

Table des matières

INTRODUCTION.....	5
-------------------	---

Première partie LE CANCER : MALADIE DU GENOME

I. DE LA CELLULE NORMALE A LA CELLULE CANCEREUSE.....	9
I.A <u>Cycle cellulaire et carcinogenèse.....</u>	10
I.A.1 Origine du cancer clinique et processus de cancérisation.....	10
I.A.2 La cinétique de l'expansion clonale.....	12
I.A.3 Rappels sur le cycle cellulaire.....	14
I.B <u>Les cibles et les acteurs de la carcinogenèse.....</u>	18
I.B.1 Interaction entre les événements géniques transformants.....	18
I.B.1.a Les oncogènes.....	19
I.B.1.b Les gènes suppresseurs de tumeurs.....	24
I.B.1.c Origine des mutations.....	26
I.B.2 Notion de stabilité du génome.....	28
I.C <u>L'immortalisation des cellules cancéreuses.....</u>	30
I.C.1 Le cycle des divisions cellulaires et la sénescence.....	30
I.C.2 Les télomères et la télomérase.....	32
I.C.3 Relation entre télomères, prolifération cellulaire et transformation tumorale.....	35
I.D <u>Le cancer : maladie génétique, monoclonale, multi-étapes et multi-factorielle.....</u>	38
II. LES TECHNIQUES D'ETUDE PERMETTANT L'ANALYSE DES ALTERATIONS GENETIQUES OBSERVEES DANS LES TUMEURS.....	43
II.A <u>Les prélèvements et la fixation des tumeurs.....</u>	43
II.B <u>Les aberrations chromosomiques.....</u>	45
II.B.1 Techniques d'observation des chromosomes.....	45
II.B.2 Etude quantitative de l'ADN.....	49
II.C <u>Les altérations des gènes.....</u>	51
II.C.1 Techniques moléculaires de base.....	51
II.C.2 Séquençage d'un gène.....	57
II.C.3 Techniques de précrééblage.....	58
II.C.4 Recherche simultanée de mutations dans plusieurs gènes.....	59
II.D <u>Mise en évidence des produits des gènes.....</u>	60
II.E <u>Recherche de gènes de prédisposition dans les formes familiales de cancer.....</u>	60
III. LES PRINCIPALES ANOMALIES GENETIQUES OBSERVEES DANS LES TUMEURS HUMAINES.....	63
III.A <u>Les aberrations chromosomiques.....</u>	63
III.B <u>Exemples de gènes impliqués dans la cancérogenèse.....</u>	67
III.B.1 Gènes suppresseurs de tumeurs.....	67
III.B.1.a Le gène <i>TP53</i>	67
III.B.1.b Les gènes <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i>	76
III.B.1.c Le gène <i>WAF1</i>	79
III.B.1.d Le gène <i>INK4</i>	80
III.B.1.e Le gène <i>RB1</i>	80
III.B.1.f Le gène <i>ATM</i>	80
III.B.1.g Le gène <i>PTEN</i>	81
III.B.1.h Le gène <i>CDH1</i>	82

III.B.2	Oncogènes.....	82
III.B.2.a	L'oncogène <i>c-erbB-2</i>	82
III.B.2.b	L'oncogène <i>c-kit</i>	83
III.B.2.c	L'oncogène <i>c-yes</i>	84
III.B.2.d	L'oncogène <i>c-myc</i>	85
III.B.2.e	Les oncogènes <i>ras</i>	87
III.B.2.f	L'oncogène <i>MDM2</i>	88
III.B.2.g	Les gènes des cyclines A et D1.....	89
III.B.3	Le gène <i>S100A4</i>	90

Deuxième partie
LES BASES MOLECULAIRES DES
TUMEURS MAMMAIRES DE LA CHIENNE

I. GENERALITES SUR LA MAMELLE NORMALE ET LES TUMEURS MAMMAIRES DE LA CHIENNE.....	95
I.A <u>Structure, anatomie et physiologie de la glande mammaire normale</u>	95
I.B <u>Classification des tumeurs mammaires</u>	99
I.C <u>Evolution des tumeurs mammaires</u>	103
II. ETIOLOGIE DES TUMEURS MAMMAIRES DE LA CHIENNE.....	105
II.A <u>Facteurs hormonaux</u>	105
II.B <u>Autres facteurs liés à la vie de reproduction</u>	110
II.C <u>Facteurs environnementaux</u>	110
II.D <u>Facteurs de prédisposition génétique ?</u>	112
III. LES ETUDES CYTOGENETIQUES ET MOLECULAIRES DES TUMEURS MAMMAIRES DE LA CHIENNE	118
III.A <u>Les techniques utilisées</u>	118
III.A.1 Etude des chromosomes.....	119
III.A.2 Caractérisation des gènes morbides.....	120
III.A.2.a Clonage et séquençage d'un gène canin.....	120
III.A.2.b Mise en évidence d'un gène canin correspondant au gène humain.....	120
III.A.2.c Recherche des mutations du gène.....	122
III.A.2.d Etude de l'expression du gène par l'analyse de son ARNm.....	122
III.A.2.e Expression du produit d'un gène	123
III.A.3 Etude de gènes inconnus	123
III.A.3.a La cartographie du génome.....	123
III.A.3.b L'étude de synténie entre le génome canin et les génomes des autres mammifères.....	126
III.B <u>Les résultats obtenus</u>	127
III.B.1 Par l'analyse caryotypique.....	127
III.B.2 Par l'analyse quantitative de l'ADN.....	132
III.B.3 Par la mise en évidence de l'hyperamplification des centrosomes.....	134
III.B.4 Par les études génétiques.....	134
III.B.4.a Le gène <i>TP53</i>	134
III.B.4.b Les gènes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> et <i>Rad 51</i>	148
III.B.4.c Le gène <i>CDH1</i>	150
III.B.4.d L'oncogène <i>c-erbB-2</i>	151
III.B.4.e L'oncogène <i>c-kit</i>	154
III.B.4.f L'oncogène <i>c-yes</i>	158

III.B.4.g	L'oncogène <i>c-myc</i>	162
III.B.4.h	Les oncogènes <i>ras</i>	162
III.B.4.i	L'oncogène <i>MDM2</i>	164
III.B.4.j	Les gènes des cyclines A et D1.....	164
III.B.4.k	Le gène <i>S100A4</i>	166
III.B.5	Par l'étude de la télomérase.....	166
III.C	<u>Bilan et analyse des résultats exposés</u>	172

**Troisième partie
DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

I.	VALIDITE DU MODELE CANIN EN ONCOLOGIE COMPAREE	189
II.	VALIDITE DES ETUDES EXPOSEES	195
II.A	<u>Le processus de cancérisation est-il identique chez l'Homme et le Chien ?</u>	195
II.B	<u>Les méthodes utilisées et les problèmes d'interprétation</u>	196
II.B.1	L'orientation des recherches.....	196
II.B.2	La technique immunohistochimique.....	196
II.B.3	Les techniques de biologie moléculaire.....	198
II.B.4	La mise en évidence de l'activité de la télomérase.....	200
III.	GENETIQUE MOLECULAIRE ET APPLICATIONS EN ONCOLOGIE HUMAINE	201
III.A	<u>Classification des tumeurs</u>	202
III.B	<u>Détermination de la susceptibilité</u>	203
III.B.1	Cancers familiaux.....	203
III.B.2	Cancers sporadiques.....	204
III.C	<u>Applications diagnostiques</u>	204
III.D	<u>Applications au dépistage</u>	206
III.E	<u>Applications pour le suivi clinique et le pronostic</u>	207
III.F	<u>Applications thérapeutiques</u>	210
III.F.1	Facteurs prédictifs de réponse thérapeutique.....	210
III.F.2	Nouvelles formes de thérapies.....	211
III.F.2.a	La thérapie génique	212
III.F.2.b	Inhibition des voies de signalisation intracellulaire.....	215
III.F.2.c	Inhibition de la télomérase.....	216
IV.	PERSPECTIVES D'APPLICATIONS PRATIQUES DE LA GENETIQUE MOLECULAIRE AUX TUMEURS MAMMAIRES DE LA CHIENNE	218
IV.A	<u>Vers une utilisation de nouvelles techniques diagnostiques des tumeurs mammaires de la chienne</u>	218
IV.B	<u>...ou de nouveaux facteurs pronostiques des tumeurs mammaires de la chienne ?</u>	220
IV.C	<u>Essais de thérapie génique appliquée aux tumeurs chez le Chien</u>	226
CONCLUSION	231	
Liste des figures.....	233	
Liste des tableaux.....	235	
Bibliographie.....	237	

INTRODUCTION

Grâce aux progrès de la médecine vétérinaire et à une plus forte médicalisation des animaux de compagnie, l'espérance de vie canine a doublé en l'espace d'une dizaine d'année. Alors que les accidents et les maladies infectieuses se révèlent être les causes majoritaires de décès pour les jeunes, les problèmes cardiaques et les cancers qui représentent la principale cause de décès du Chien s'observent principalement à partir de l'âge de 7 ans. On remarque ainsi un accroissement de l'incidence de la plupart des cancers en rapport avec l'augmentation de la population d'animaux âgés [283]. Suite au développement important des moyens d'investigation, les connaissances en oncologie animale ont beaucoup progressé ces dix dernières années jusqu'à atteindre un degré équivalent à celles de l'Homme. En particulier, d'un point de vue anatomo-pathologique, les techniques de diagnostic se sont affinées et le laboratoire est à même de définir le caractère histologique précis d'une tumeur ainsi que son degré d'agressivité, ce qui permet d'adapter le choix des thérapeutiques et surtout de donner un pronostic au propriétaire. Néanmoins, le taux de survie observé dans la plupart des cancers chez les animaux de compagnie ne s'est guère amélioré au cours des 20 dernières années, en dépit des progrès de la chirurgie et des thérapies adjuvantes.

La présence d'anomalies chromosomiques dans les cellules cancéreuses humaines a été suggérée dès le début du siècle par BOVERI [44]. Cependant, jusque dans les années 70, les connaissances fondamentales sur les processus de cancérisation étaient quasi-nulles. Les connaissances sur les événements génétiques à l'origine de la carcinogenèse et de la progression tumorale, acquises au cours des dernières décennies, sont le fruit de nombreuses recherches dans les domaines variés : clinique, épidémiologie, virologie, biologie cellulaire et surtout cytogénétique et génétique moléculaire. Ces études ont montré que le cancer témoigne, dans ses manifestations pathologiques, d'une grande diversité d'origines et de tissus, qui révèle des désordres génétiques extrêmement variés.

