 31 octobre 2023].
116. INSERM. Immunothérapie des cancers · Inserm, La science pour la santé. [en ligne] *Inserm*. Disponible sur : <https://www.inserm.fr/dossier/immunotherapie-cancers/> [consulté le 23 octobre 2023].
117. SCHMID, P. et al. (2022). Event-free Survival with Pembrolizumab in Early Triple-Negative Breast Cancer. [en ligne] *New England Journal of Medicine*. 386, (6), pp. 556-567. Disponible sur : <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2112651> [consulté le 25 octobre 2023].

118. KASZAK, I. et al. (2018). Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 60, (1), pp. 66.
119. COY, J. et al. (2017). PD-1 expression by canine T cells and functional effects of PD-1 blockade. *Veterinary and Comparative Oncology*. 15, (4), pp. 1487-1502.
120. TAGAWA, M. et al. (2018). Evaluation of costimulatory molecules in dogs with B cell high grade lymphoma. [en ligne] *PloS One*. 13, (7). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6057677/> [consulté le 1 novembre 2023].
121. IGASE, M. et al. (2020). A pilot clinical study of the therapeutic antibody against canine PD-1 for advanced spontaneous cancers in dogs. [en ligne] *Scientific Reports*. 10, (1). Disponible sur : <https://www.nature.com/articles/s41598-020-75533-4> [consulté le 1 novembre 2023].
Bandiera_abtest: aCc_license_type: cc_byCg_type: Nature Research Journalsnumber: 1Primary_atype: Researchpublisher: Nature Publishing GroupSubject_term: Cancer models;Cancer therapySubject_term_id: cancer-models;cancer-therapy
122. IGASE, M. et al. (2022). Long-term survival of dogs with stage 4 oral malignant melanoma treated with anti-canine PD-1 therapeutic antibody: A follow-up case report. [en ligne] *Veterinary and Comparative Oncology*. 20, (4), pp. 901-905. Disponible sur : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vco.12829> [consulté le 25 octobre 2023].
123. MAEDA, S. et al. (2019). CCR4 Blockade Depletes Regulatory T Cells and Prolongs Survival in a Canine Model of Bladder Cancer. [en ligne] *Cancer Immunology Research*. 7, (7), pp. 1175-1187. Disponible sur : <https://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/7/7/1175> [consulté le 1 novembre 2023].
124. PURI, M. et al. (2019). Automated Computational Detection, Quantitation, and Mapping of Mitosis in Whole-Slide Images for Clinically Actionable Surgical Pathology Decision Support. [en ligne] *Journal of Pathology Informatics*. 10, pp. 4. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6396430/> [consulté le 1 novembre 2023].
125. BERTRAM, C. A. et al. (2022). Computer-assisted mitotic count using a deep learning-based algorithm improves interobserver reproducibility and accuracy. [en ligne] *Veterinary Pathology*. 59, (2), pp. 211-226. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8928234/>
126. MARIOTTI, E. T., PREMANANDAN, C. et LORCH, G. (2014). Canine pulmonary adenocarcinoma tyrosine kinase receptor expression and phosphorylation. [en ligne] *BMC Veterinary Research*. 10, pp. 19. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3896673/> [consulté le 1 novembre 2023].
127. DAS, M., ZHU, C. et KUCHROO, Vijay K. (2017). Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. [en ligne] *Immunological Reviews*. 276, (1), pp. 97-111. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5512889/> [consulté le 1 novembre 2023].
128. AL-KHAN, A. A. et al. (2020). Parathyroid hormone receptor 1 (PTHr1) is a prognostic indicator in canine osteosarcoma. [en ligne] *Scientific Reports*. 10. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6994589/> [consulté le 1 novembre 2023].
129. LENZ, J. A. et al. (2022). Increased tumor infiltrating lymphocyte density is associated with favorable outcomes in a comparative study of canine histiocytic sarcoma. [en ligne] *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 71, (4), pp. 807-818. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8858331/> [consulté le 1 novembre 2023].