Les tumeurs de la mamelle représentent le type tumoral le plus fréquent chez la chienne, leur fréquence s'établissant de 25 à 50% de l'ensemble des tumeurs suivant les auteurs [42, 53, 107, 238, 347]. La très grande majorité des tumeurs mammaires se développe chez la femelle, toutefois environ 1% sont observées chez le mâle [269, 349]. L'âge moyen

d'apparition des tumeurs mammaires s'établit, selon les études, de 8 à 12 ans [297]. Elles sont exceptionnelles chez des chiennes de moins de 2 ans. Leur fréquence reste faible jusqu'à l'âge de 6-7 ans et a tendance à diminuer chez les chiennes âgées de plus de 13 ans. De 41% à 53% des tumeurs mammaires de la chienne sont des tumeurs malignes [53, 132, 152, 297] et au moment du diagnostic, environ la moitié des tumeurs malignes ont métastasé [99].

L'objet de notre travail est d'aborder, dans une première partie, les connaissances acquises sur les altérations génétiques observées dans les tumeurs humaines, afin d'identifier la série d'événements qui modifient une cellule normale pour la transformer en cellule cancéreuse. Dans une deuxième partie, nous présenterons une synthèse bibliographique la plus complète possible sur l'état actuel des recherches de génétique moléculaire concernant les tumeurs mammaires de la chienne. Enfin, la dernière partie permettra, après avoir précisé les limites de l'interprétation des résultats présentés, d'en envisager les applications.

Première partie

LE CANCER MALADIE DU GENOME

I. DE LA CELLULE NORMALE A LA CELLULE CANCEREUSE

Une tumeur (ou néoplasie) est une masse tissulaire néoformée, résultant d'une multiplication cellulaire excessive, incontrôlée, ayant tendance à s'accroître spontanément et constamment. Les connaissances actuelles sur la biologie du cancer conduisent à considérer la prolifération maligne comme résultant d'une accumulation progressive d'anomalies génétiques, le plus souvent rares et aléatoires. Ces anomalies sont responsables de l'acquisition par la cellule normale des 6 propriétés élémentaires définies par Robert WEINBERG (l'un des grands spécialistes actuels de l'oncologie moléculaire), qui vont en faire une cellule tumorale [473] :

- L'autosuffisance en facteurs de croissance, permettant aux cellules de rester dans un état de prolifération active, sans phase de quiescence.
- L'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs provenant du milieu extra-cellulaire.
- La capacité d'échapper à la mort cellulaire programmée.
- L'acquisition d'un potentiel répliquatif illimité.
- La capacité à induire un réseau de néo-vaisseaux (angiogenèse) permettant un apport d'oxygène et de nutriments aux cellules tumorales.
- L'acquisition d'un phénotype mobile et invasif (pouvoir métastatique), donnant à la cellule tumorale la capacité de s'échapper de son tissu d'origine.

De façon schématique, on peut dire de la cellule cancéreuse qu'elle se divise de façon anarchique, sans respecter les signaux de contrôle de l'organisme porteur, qu'elle perd ses relations sociales avec les cellules voisines, envahit progressivement les tissus adjacents, provoque une vascularisation nouvelle et la création d'un tissu de soutien indispensable pour la survie de la masse tumorale (le stroma) et migre à distance pour créer de nouvelles colonies (ou métastases) [154, 316, 464].

I.A Cycle cellulaire et carcinogenèse

I.A.1 Origine du cancer clinique et processus de cancérisation

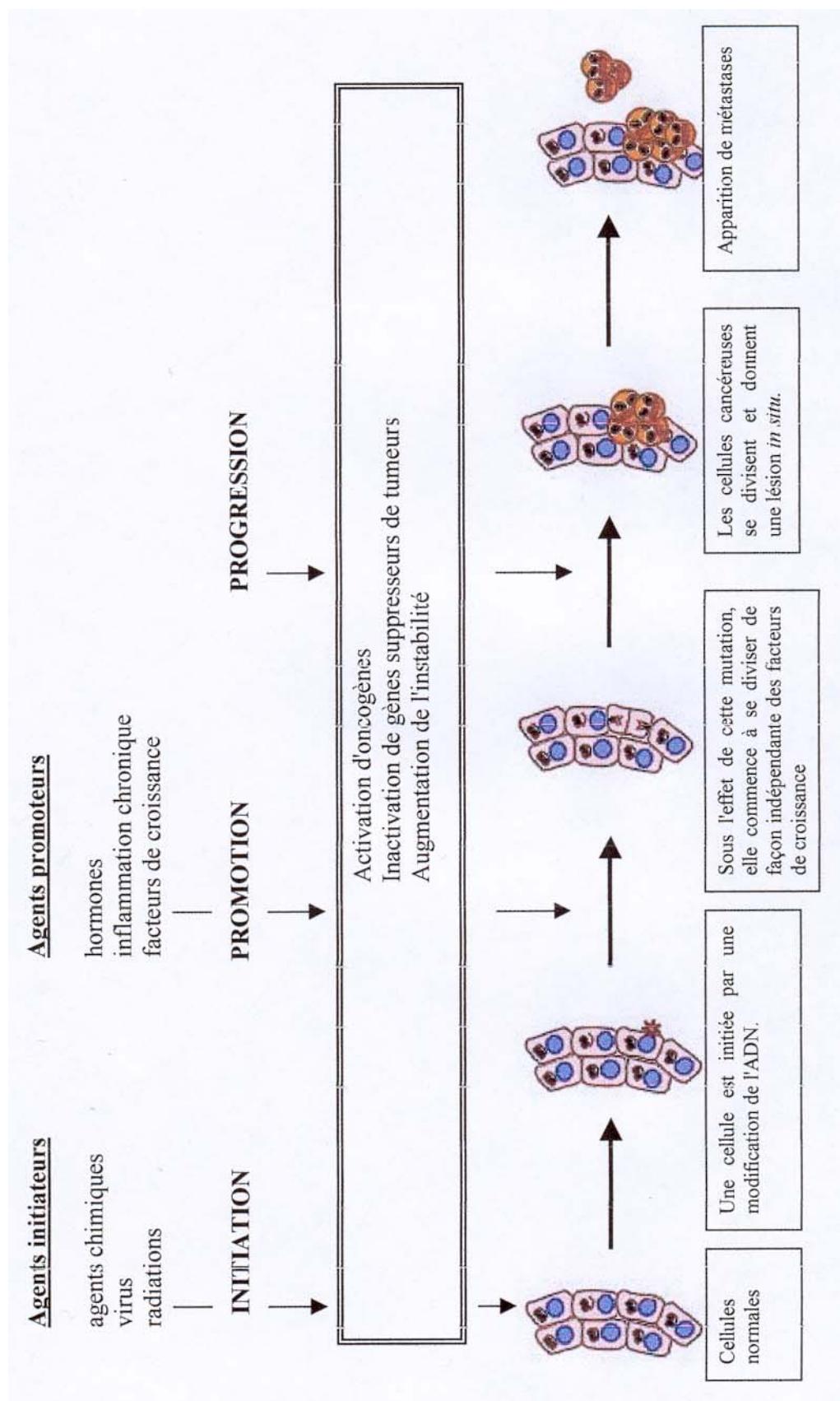
Le processus cancéreux représente l'ensemble des phénomènes qui accompagnent la naissance, le développement et l'évolution d'un cancer dans l'organisme. Malgré la multiplicité des causes, des aspects et des modalités évolutives du cancer, il est possible de dégager un schéma général du processus cancéreux valable pour toutes les espèces animales et incluant trois phases : la genèse du cancer, la phase locale et la phase générale du cancer. Au plan clinique, deux phases peuvent être définies dans l'évolution d'un cancer :

- une phase pré-clinique qui correspond à la première partie de la phase locale, le cancer évoluant sans avoir été cliniquement perçu,
- une phase clinique qui débute avec la découverte de la première masse tumorale et comporte la fin de la phase locale et la phase de généralisation.

Un cancer est cliniquement décelable quand il est constitué de 10^9 cellules. À 10^{12} cellules, il entraîne la mort de l'individu. Toutes ces cellules sont les filles d'une seule cellule devenue cancéreuse (ou transformée), c'est la notion d'expansion clonale. Depuis les travaux de BERENBLUM, il y a un demi-siècle, on admet que l'évolution d'une cellule normale vers une cellule cancéreuse, puis vers un cancer clinique s'effectue en trois étapes (figure 1) [450] :

- *L'initiation tumorale* est un processus irréversible et rapide, ne concernant qu'une seule cellule, par lequel une lésion définitive de l'ADN est produite juste après l'action de l'agent carcinogène. Les cellules initiées ne sont pas tumorales, elles n'ont pas acquis une autonomie de croissance. On ne peut les distinguer morphologiquement des autres cellules.
- *La promotion tumorale*, assimilable conceptuellement à la notion de transformation cellulaire, correspond à la prolifération clonale des cellules initiées. Elle consiste en une série d'étapes permettant à une cellule initiée d'aller jusqu'au cancer histologiquement décelable, suite à une exposition prolongée, répétée ou continue, à une substance qui entretient et stabilise la lésion initiée. Les promoteurs tumoraux exogènes ou liés à l'hôte (les hormones, l'inflammation chronique et aussi les facteurs de croissance) favorisent la prolifération des cellules mutées et donc le développement des tumeurs sans induire eux-mêmes de mutations car ils ne sont pas, en général, des agents mutagènes ou carcinogènes par eux-mêmes.

Figure 1. Schéma général de la carcinogenèse multi-étapes.



- La *progression tumorale* correspond à l'acquisition de l'indépendance de croissance, de l'expression phénotypique de la malignité, et d'une instabilité de plus en plus marquée. Les cellules de plus en plus malignes acquièrent la capacité de produire des métastases dans l'organisme.

Les différentes étapes de la cancérogenèse sont bien décrites par les anatomo-pathologistes. L'*hyperplasie* est la caractéristique d'un lot de cellules d'apparence normale qui présentent le défaut de se multiplier excessivement par rapport au tissu normal. Les choses peuvent en rester là ou alors apparaît une *dysplasie*. Les cellules de la zone dysplasique ont des anomalies de forme et d'orientation. Un stade de plus peut être franchi lorsque ces cellules, devenues anormales, forment une tumeur qui se développe localement, sans franchir les limites séparant le tissu auquel elle appartient, des autres tissus : c'est un *cancer in situ*. Cette tumeur peut rester confinée au tissu où elle est apparue ou elle peut s'étendre au-delà : elle est alors devenue un *cancer invasif*, dont certaines cellules migrant par voie sanguine ou lymphatique vont plus ou moins rapidement former des métastases à distance.

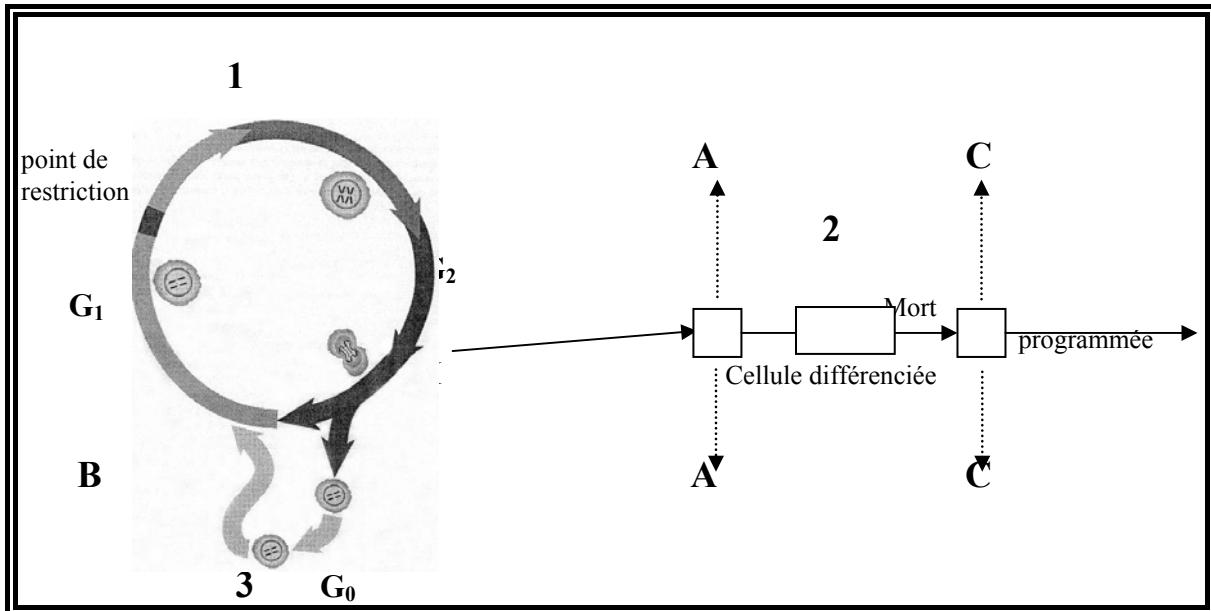
I.A.2 La cinétique de l'expansion clonale

La population cellulaire d'un tissu normal comporte trois compartiments dont la composition est parfaitement régulée (figure 2) :

1. Le compartiment des cellules en division (dans le cycle cellulaire),
2. Le compartiment des cellules différencierées qui sont hors cycle cellulaire et dont le devenir est à terme de disparaître,
3. Le compartiment des cellules au repos (en phase quiescente), capables, après stimulus, de rentrer en phase G₁ du cycle.

La vitesse de prolifération d'une population de cellules résulte d'un équilibre entre la division cellulaire, la différenciation cellulaire et la mort cellulaire programmée appelée apoptose. L'apoptose résulte d'une condensation cellulaire globale qui conduit à la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques. Ce type de mort cellulaire s'oppose à la nécrose qui se caractérise par l'éclatement de la cellule après lyse des systèmes membranaires et libération massive du contenu intracellulaire dans le milieu extracellulaire, à l'origine d'une réponse inflammatoire [51].

Figure 2. Compartiments cellulaires, cycle cellulaire et points d'impact de la carcinogenèse moléculaire.



Compartiments cellulaires :

1. Compartiment des cellules dans le cycle cellulaire.
2. Compartiment des cellules différencierées hors cycle appelées à disparaître par mort programmée.
3. Compartiment des cellules quiescentes en phase G_0 , hors cycle.

Evénements secondaires à la carcinogenèse moléculaire entraînant :

- A. L'impossibilité pour les cellules après la mitose de se différencier, les poussant à refaire un cycle cellulaire.
- B. La stimulation en G_0 poussant les cellules à entrer dans le cycle cellulaire.
- C. L'impossibilité de mourir à l'issue du programme de différenciation.

Normalement les cellules contrôlent finement leur prolifération en fonction d'une multitude de signaux extrinsèques de nature chimique (hormones, facteurs de croissance, cytokines, conditions métaboliques) ou mécanique (contacts entre les cellules ainsi qu'avec la matrice extra-cellulaire) qui assurent le maintien harmonieux de la taille et de la fonction de chaque organe, ainsi que le renouvellement nécessaire de certaines cellules au cours du temps. Le contrôle de cet équilibre (fondamental au cours de processus physiologiques normaux, tels que le développement embryonnaire, la régénération des tissus et le vieillissement), se fait par l'intermédiaire d'un équilibre permanent entre facteurs activateurs et facteurs inhibiteurs de la division cellulaire. Toute altération de cet équilibre (homéostasie cellulaire) peut faire pencher la balance soit du coté inhibiteur (dans ce cas la cellule meurt et disparaît), soit du coté activateur, et dans ce cas la cellule se divise de façon incontrôlée, ce qui peut conduire à des situations pathologiques majeures comme la formation de tumeurs.

Le tissu cancéreux comporte, comme le tissu normal, trois compartiments, mais leur répartition, au lieu d'être harmonieuse et contrôlée, est dérégulée (figure 2). L'émergence d'une population cellulaire à forte croissance au cours de la Cancérogenèse est ainsi liée à la perte de capacité de mourir d'une partie des cellules, associée à une accélération de la progression dans le cycle cellulaire [79]. Les progrès considérables de la biologie moléculaire au cours des vingt dernières années ont permis une caractérisation de plus en plus détaillée des mécanismes moléculaires qui contrôlent la prolifération cellulaire. Le corollaire de ces découvertes a été la compréhension des dérégulations impliquées dans les processus de transformation cellulaire et de Cancérisation.

I.A.3 Rappels sur le cycle cellulaire

Le processus mitotique associe des phénomènes génétiques et biochimiques grâce auxquels, à partir d'une cellule, on aboutit à deux cellules identiques. Il s'inscrit à l'intérieur du cycle cellulaire composé de deux phases. L'interphase comprend les phases G₁, S et G₂. L'autre phase du cycle est la mitose à l'issue de laquelle s'achève la division cellulaire :

- Pendant la phase G₁ les cellules peuvent atteindre leur taille maximale (synthèse élevée d'ARN et donc de protéines), se différencier, et accomplir les fonctions caractéristiques du type cellulaire auquel elles appartiennent.

- La phase S représente la phase durant laquelle la cellule duplique son ADN. Pendant cette phase, la cellule dédouble également le centrosome, nécessaire à la migration des chromosomes.
- La phase G₂ correspond à une synthèse importante d'ARN et de protéines, ainsi qu'une mise en réserve d'énergie pour la mitose à venir. De plus, cette phase permet à la cellule de s'assurer que la réPLICATION de l'ADN est complète et qu'il n'est pas endommagé avant le déclenchement de la mitose.
- La mitose (M), mécanisme commun aux eucaryotes, conduit à la répartition du matériel génétique en parts égales lors de la division cellulaire (les chromosomes, le matériel nucléaire et cytoplasmique sont divisés entre les deux cellules filles). Elle est constituée de 4 étapes successives (la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase).

Alors que la description morphologique de la mitose date de plus d'un siècle, et que la structure de l'ADN en double-hélice complémentaire, découverte en 1953 par WATSON et CRICK, suggérait un mécanisme de duplication des chromosomes, rien ne venait expliquer comment ces chromosomes étaient distribués équitablement entre les deux cellules filles, ni comment ces événements étaient coordonnés avec la croissance et la division des cellules. Vers la fin des années 60, HARTWELL [157] fit le pari risqué que ces mécanismes étaient sous contrôle génétique mais c'est seulement depuis les années 80 que l'on commence à comprendre les mécanismes biochimiques sous-jacents à la division cellulaire, grâce aux travaux de NURSE et de HUNT sur la découverte des cyclines et des kinases [111]. La découverte des régulateurs clés du cycle cellulaire a d'ailleurs valu à Lee HARTWELL, Paul NURSE et Tim HUNT, le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 2001.

D'une façon générale, les cellules ne progressent pas dans la phase suivante du cycle cellulaire avant d'avoir achevé tous les événements associés à la phase précédente. Pour cela, des mécanismes de surveillance permettent à la cellule de s'assurer de l'exécution complète des événements d'une phase avant d'initier les événements associés à la phase suivante et assurent ainsi une duplication et une transmission fidèle du génome aux cellules filles résultant de la division cellulaire. Les régulateurs du cycle cellulaire étant des cibles

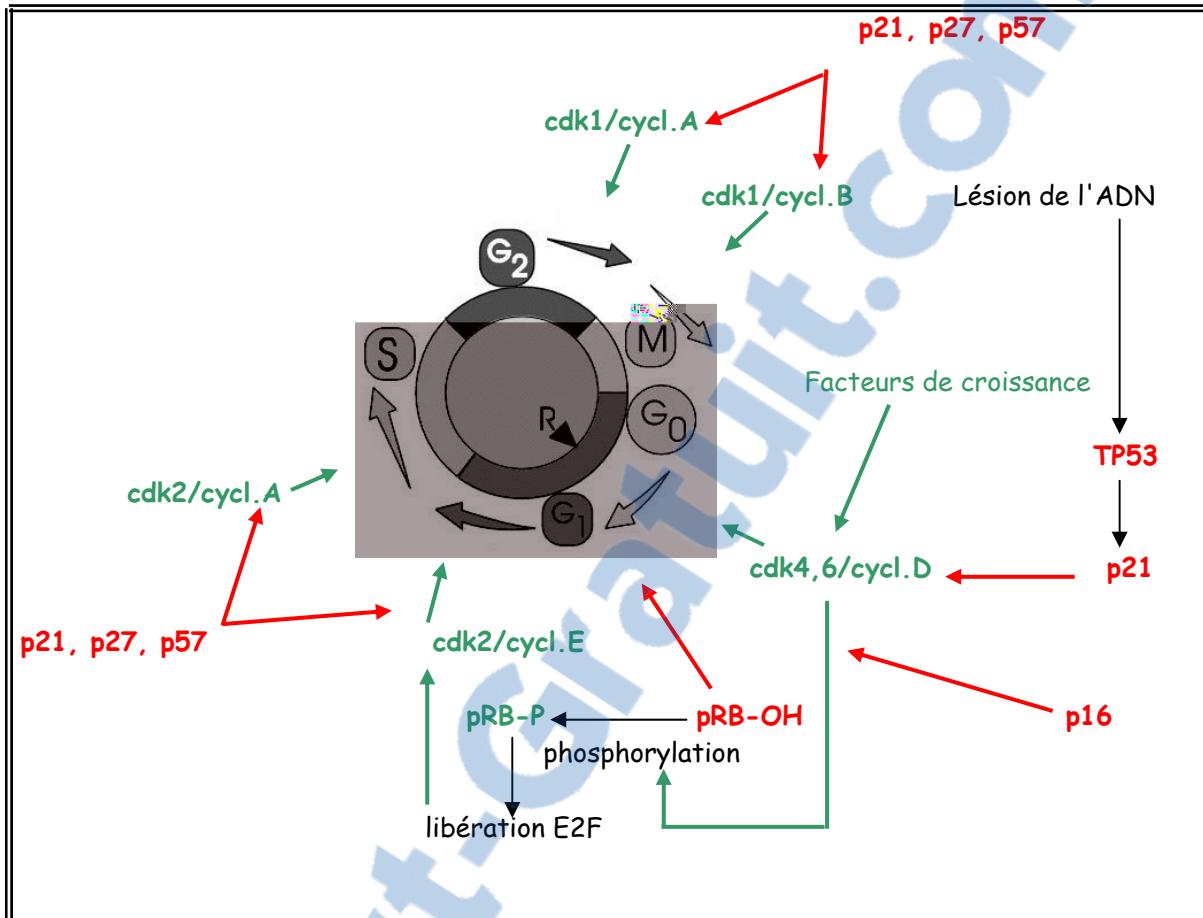
privilégiées des processus oncologiques, la description de ces molécules permet de mieux comprendre les mécanismes de cancérisation.