130. AMMONS, D. T. et al. (2022). Reprogramming the Canine Glioma Microenvironment with Tumor Vaccination plus Oral Losartan and Propranolol Induces Objective Responses. [en ligne] *Cancer Research Communications*. 2, (12), pp. 1657-1667. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9835010/> [consulté le 1 novembre 2023].
131. TAVARES, M. C. et al. (2021). A high CD8 to FOXP3 ratio in the tumor stroma and expression of PTEN in tumor cells are associated with improved survival in non-metastatic triple-negative breast carcinoma. [en ligne] *BMC cancer*. 21, (1), pp. 901. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8343973/> [consulté le 1 novembre 2023].
132. PLITAS, G. et al. (2016). Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer. [en ligne] *Immunity*. 45, (5), pp. 1122-1134. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5134901/> [consulté le 1 novembre 2023].
133. TERRANOVA-BARBERIO, M. et al. (2020). Exhausted T cell signature predicts immunotherapy response in ER-positive breast cancer. [en ligne] *Nature Communications*. 11. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7367885/> [consulté le 1 novembre 2023].
134. NEMOTO, Y. et al. (2018). Development and characterization of monoclonal antibodies against canine PD-1 and PD-L1. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 198, pp. 19-25.
135. PINARD, C. J. et al. (2022). Evaluation of PD-1 and PD-L1 expression in canine urothelial carcinoma cell lines. [en ligne] *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 243. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242721001859> [consulté le 31 octobre 2023].
136. DE SOUZA, T. L. et al. (2019). Pro-Cellular Exhaustion Markers are Associated with Splenic Microarchitecture Disorganization and Parasite Load in Dogs with Visceral Leishmaniasis. [en ligne] *Scientific Reports*. 9. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6736856/> [consulté le 31 octobre 2023].
137. MAEDA, Y. et al. (2021). Depletion of central memory CD8+ T cells might impede the antitumor therapeutic effect of Mogamulizumab. [en ligne] *Nature Communications*. 12. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8671535/> [consulté le 23 octobre 2023].
138. ZAHRAN, A. M. et al. (2022). Overexpression of PD-1 and CD39 in tumor-infiltrating lymphocytes compared with peripheral blood lymphocytes in triple-negative breast cancer. [en ligne] *PLoS ONE*. 17, (1). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8775239/> [consulté le 1 novembre 2023].
139. MOLLAVELIOGLU, B. et al. (2022). High co-expression of immune checkpoint receptors PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, and TIGIT on tumor-infiltrating lymphocytes in early-stage breast cancer. [en ligne] *World Journal of Surgical Oncology*. 20, (1), pp. 349. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9587596/> [consulté le 1 novembre 2023].
140. KIDANI, Y. et al. (2022). CCR8-targeted specific depletion of clonally expanded Treg cells in tumor tissues evokes potent tumor immunity with long-lasting memory. [en ligne] *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 119, (7). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8851483/> [consulté le 1 novembre 2023].

141. ROSSI, A. et al. (2022). Stromal and Immune Cell Dynamics in Tumor Associated Tertiary Lymphoid Structures and Anti-Tumor Immune Responses. [en ligne] *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 10, p. 933113. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9304551/> [consulté le 16 novembre 2023].
142. DE SOUZA, T. A. et al. (2018). Relationship between the inflammatory tumor microenvironment and different histologic types of canine mammary tumors. *Research in Veterinary Science*. 119, pp. 209-214.
143. VERMA, R. et al. (2020). Levels of different subtypes of tumour-infiltrating lymphocytes correlate with each other, with matched circulating lymphocytes, and with survival in breast cancer. [en ligne] *Breast Cancer Research and Treatment*. 183, (1), pp. 49-59. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7376517/> [consulté le 1 novembre 2023].
144. SILIŃA, K. et al. (2018). Germinal Centers Determine the Prognostic Relevance of Tertiary Lymphoid Structures and Are Impaired by Corticosteroids in Lung Squamous Cell Carcinoma. [en ligne] *Cancer Research*. 78, (5), pp. 1308-1320. Disponible sur : <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1987> [consulté le 2 novembre 2023].
145. WANG, Q. et al. (2023). Single-cell transcriptome sequencing of B-cell heterogeneity and tertiary lymphoid structure predicts breast cancer prognosis and neoadjuvant therapy efficacy. [en ligne] *Clinical and Translational Medicine*. 13, (8). Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10390819/> [consulté le 2 novembre 2023].