Différents points de contrôle [(ou *checkpoints*, un autre concept mis en avant par HARTWELL [158]), le point de restriction R en G₁, le passage de G₁ en S, le passage de G₂ en M], sont sous le contrôle d'une famille de kinases de petite taille, les kinases dépendantes des cyclines (cdk), qui régulent l'activité de nombreuses protéines par phosphorylation. Cependant, ces protéines kinases sont inactives en elles-mêmes et doivent être activées pour acquérir une activité kinasique. L'activité enzymatique et la spécificité des cdk sont dépendent de leur association avec une sous-unité régulatrice appartenant à la famille des cyclines. Les cyclines (A, B, C, D et E) sont synthétisées à des moments précis du cycle cellulaire, se lient à des kinases spécifiques qui contrôlent les transitions s'effectuant entre chacune des différentes phases du cycle cellulaire (G₁, S, G₂ et M). Elles permettent ainsi la progression du cycle cellulaire en assurant un premier niveau de régulation des cdk. L'activité des cdk dépend, en plus de leur association avec une cycline, des phosphorylations et déphosphorylations (d'un résidu thréonine commun à toutes les cdk) sous l'action de différentes kinases et phosphatases qui déterminent le moment exact de leur mise en action. Cette étape est nécessaire à l'activation des cdk et constitue un deuxième niveau de régulation des cdk. Un niveau supplémentaire de régulation implique les inhibiteurs des cdk, appelés les cdkis [405, 406]. On distingue deux familles de cdkis :

- Les membres de la famille *CIP/KIP* (les protéines p21, p27 et p57, produits des gènes *WAF1* (ou *CDKN1*), *KIP1* et *KIP2*) qui se lient aux complexes cycline/cdk.
- Les membres de la famille *INK4* (les protéines p16, p15, p18, p19, produits des gènes *CDKN2A* (ou *INK4*), *CDKN2B*, *CDKN2C* et *CDKN2D*) qui entrent en compétition avec les cyclines pour la liaison aux cdk 4 et 6.

La transition entre la phase G₁ du cycle cellulaire (phase dans laquelle la plupart des cellules différenciées sont bloquées) et la phase S, qui correspond à l'engagement irréversible de la cellule dans un cycle de division cellulaire, est étroitement régulée par une voie de signalisation impliquant les protéines pRb (protéine du rétinoblastome, tumeur de la rétine chez l'enfant), et E2F. En phase G₁, la protéine nucléaire pRb est hypo-phosphorylée et, sous cette forme, est complexée aux facteurs de transcription de la famille E2F, qu'elle

Figure 3. Le cycle cellulaire et ses régulateurs.



Les activateurs du cycle sont notés en vert, les inhibiteurs en rouge.

- Les kinases de type cdk contrôlent les transitions qui s'effectuent entre chacune des différentes phases du cycle cellulaire (G₁, S, G₂ et M) :
 - cdk4 et cdk6 en association avec une cycline du type D, interviennent au niveau du point de restriction R.
 - cdk2/cycline E intervient dans la transition G₁/S.
 - cdk2/cycline A, dans le déroulement de la phase S.
 - cdk1, en association avec la cycline A et B, assure la transition G₂/M.
- Dans les cellules au repos, en G₀ ou en G₁, la protéine pRB, sous sa forme hypophosphorylée (pRB-OH), séquestre le facteur de transcription E2F, ce qui bloque la transition de G₁ à S. Brusquement, lors du passage G₁/S, sous l'effet des complexes cycline D/cdk4,6 elle devient phosphorylée et libère le facteur E2F permettant la transcription d'un grand nombre de gènes.
- La libération de E2F aboutit ainsi à la transition G₁/S en permettant alors la liaison cycline E/cdk2.
- L'induction de p16 immobilise le cycle cellulaire en inhibant la phosphorylation de pRB.
- L'activation de la protéine TP53, sous l'effet d'une altération de l'ADN, entraîne une activation de la transcription de la protéine p21 qui inhibe la liaison cycline E/cdk4 et empêche ainsi la libération de la protéine pRb du facteur de transcription E2F.

contribue ainsi à séquestrer sous une forme inactive. Lorsque la cellule reçoit un signal mitogénique, par exemple après stimulation d'un récepteur membranaire par son facteur de croissance, une cascade d'activations et de phosphorylations aboutit à l'hyperphosphorylation par cdk4 et cdk6 de pRb, qui libère alors les facteurs de transcription E2F. Ce sont ces facteurs qui vont stimuler l'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle et la division cellulaire.

Des contrôles négatifs sont représentés par l'inhibiteur p16 des kinases dépendantes des cyclines, dont l'action physiologique est de contrecarrer la phosphorylation de pRb en séquestrant les kinases cdk4 et cdk6. La phosphorylation de pRb dans la phase G₁ est donc nécessaire pour permettre la progression de G₁ vers S [119, 405, 406].

Une autre protéine joue un rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire. Il s'agit de la protéine TP53, abordée plus en détail par la suite. La protéine TP53 représente le régulateur majeur du point de contrôle entre les phases G₁ et S. L'activation de la protéine TP53, sous l'effet d'une altération de l'ADN, entraîne une activation de la transcription de la protéine p21 qui inhibe la liaison cycline D/cdk4 et empêche ainsi la libération de la protéine pRb du facteur de transcription E2F. La liaison cycline E/cdk2 est alors inactivée empêchant la transition G₁/S. Ce mécanisme constitue une des voies de l'arrêt de la phase G₁. D'autres mécanismes d'arrêt semblent exister au niveau de G₁/S, impliquant entre autres, le PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*, co-facteur de la polymérase) et la cycline D1 [405, 406].

I.B Les cibles et les acteurs de la carcinogenèse

I.B.1 Interaction entre les événements géniques transformants

Le noyau de chaque cellule contiendrait chez les mammifères environ 30 000 gènes mais ces gènes ne sont pas tous des cibles de la carcinogenèse. Parmi ces gènes, il y en a environ 100 qui contrôlent la division cellulaire ; certains la stimulent alors que d'autres la freinent. La dérégulation de ces gènes (appelés gènes du cancer) suite à l'accumulation d'altérations au sein du génome des cellules normales, rompt cet équilibre. L'activation des proto-oncogènes en oncogènes et/ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (appelés également anti-oncogènes) impliqués dans la régulation des différents événements cellulaires (la multiplication, la différenciation cellulaire et l'apoptose) sont les véritables objets de l'initiation et de la promotion tumorales [220, 316, 464].

I.B.1.a Les oncogènes

➤ Définition

Le mot oncogène désigne une multitude de gènes régulateurs de la croissance pouvant contribuer au développement du cancer après des activations très variées. Les oncogènes ont été découverts à la suite des études sur les rétrovirus transformants. Le génome des rétrovirus, constitué d'ARN, comprend trois régions codant pour des protéines : la région *gag* qui code pour la protéine du cœur du virus, la région *pol* qui code pour la transcriptase inverse et la région *env* qui code pour les protéines d'enveloppe du virus. Lors de l'infection d'une cellule, l'ARN rétroviral est recopié en ADN grâce à la transcriptase inverse. Cette copie d'ADN (provirus) va s'intégrer au hasard dans le génome de la cellule hôte. Certains rétrovirus ont un pouvoir oncogénique qu'ils exercent de deux manières :

- Par insertion : le génome viral s'incorpore dans l'ADN chromosomique de la cellule infectée ; cette insertion peut modifier directement un proto-oncogène cellulaire dans sa structure ou dans son expression.
- Par transduction : initialement, le provirus s'intègre en amont d'un gène cellulaire. Un réarrangement (délétion) entraîne la fusion du provirus au proto-oncogène. La transcription engendre un ARN messager chimérique comportant une partie du génome viral et une partie du gène cellulaire. Cette version tronquée du virus peut devenir oncogénique ; la cellule infectée a acquis un avantage prolifératif par rapport aux cellules normales. En outre, le génome des virus ainsi formés (on parle de rétrovirus transduits) contient alors des oncogènes qui dérivent des proto-oncogènes cellulaires.

A la suite de ces événements d'insertion et de transduction, l'expression du gène cellulaire échappe à sa régulation normale et passe sous le contrôle des éléments de régulation vitaux avec ou sans modification de son produit (mutation, protéine de fusion).

L'étude des oncogènes vitaux a permis de caractériser leurs équivalents cellulaires normaux appelés proto-oncogènes. Les oncogènes sont nommés en général avec trois lettres minuscules, suivant un préfixe rappelant leur origine virale ou cellulaire. Ainsi, les oncogènes découverts dans les virus sont appelés *v-onc*, ceux découverts ensuite (ou uniquement) dans les cellules, sont appelés *c-onc*. Le premier oncogène viral est le gène *v-src* du virus du sarcome de poulet découvert par ROUS en 1911 [364].

A coté de cette oncogenèse rétrovirale, le phénotype tumoral peut être conféré à certaines cellules en les transfectant avec de l'ADN provenant de tumeurs n'ayant pas une origine virale. Ce test de transfection est un autre moyen d'isoler de nouveaux oncogènes ou d'attribuer le statut d'oncogène à un gène isolé d'une autre manière et de mettre en évidence son pouvoir de transformation *in vitro*.

➤ Classification des proto-oncogènes

Les proto-oncogènes sont hautement conservés au cours de l'évolution des espèces, non seulement chez les vertébrés supérieurs (mammifères, oiseaux), mais aussi chez les vertébrés inférieurs, les invertébrés, et certains eucaryotes unicellulaires, telle la levure. Cette haute conservation phylogénique a permis d'attribuer aux proto-oncogènes une fonction déterminante dans les mécanismes contrôlant la multiplication et la différenciation cellulaires.

Les produits des proto-oncogènes jouent un rôle physiologique essentiel dans la synthèse des molécules qui interviennent en cascade dans la transmission des messages reçus et émis par la cellule pour réguler la division cellulaire [56]. C'est leur rôle clé dans ces mécanismes qui fait de l'activation des proto-oncogènes une étape importante dans l'établissement des tumeurs.

En 20 ans, une centaine d'oncogènes a été isolée et la liste n'est pas close. En se basant sur le rôle physiologique de la protéine normale transcrrite, on distingue plusieurs familles d'oncogènes (tableau 1) :

- Les oncogènes qui codent pour des messagers extra-cellulaires ou des facteurs de croissance : Les facteurs de croissance sont des petits peptides qui agissent sur la cellule par des liaisons avec des récepteurs spécifiques. À travers l'activation de leur récepteur, les facteurs de croissance ont des rôles variés (maintien de la viabilité cellulaire, stimulation de la multiplication, de la différenciation cellulaire, voire de l'apoptose).
- Les oncogènes qui codent pour des récepteurs de facteurs de croissance : De nombreux récepteurs transmembranaires ont une activité protéine kinase quand ils sont activés. La fixation du facteur de croissance correspondant au récepteur entraîne une dimérisation des molécules du récepteur et une phosphorylation des protéines cellulaires, avec activation en cascade pour la transmission du signal intracellulaire.

Tableau 1. Exemples d'oncoprotéines codées par des oncogènes et de tumeurs associées à une modification de l'expression de ces oncogènes.

Types	Proto-oncogènes	Cancers associés
<u>Facteurs de croissance</u>		
Platelet Derived Growth factor-β	<i>sis</i>	Astrocytome
Fibroblast GF (FGF)	<i>hst1</i> <i>int-2</i>	Ostéosarcome Cancers de l'estomac, de la vessie, tumeurs mammaires, mélanosarcome
<u>Récepteurs de facteurs de croissance</u>		
Famille des récepteurs de l'Epithelial Growth factor (EGF)	<i>erb</i>	Epithélioma spinocellulaire du poumon, cancer de l'ovaire, adénocarcinome mammaire...
Récepteur du Colony Stimulating factor-1	<i>fms</i> <i>ret</i>	Leucémies Néoplasies endocrines multiples, carcinome papillaire de la thyroïde
<u>Protéines impliquées dans la transduction du signal</u>		
Protéines se liant au GTP	<i>ras</i>	Cancers du poumon, du côlon, du pancréas....
Tyrosine-kinases	<i>abl</i>	Leucémies Leucémies
<u>Protéines de régulation de l'activité nucléaire</u>		
Activateurs de la transcription	<i>myc</i>	Lymphome de Burkitt, neuroblastome, cancer du poumon "à petites cellules"
<u>Régulateurs du cycle cellulaire</u>		
Cyclines D1, D2 et D3	<i>CCND1</i> , <i>CCND2</i> et <i>CCND3</i>	Certains lymphomes, cancers mammaires, hépatiques, œsophagiens
Kinase cycline dépendante	<i>CDK4</i>	Glioblastome, mélanosarcome et autres sarcomes

Une fois activés, les récepteurs sont internalisés et leur fonction kinase inhibée, ce qui assure un rétrocontrôle et permet une régulation de la réponse au stimulus. Des variations structurelles parfois minimes vont perturber cette internalisation et le récepteur reste actif de façon permanente, même en l'absence de facteurs de croissance. Une telle absence de contrôle peut conduire à la transformation maligne.

- Les oncogènes qui codent pour des protéines impliquées dans les réactions qui transmettent ou amplifient les signaux : Les tyrosine-kinases cytoplasmiques n'ont pas de fonction réceptrice et sont localisées au niveau du cytoplasme ou à la face interne de la membrane plasmatique. Ces protéines transmettent le signal reçu des facteurs de croissance. Les oncogènes de la famille *ras* codent pour des protéines à activité GTPasique, ayant un rôle pivot pour la signalisation entre la membrane cellulaire et le noyau.
- Les oncogènes qui codent pour des régulateurs du cycle cellulaire
- Les oncogènes qui codent pour des facteurs nucléaires qui modulent la transcription d'autres gènes : Ils sont représentés par des gènes de réponse rapide à la stimulation par les facteurs de croissance, qui modulent l'activité d'autres gènes.

➤ Activation des proto-oncogènes dans les tumeurs humaines

L'évolution des connaissances sur la cancérogenèse et les progrès de la biologie moléculaire ont permis de comprendre que l'apparition des oncogènes pouvait être provoquée par une mutation dans le génome. L'activation du gène cellulaire normal en gène oncogène semble résulter de plusieurs mécanismes différents :

- Une activation par mutation ponctuelle dans le domaine critique d'un oncogène peut provoquer l'altération de la régulation de la division cellulaire. C'est le principal mode d'activation des gènes de la famille *ras*.
- L'activation par amplification génomique correspond à une accumulation d'un grand nombre de copies de tout ou partie d'un même gène (ou d'un segment

chromosomique) bien que cela n'augmente peut-être pas nécessairement son niveau d'expression. Le gène *c-erbB-2* et les membres de la famille *myc* y sont particulièrement sujets dans les cancers humains.

- La translocation d'un segment chromosomique contenant un oncogène cellulaire peut modifier son expression. Les études moléculaires ont permis de connaître les gènes partenaires impliqués dans un certain nombre de translocations chromosomiques, principalement dans les leucémies. Le clonage moléculaire des zones de remaniements chromosomiques a permis d'individualiser deux mécanismes d'activation :
 - Si du fait de cette translocation, un gène normalement non exprimé est inséré près d'un gène actif, le gène inactif peut alors s'exprimer de façon anormale, non régulée. L'exemple type en est le lymphome de Burkitt (prolifération maligne de cellules lymphoïdes de la lignée B) dans lequel l'expression anormale de *c-myc* est due à une translocation impliquant la bande 8q24, siège du locus de *c-myc*.
 - Le réarrangement des gènes *bcr-abl* résulte de la fusion aberrante d'une partie du chromosome 9 avec une partie du chromosome 22, ce qui génère un petit chromosome appelé "chromosome Philadelphie". Le gène de fusion code pour une protéine kinase qui induit une croissance exagérée des cellules hématopoïétiques, responsable de la leucémie myéloïde chronique.

L'activation d'un proto-oncogène en un oncogène peut-être définie comme une modification de sa structure primaire ou de sa régulation propre entraînant une perturbation de son expression et de sa fonction, permettant à la cellule d'acquérir les capacités nécessaires à la transformation maligne [185]. Le résultat de l'activation d'un oncogène est la production d'une protéine dite "oncogénique" qui ressemble à la protéine normalement codée par le gène cellulaire correspondant mais qui est anormale. Il peut s'agir d'une altération qualitative, liée à une mutation portant sur les séquences codantes du gène et entraînant l'apparition d'une protéine mutée (modifiée au niveau d'un acide aminé, ou tronquée, ou inexistante). Il peut également s'agir d'une altération quantitative, par amputation d'une séquence régulatrice non codante, qui a pour conséquence l'expression permanente ou l'accumulation de l'ARN messager correspondant et ainsi la production de quantités anormales d'une protéine (surexpression du produit du gène par augmentation de la transcription).

L'allèle muté de l'oncogène domine l'allèle sauvage si bien que la mutation d'un seul allèle d'un oncogène est suffisante pour provoquer l'augmentation de la fonction de l'oncogène et ainsi entraîner une prolifération cellulaire tumorale anarchique.

I.B.1.b Les gènes suppresseur4.758731T12 irration cellulai2430847i3 3(4.758731T12 73110

ainsi pour des protéines qui sont des éléments clés du "freinage" exercé en permanence par la cellule pour contrôler sa division, sa maturation et sa différenciation normale.

➤ Mode d'action des gènes suppresseurs de tumeurs

La présence des gènes suppresseurs est nécessaire au contrôle de la prolifération cellulaire et c'est la perte de leur fonction, responsable d'une division cellulaire non régulée, qui participe au phénomène de transformation tumorale [474].

Nous avons vu que, à la différence des oncogènes, les deux allèles du gène suppresseur de tumeur doivent être altérés pour entraîner une perte de la fonction du gène, c'est-à-dire perte de la fonction de régulation négative de la prolifération cellulaire [194]. Ceci suppose l'existence d'au moins deux événements en terme de carcinogenèse multi-étapes :

- L'étude des cancers familiaux a suggéré l'hypothèse de l'existence d'un gène dont une copie serait altérée au niveau germinal. Les individus ne naissent qu'avec une seule copie fonctionnelle du gène (un individu hérite de son père ou de sa mère d'un allèle muté). La première mutation du gène suppresseur est donc déjà présente dans le zygote. Les individus porteurs de l'allèle muté ne vont pas développer la maladie, à moins que le second allèle, la copie fonctionnelle de gène suppresseur, ne subisse une mutation suite à un deuxième événement mutationnel. La perte de l'allèle restant, suite à une mutation somatique intervenant sur le gène situé sur l'autre chromosome parental, est donc appelée perte d'hétérozygotie (LOH pour *loss of heterozygotie*).
- Dans les formes non familiales de cancer (dites sporadiques), les deux allèles sont inactivés par l'intermédiaire de deux mutations somatiques successives. La tumeur se développe à partir d'une seule cellule qui ne contient plus qu'un seul allèle muté, le second ayant été perdu lors d'un remaniement génétique qui a conduit à la délétion d'une partie plus ou moins importante du chromosome (perte d'hétérozygotie). Pour la plupart des gènes suppresseurs de tumeurs, les altérations inactivant l'allèle restant sont des micro lésions (insertions ou délétions) qui perturbent le cadre de lecture et ont principalement un effet qualitatif sur l'expression de la protéine qui est généralement tronquée, instable ou même absente (par exemple la protéine BRCA1). Plus récemment, il a été montré que l'expression de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs est inactivée par méthylation du promoteur de transcription. Dans certains

cas, une mutation faux-sens entraîne le remplacement d'une base, inactivant ainsi la fonction du produit du gène, c'est le cas du gène *TP53*.

Si les deux événements mutationnels sont somatiques, leur chance de survenir dans une même cellule est très faible. Par contre, si la première mutation est germinale, un deuxième événement somatique a beaucoup plus de chances de se produire dans une même cellule car toutes les cellules portent la première mutation.

Actuellement, on connaît une trentaine de gènes qui sont des suppresseurs de tumeurs. Ces gènes, s'ils permettent de mieux comprendre certaines formes héréditaires et familiales de cancer, sont également impliqués de façon constante dans la survenue de tumeurs sporadiques (tableau 2).

I.B.1.c Origine des mutations

Il existe de nombreux événements pouvant provoquer des erreurs dans le génome des cellules :

- Les altérations génétiques peuvent résulter d'erreurs spontanées et inhérentes à la réPLICATION de l'ADN : l'ADN polymérase effectue environ une erreur toutes les 10^7 bases [4].
- Des facteurs endogènes peuvent entraîner des dommages de l'ADN. Ces dommages peuvent provenir de la production de molécules réactives dans les cellules suite à des processus métaboliques normaux. Les collisions avec d'autres molécules, suite à une agitation thermique, entraînent fréquemment des changements chimiques majeurs de l'ADN : altérations structurales affectant les bases (désamination de la méthyl-cytosine en thymine par exemple), dégâts causés par des radicaux libres...[177].
- Les dommages de l'ADN peuvent également résulter d'une exposition à un agent environnemental. Il ne fait plus de doute maintenant qu'un grand nombre de cancers humains est provoqué par des mutations induites par des carcinogènes exogènes [450]. De nombreux facteurs externes biologiques (virus), physiques (irradiation) ou chimiques peuvent induire des altérations génétiques à l'intérieur de la cellule (agents mutagènes). Environ 70 à 90% des cancers humains seraient liés à l'environnement (nutrition, habitudes de vie et expositions professionnelles) [96].