ANNEXES

Annexe I : Classification histologique de Goldschmidt et al

Néoplasies épithéliales malignes	
Carcinome in situ	
Carcinome simple	
	Tubulaire
	Tubulopapillaire
	Cystique papillaire
	Cribriforme
Carcinome micropapillaire invasif	
Carcinome solide	
Comédocarcinome	
Carcinome anaplastique	
Carcinome développé dans un adénome complexe ou une tumeur mixte	
Carcinome complexe	
Carcinome et myoépithéliome malin	
Carcinome mixte	
Carcinome canalaire	
Carcinome papillaire intracanaire	
Néoplasies épithéliales malignes – sous-types spéciaux	
Carcinome à cellules squameuses	
Carcinome adénosquameux	
Carcinome mucineux	
Carcinome riche en lipides	
Carcinome à cellules en fuseaux	
Myoépithéliome malin	
Carcinome à cellules squameuses – variante à cellules en fuseaux	
Carcinome – variante à cellules en fuseaux	
Carcinome inflammatoire	
Néoplasies mésoenchymateuses malignes - Sarcomes	
Ostéosarcome	
Chondrosarcome	
Fibrosarcome	
Hémangiosarcome	
Autres	
Tumeur mammaire mixte maline - Carcinosarcome	

Néoplasies bénignes	
Adénome simple	
Adénome papillaire intracanauxaire – papillome canalauxaire	
Adénome canalauxaire – adénome basaloïde	
Adénome avec différenciation squameuse	
Fibroadénome	
Myoépithéliome	
Adénome complexe - Adénomyoépithéliome	
Tumeur bénigne mixte	
Hyperplasies - Dysplasies	
Ectasie canalauxaire	
Hyperplasie lobulauxaire – Adénose	
Hyperplasie	
	Avec activité sécrétoire
	Avec fibrose interlobulauxaire
	Avec atypies
Epithéliose	
Papillomatose	
Transformation fibroadénomateuse	
Gynécomastie	
Néoplasies du téton	
Adénome	
Carcinome	
Carcinome avec infiltration épidermique	
Hyperplasies – Dysplasies du téton	
Mélanose cutanée	

CARACTERISATION DE L'INFILTRAT IMMUNITAIRE DES TUMEURS MAMMAIRES SIMPLES DE LA CHIENNE

Auteur

ETERRADOSSI Julia

Résumé

Nos résultats suggèrent que les immunothérapies anti-PD-1 et anti-CCR4 testées en essais cliniques chez des chiens atteints de divers types de cancers pourraient également présenter dans cette espèce un intérêt pour le traitement des carcinomes mammaires simples de haut grade. Nous avons également confirmé que l'infiltrat immunitaire de ces carcinomes s'organise en TLS enrichies en lymphocytes B et T CD8⁺ ne présentant pas de centre germinatif, et que le rôle des lymphocytes B dans la surveillance immunitaire de ces tumeurs semble différent de chez la femme. Nous avons mis en évidence l'impact significatif du développement simultané de tumeurs bénignes et malignes sur l'infiltrat immunitaire des tumeurs bénignes, et donc établi une preuve de concept de l'importance de la prise en compte des développements tumoraux simultanés dans les études ultérieures. Enfin, notre étude n'a pas permis une application optimale des techniques d'analyses automatisées, suggérant que leur mise en place demandera une prise en compte des spécificités du tissu mammaire canin et la constitution de cohortes très homogènes.

Mots-clés

Tumeurs mammaires canines, infiltrat immunitaire, immuno-histochimie, tumeurs multicentriques, structures lymphoïdes tertiaires, point de contrôle immunitaire, cytométrie en flux

Jury

Président du jury : Pr RAY-COQUARD Isabelle

Directeur de thèse : Pr MARCHAL Thierry

2ème assesseur : Dr ROSSET Emilie