Tableau 2. Principaux gènes suppresseurs de tumeurs.

Gènes	Localisations chromosomiques chez l'Homme	Tumeurs particulièrement concernées
<i>APC</i>	5q21	Côlon
<i>BCNS</i>	9q31	Peau
<i>BRCA1</i>	17q21-22	Sein et ovaire
<i>BRCA2</i>	13q12-13	Sein
<i>DCC</i>	18q21	Côlon
<i>INK4</i>	9p21	Mélanome et pancréas
<i>MCC</i>	5q21	Côlon
<i>MEN1</i>	11q13	Glandes endocrines
<i>MLHI</i>	3p	Côlon
<i>MSH2</i>	2p-15	Côlon
<i>NF1</i>	17q11	Tumeur cérébrale (neuro-fibromatose I)
<i>NF2</i>	22q12	Tumeur cérébrale (neuro-fibromatose II)
<i>PMS1</i>	2q31	Côlon
<i>PMS2</i>	7p22	Côlon
<i>RB1</i>	13q14	Rétinoblastome, autres tumeurs
<i>RCC</i>	3p14	Rein
<i>TP53</i>	17q13	Tumeurs variées
<i>VHL</i>	3p25	Rein et surrénales
<i>WT1</i>	11p13	Rein (tumeur de Wilms)

- Des facteurs génétiques semblent également être impliqués dans la pathogénie de certaines tumeurs chez les humains. On distingue, ainsi, les rares formes strictement héréditaires de cancers qui représentent 1% environ des cas où l'apparition d'un cancer survient dans le cadre d'un syndrome, et les 10% de formes familiales de cancers où on met en évidence des familles au sein desquelles il existe un haut risque de survenue de cancers comme c'est le cas pour les cancers du colon, de l'ovaire et du sein (transmission autosomique dominante d'une anomalie génétique) [74].

Dans ce dernier cas, l'altération génétique qui initie le processus de carcinogenèse touche la lignée germinale et peut alors être transmise de génération en génération s'exprimant sous la forme d'une prédisposition familiale à certains cancers. Les individus atteints héritent donc d'une susceptibilité à développer un cancer. Les cancers familiaux se produisent chez les jeunes ou les jeunes adultes plutôt qu'à l'âge habituel d'apparition des cancers spontanés.

I.B.2 Notion de stabilité du génome

Une seule mutation n'est pas suffisante pour le développement d'une tumeur. On estime qu'au moins six événements touchant le génome, indépendants en apparence (en fait, ils se dynamisent entre eux), sont nécessaires pour le passage d'une cellule normale à une cellule avec un phénotype malin "complet", c'est-à-dire capable de métastaser [316, 450, 464]. Des calculs simples prenant en compte le taux de mutation connu des cellules non germinales (environ 10^{-7} par gène et par cycle cellulaire) prédisent que la durée de vie humaine ne suffirait pas pour atteindre une telle accumulation de mutations.

La vision dominante, qui consistait à donner la primeur à l'activation de gènes sensibles (proto-oncogènes), laisse la place maintenant aux mécanismes qui président à l'évolution tumorale et plus particulièrement à l'instabilité génomique dont font preuve la plupart des cellules cancéreuses. De nombreux travaux ont confirmé le rôle très important joué par les dysfonctionnements des mécanismes de contrôle de la stabilité et de l'intégrité génomiques [35]. Il devient aujourd'hui de plus en plus évident que l'instabilité génomique est un moteur puissant qui, de concert avec la grande hétérogénéité cellulaire qui caractérise les tumeurs, fait de ces dernières le siège d'une sélection féroce vers un phénotype cancéreux agressif [35, 154]. Le rôle majeur de l'instabilité génomique, pouvant favoriser l'accumulation d'altérations génétiques nécessaires à la survenue du phénotype transformé, confirme

d'ailleurs la notion de carcinogenèse en plusieurs étapes [216, 226]. Plusieurs catégories principales d'instabilité semblent jouer un rôle important dans l'oncogenèse [216] :

- A l'état normal, la cellule possède de très nombreux systèmes de détection et de réparation des erreurs visant à maintenir son génome intégrer, c'est-à-dire identique à lui-même tout au long de la vie cellulaire, y compris lors de sa division. Ce phénomène de maintien à l'identique est appelé stabilité génique. Des études ont identifié les gènes qui détectent l'ADN "abîmé" et conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire permettant les réparations des anomalies moléculaires. La plupart des oncogènes et surtout des gènes suppresseurs de tumeurs ont, outre leur fonction sur le contrôle du cycle cellulaire et de la différenciation, un rôle capital dans les processus de stabilité génique [216, 474].

Les instabilités microsatellitaires (MIN pour *microsatellite instabilities*) correspondent à un nouveau type de mutation se traduisant par une instabilité génomique (ou phénotype d'erreur de réPLICATION, RER⁺) entraînée par l'inactivation de plusieurs gènes responsables des mécanismes de réparation des mésappariements nucléotidiques au niveau de l'ADN. Les microsatellites sont des séquences répétées en tandem, tout au long du génome, d'un motif de une à quatre paires de bases, le nombre de répétition du motif pouvant varier de 10 à 40. Identifié tout d'abord dans les tumeurs colo-rectales sporadiques et familiales, le phénotype RER⁺ a été recherché dans de multiples types de cancers. Dans tous les cas, les MIN seraient donc le reflet de nouveaux processus de tumorigénèse. Dans le contexte d'inactivation du système de réparation, plusieurs indications laissent à penser que, bien qu'apparemment aléatoires, les instabilités jouent directement un rôle dans le processus tumoral en altérant des gènes impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire ou de l'apoptose [454].

De même, les défauts des mécanismes de surveillance des dommages de l'ADN suite à des mutations des gènes *BRCA1*, *BRCA2* et *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), sont impliqués dans la genèse de nombreuses tumeurs humaines (telles que les adénocarcinomes du sein et de l'ovaire pour *BRCA1*) [91].

- Dès 1914, Théodore BOVERI avait prédit que la moindre erreur au cours de la mitose pouvait aboutir à une instabilité chromosomique à l'origine du cancer [44]. En effet, dans un certain nombre de cancers humains, on observe une instabilité au niveau

chromosomique conduisant à un nombre anormal de chromosomes (aneuploïdie). Il est maintenant clair que le point de contrôle du fuseau mitotique est une cible importante des mutations conduisant à une instabilité chromosomique [35, 91]. Les anomalies des centrosomes sont considérées comme une des principales causes de l'aneuploïdie générée par la mauvaise ségrégation des chromosomes durant la mitose, conduisant à une instabilité génétique [187, 378].

Chaque cellule fille doit hériter, en sortie de mitose, d'un seul centrosome et d'un génome parfaitement diploïde. La répartition égale des chromosomes entre les deux cellules filles lors de la division cellulaire est dépendante de la fonction normale des centrosomes et de leur duplication méthodique, en une seule fois, à chaque cycle cellulaire. Une mitose anormale produit des cellules aneuploïdes contenant un nombre anormal de centrosomes, deux caractères qui sont devenus des signatures de cellules tumorales [89]. Il a, en outre, été démontré que l'hyperamplification des centrosomes contribue à l'instabilité des chromosomes dans les cancers [304, 378].

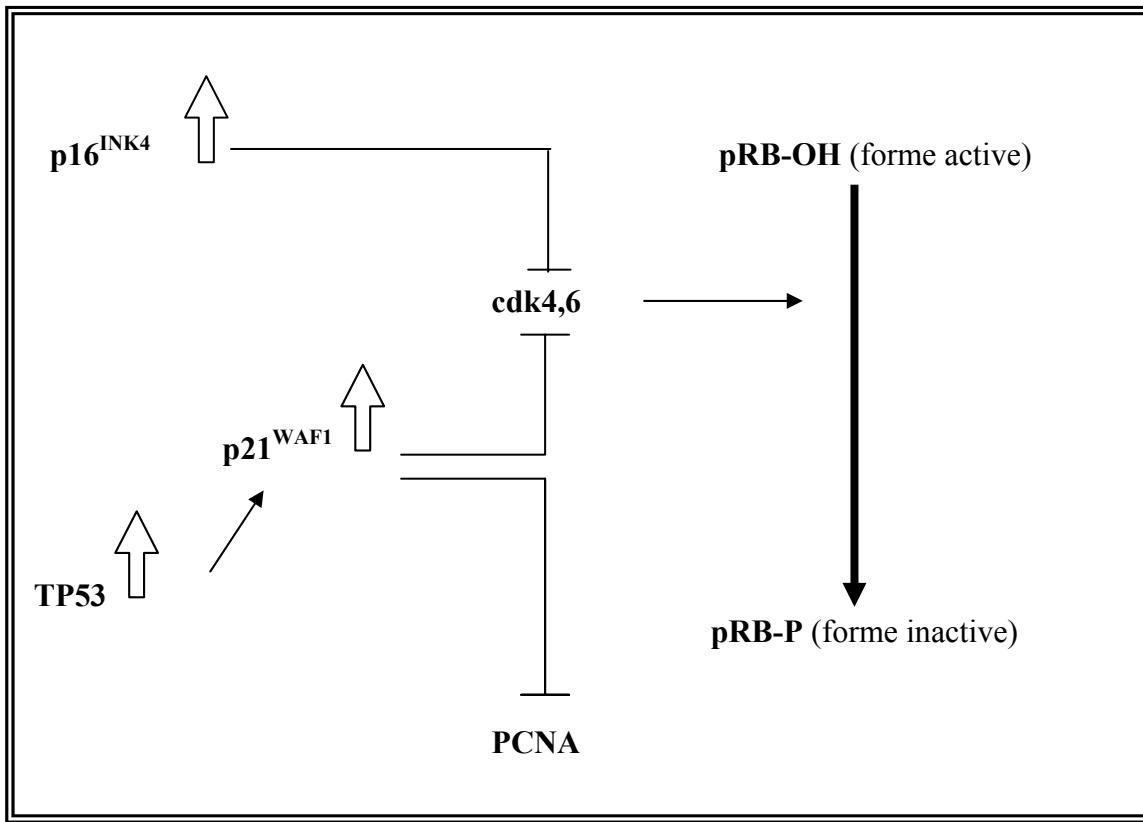
Il semblerait que la protéine TP53 soit impliquée dans la régulation des points de contrôle liés au centrosome lors des transitions des phases G₁/S et G₂/M du cycle cellulaire. De plus, des centrosomes hyperamplifiés ont été mis en évidence dans des cellules n'exprimant pas le gène *TP53* (donc déficientes en protéine TP53) [123] et la protéine MDM2, qui régule la fonction et la dégradation de TP53, est surexprimée dans des cellules où les centrosomes sont hyperamplifiés [64]. Il est ainsi démontré que la perte de la protéine TP53 ou son inactivation aboutit à une hyperamplification des centrosomes conduisant à une instabilité des chromosomes et à des mitoses anormales [304].

I.C L'immortalisation des cellules cancéreuses

I.C.1 Le cycle des divisions cellulaires et la sénescence réplicative

Il y a plus de 30 ans, les observations de HAYFLICK ont montré que la durée de vie réplicative des cellules humaines ou animales normales en culture n'est pas infinie. Après un certain nombre de divisions cellulaires, ces cellules atteignent un état stationnaire appelé sénescence réplicative ou *mortality stage one* (M1) [134]. Dans cet état, les cellules

Figure 4. Mécanismes responsables de l'inhibition du cycle cellulaire lors de la sénescence, d'après OUELLETTE et SAVRE-TRAIN [323].



- Le facteur TP53 contrôle l'expression de nombreux gènes et son activation conduit à l'induction du gène codant pour p21. Cette protéine est un inhibiteur de la prolifération cellulaire qui agit au moins à 2 niveaux : elle inhibe le facteur PCNA (facteur essentiel à la réPLICATION de l'ADN) et elle bloque l'activité des kinases de type cdk4 et cdk6.
- L'induction de la protéine p16, indépendante de l'activation de TP53, a aussi pour effet d'inhiber ces kinases.
- L'inhibition des kinases a pour conséquence d'empêcher la phosphorylation et l'inactivation de pRB. Sous sa forme hypophosphorylée (pRB-OH), la protéine pRB bloque la transition G₁/S. L'incapacité des cellules sénescentes à inactiver pRB produit un arrêt complet des divisions cellulaires.

sont viables, métaboliquement actives, mais ne se divisent plus [244]. Des études récentes suggèrent que la sénescence cellulaire contribue au vieillissement de l'organisme et que son rôle premier est de prévenir le développement des cancers [323].

Lors de la sénescence, deux systèmes indépendants sont mis en action : le système p16/pRB et le système TP53/p21. Leurs effets bloquent le cycle de division cellulaire (figure 4). Dans les cellules sénescantes, la protéine TP53 est activée, les niveaux d'expression de p21 et de p16 sont élevés et la protéine pRB est hypophosphorylée [323].

Lors de la culture primaire des cellules humaines, le moment de l'induction de la sénescence est déterminé par le nombre de divisions cellulaires qui ont été effectuées, plutôt que par le temps chronologique passé en culture [244], ce qui implique l'existence d'une horloge mitotique capable de compter le nombre de divisions cellulaires. L'horloge biologique qui contrôle l'induction de la sénescence de type M₁ est le raccourcissement graduel des télomères qui a lieu lors des divisions cellulaires [38].

I.C.2 Les télomères et la télomérase

Les télomères, découverts par Howard COOKE en 1986, sont des structures essentielles situées aux extrémités des chromosomes qui les protègent contre la dégradation enzymatique, la recombinaison et les fusions interchromosomiques [34]. La longueur des télomères est approximativement de 10 à 15 kb (kilobases) chez les humains [267, 299]. Chez les vertébrés, ces structures sont constituées d'une séquence simple d'ADN (TTAGGG) répétée plusieurs milliers de fois, et de protéines se liant à ces séquences [299].

Les extrémités des chromosomes linéaires sont particulièrement difficiles à répliquer. Du fait du mécanisme de réPLICATION de l'ADN peu efficace, on assiste à un raccourcissement des télomères à chaque division cellulaire. Chez l'Homme, il est démontré que les télomères des cellules mononucléées sanguines se raccourcissent de 20 à 40 pb par an. Cette érosion conduit, dans les cellules normales, à la sénescence de la cellule. Au bout d'un certain nombre de division, un nombre critique de paires de bases est alors perdu, ce qui déclenche un signal pour la cellule qui entre en sénescence réplicative, autrement dit, cesse de se diviser [155, 414]. La longueur des télomères serait ainsi prédictive du pouvoir de réPLICATION des cellules et donc de la durée de vie des cellules (horloge télomérique).

La durée de vie des cellules humaines varie considérablement d'un type cellulaire à l'autre, la plupart possédant une durée de vie relativement courte (d'au plus 100 divisions). Certaines cellules somatiques sont dotées d'une longévité exceptionnelle (comme les cellules souches hématopoïétiques), d'autres, comme les cellules germinales, ont une durée de vie théoriquement illimitée. Le point commun de ces 2 types cellulaires est qu'ils expriment tous la télomérase [189].

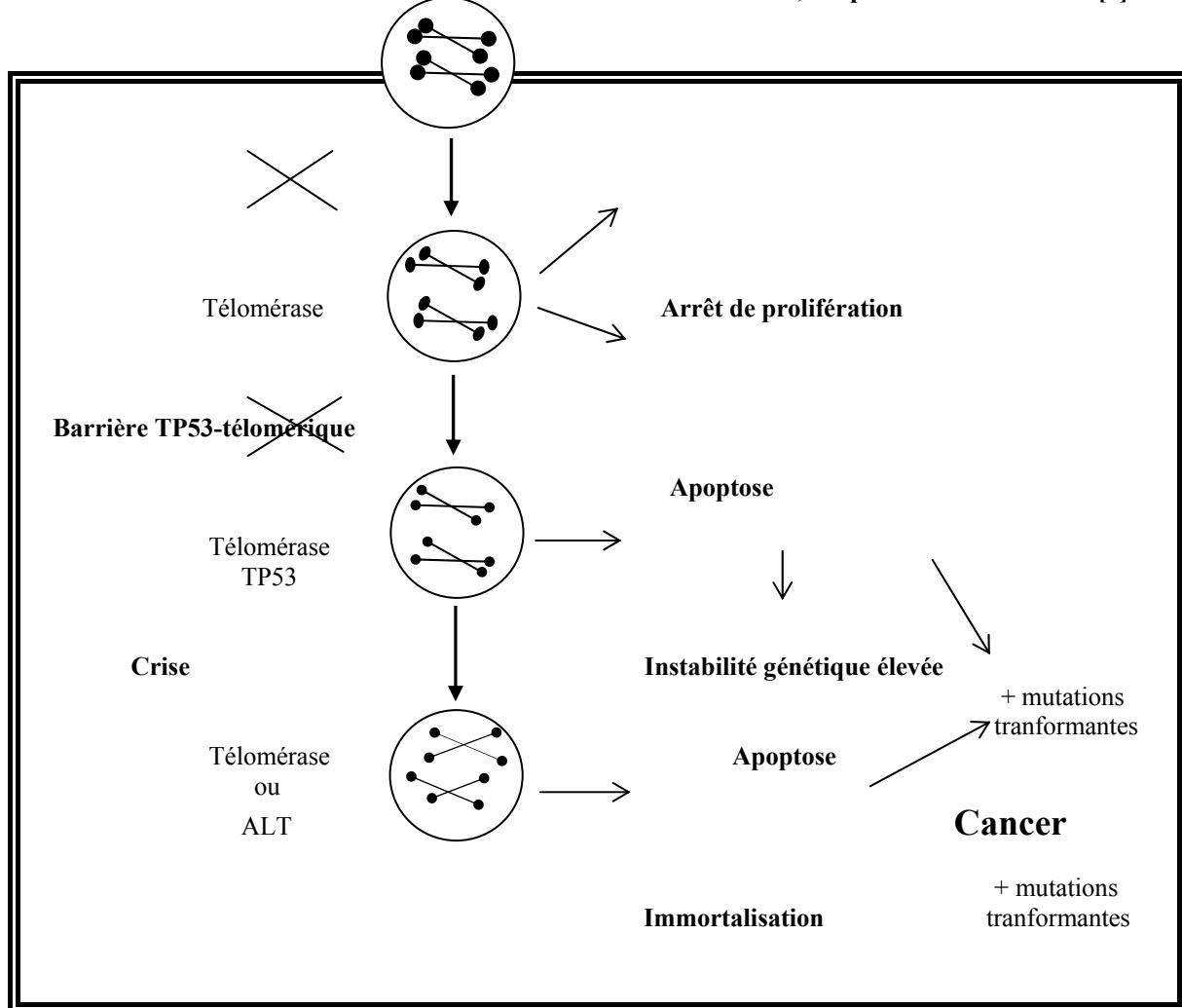
La télomérase est une enzyme constituée d'un composant ARN, l'ARN intégral de la télomérase (hTR) servant de matrice lors de la fabrication de l'ADN télomérique, et de plusieurs sous-unités protéiques incluant une transcriptase inverse (hTERT) qui est capable d'ajouter des séquences (TTAGGG) à l'extrémité des chromosomes [114]. La télomérase a un rôle clé dans le processus d'immortalisation cellulaire en permettant à la cellule de continuer à se multiplier indéfiniment grâce à la "réparation" des télomères, alors que les cellules ne synthétisant pas de télomérase sont ainsi vouées au vieillissement et à la mort.

L'étude des niveaux d'expression des gènes *hTERT* et *hTR* a montré que l'activité de la télomérase est principalement dictée par le niveau d'ARNm codant pour hTERT [323]. L'ARN intégral de la télomérase serait apparemment présent dans toutes les cellules de l'organisme, la protéine hTERT étant l'unique pièce qui manque au système pour pouvoir produire l'activité de la télomérase dans les cellules humaines normales [323].

L'immortalisation des cellules implique la maintenance des télomères, avec ou sans altérations génétiques supplémentaires selon le type de cellules. Ainsi, les cellules humaines mésenchymateuses peuvent être immortalisées par une surexpression seule de la télomérase. Dans certains types cellulaires (tissus épithéliaux), l'immortalisation requiert toutefois un événement additionnel, l'inhibition de la sénescence de type M₀. D'après OUELLETTE [323], BRENNER a démontré que l'immortalisation de ces types cellulaires requiert la présence de la télomérase mais aussi la répression du gène *INK4*. C'est le cas notamment des cellules épithéliales de la glande mammaire [323]. Le rôle joué par M₀ dans le vieillissement de l'organisme et la carcinogenèse n'a toujours pas été défini.

Il faut noter que le déclenchement du processus de sénescence requiert la présence de TP53 (figure 5). La perte de l'intégrité télomérique constitue un signal perçu par les cellules et relayé par TP53. Dans certains cas, et toujours en présence de TP53, des modifications des télomères peuvent aussi déclencher une mort cellulaire par apoptose [7]. Ces contrôles sont appelés collectivement "barrières TP53-télomériques" [7]. Si la protéine TP53 est inactivée, la

Figure 5. Un modèle de développement tumoral concernant les relations entre télomères, prolifération cellulaire et transformation tumorale chez l'Homme et la Souris, adapté selon ANCELLIN [7].



- Les cellules dépourvues de télomérase érodent leurs télomères graduellement, ce qui s'accompagne d'une instabilité génétique qui va en s'amplifiant et qui fait rapidement courir de grands risques à l'organisme, en exposant individuellement chaque cellule à l'émergence de mutations transformantes.
- La perte de l'intégrité télomérique constitue un signal perçu par les cellules et relayé par TP53 : l'activation de TP53 est capable de déclencher une entrée en sénescence, voire d'induire une mort cellulaire par apoptose. Cette limite imposée à la prolifération est appelée barrière télomérique.
- La présence de mutations additionnelles qui inactivent la TP53 va forcer le passage à travers cette première barrière et faire entrer les cellules dans un état d'érosion télomérique extrême et de très forte instabilité génétique, pour aboutir à une mort cellulaire massive, appelée "la crise", qui peut être considérée comme une deuxième barrière télomérique de prolifération, indépendante de TP53.
- Pour surmonter la crise, les cellules doivent absolument réactiver un mécanisme de stabilisation des extrémités télomériques : télomérase ou *alternative lengthening of telomeres* (ALT).
- Il est vraisemblable que de nombreuses cellules cancéreuses ont effectivement surmonté à la fois la barrière TP53-télomérique et la crise. Cependant les cellules qui ont surmonté la sénescence et survécu à la crise ne sont pas forcément cancéreuses, des mutations de gènes suppresseurs de tumeurs ou d'oncogènes sont nécessaires pour acquérir les autres propriétés caractéristiques du phénotype transformé.

prolifération de nombreuses cellules somatiques peut se poursuivre, en l'absence d'une activité télomérase. L'érosion des télomères se poursuit. Cette période est marquée par une instabilité croissante des chromosomes. Après un certain nombre de divisions cellulaires, les cellules (ayant surmonté le premier obstacle de la sénescence) entrent en "crise" et meurent massivement par apoptose. Pour surmonter la crise, les cellules doivent absolument réactiver un mécanisme de stabilisation des extrémités télomériques.

I.C.3 Relation entre télomères, prolifération cellulaire et transformation tumorale

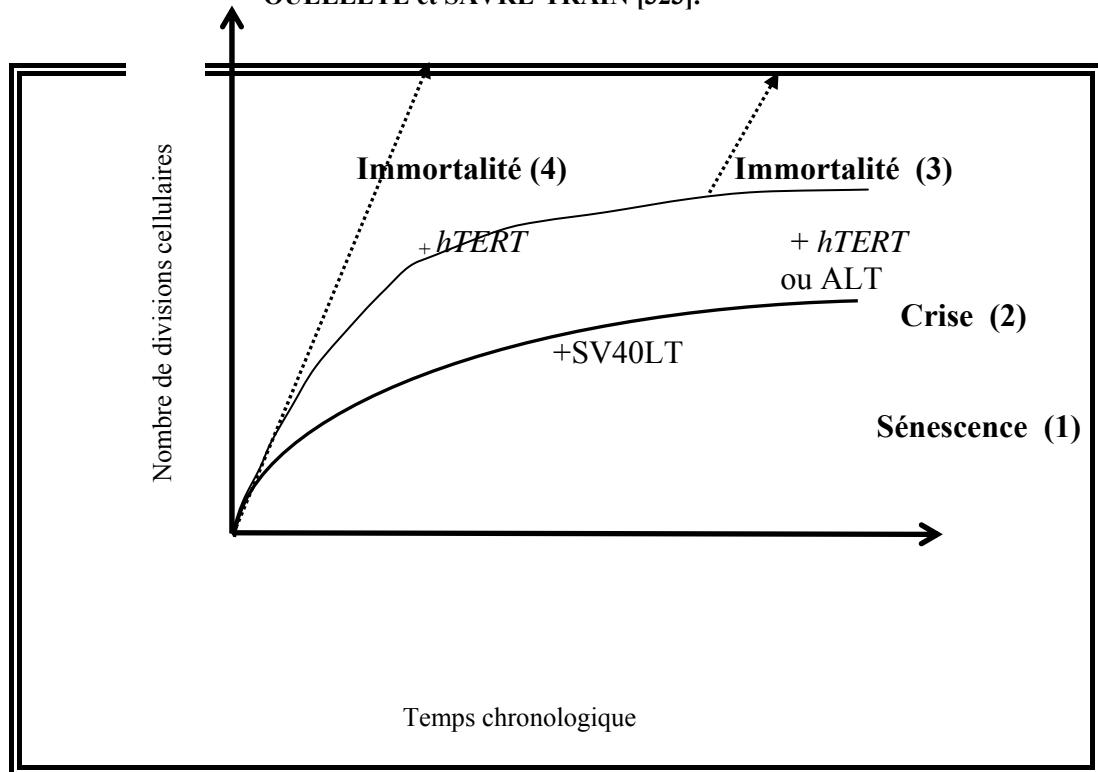
Au cours de la carcinogenèse, plusieurs contrôles de la prolifération cellulaire sont successivement détruits. Chaque étape utilise un grand nombre de divisions cellulaires, ce qui implique une perte accélérée d'ADN télomérique et un vieillissement prématûr des cellules précancéreuses. Pour devenir cancéreuses, ces cellules doivent pouvoir survivre aux effets de la sénescence ou prévenir son induction. Les cellules tumorales sont capables de maintenir une longueur de télomères leur permettant de continuer à se développer. Ainsi, l'analyse des télomères dans les cellules transformées par le virus d'Epstein-Barr montre d'abord une phase de raccourcissement jusqu'à la sénescence. L'inactivation des protéines TP53 ou pRb (et donc des systèmes TP53/p21 et p16/pRB), permet alors d'augmenter la durée de vie des cellules par une reprise de la croissance pendant environ 10 à 20 générations avant la crise. Ces événements (inactivation de ces systèmes par des oncogènes viraux ou des mutations somatiques) sont d'ailleurs très fréquemment observés dans les cellules cancéreuses [463].

L'utilisation de modèles expérimentaux a cependant montré que l'inactivation de ces deux systèmes n'empêche pas l'érosion des télomères et que les cellules transformées ne sont toujours pas immortelles. Après plusieurs divisions additionnelles, un état de crise caractérisé par la mort cellulaire est induit (figure 6) [323]. L'utilisation d'un mécanisme de survie permet parfois à une cellule d'échapper à cette crise et de former un clone immortel :

- Activation du gène codant pour hTERT et induction de la télomérase.
- Mise en place du mécanisme ALT (*alternative lengthening of telomeres*).

Le mécanisme ALT est un dispositif indépendant de la télomérase, encore mal compris, qui permet aux cellules de stabiliser leurs télomères sans réactivation de la télomérase [55]. Selon GUPTA *et al.*, cette notion permettrait, par exemple, de comprendre la présence de rétinoblastomes télomérase-négatifs [145].

Figure 6. Effets de la télomérase et des oncogènes viraux sur la durée de vie des cellules humaines, d'après OUELLETE et SAVRE-TRAIN [323].



- (1) Après un certain nombre de divisions cellulaires, les cellules humaines normales cessent de se diviser et deviennent sénescentes.
- (2) L'antigène grand T du virus SV40 peut se lier à TP53 et pRB (protéines nécessaires à l'induction de la sénescence). Son expression continue (+SV40LT) prévient l'induction de la sénescence et augmente la durée de vie des cellules. Au cours de cette période de sursis, l'érosion des télomères se poursuit. Après plusieurs divisions additionnelles, un état de crise caractérisé par la mort cellulaire est induit.
- (3) Un événement très rare (mécanisme ALT ou activation du gène codant pour hTERT) peut permettre à une cellule d'échapper à cette crise et de former un clone immortel.
- (4) Le gène codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase, hTERT, a été isolé et l'expression forcée de ce gène dans les cellules humaines normales (+hTERT) prévient l'induction de la sénescence et de la crise et conduit à l'immortalité cellulaire.

L'utilisation de ces mécanismes de survie est fréquemment observée lors de la carcinogenèse, les cellules cancéreuses devant venir à bout de la sénescence répllicative pour acquérir un phénotype immortel. Des méthodes de dosage de la télomérase ont, en effet, permis de montrer que la télomérase est réactivée dans plus de 85% des cancers humains [189]. C'est d'ailleurs l'étude des cancers humains et des lignées cellulaires tumorales qui a fourni l'argument le plus convaincant en faveur de la théorie télomérique du vieillissement puisque à la différence des cellules normales qui arrêtent de se diviser et entrent en sénescence, les cellules cancéreuses peuvent se diviser indéfiniment.

Le mécanisme d'activation de la télomérase dans les cellules cancéreuses est actuellement très activement étudié. Les promoteurs des télomérases de cellules humaines et murines ont été isolés et ont des propriétés différentes. L'oncogène *myc* stimule fortement l'activité du promoteur humain. Son expression ectopique est associée à une augmentation de l'activité de la télomérase humaine et à une augmentation de la survie des cellules transfectées [178].

Des études ont montré que l'absence de télomérase peut compromettre la prolifération de cellules tumorales (effet suppresseur de tumeur), probablement en activant les barrières télomériques de prolifération. Mais la perte de la télomérase peut également participer à l'instabilité génétique génératrice de mutations (effet tumorigène). En effet, si malgré cette perte les cellules continuent de se diviser, des anomalies chromosomiques peu compatibles avec une stabilité génétique peuvent apparaître, rendant ces cellules dangereuses pour l'organisme car une instabilité génétique, surtout si elle persiste, va de paire avec l'acquisition d'un phénotype malin [212]. La sénescence limite donc les dégâts engendrés par les mutations spontanées qui provoquent le cancer. L'importance relative de ces deux effets dépend vraisemblablement du stade de développement de la tumeur et/ou de son contexte génétique. Il est également possible que ces effets antagonistes cohabitent au sein d'une même tumeur [7].

Cependant les cellules qui ont surmonté la sénescence et survécu à la crise ne sont pas forcément cancéreuses, des mutations de gènes suppresseurs de tumeurs ou d'oncogènes sont nécessaires pour acquérir les autres propriétés caractéristiques du phénotype transformé défini par l'étude de cellules cancéreuses en culture, c'est-à-dire :

- La perte de l'inhibition de contact.

- La capacité de croître en l'absence de support qui se traduit par le développement de colonies en milieu semi-solide (agar), à partir de cellules isolées.
- L'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance.
- La tumorigénicité après injection dans un organisme immunotolérant (souris "nude").

Ces propriétés phénotypiques ne sont pas obligatoirement manifestées simultanément par toutes les cellules cancéreuses. Ainsi, les cellules transformées sont capables de se diviser indéfiniment mais cette propriété fondamentale peut être dissociée des autres, notamment de la tumorigénicité, et exister seule dans des lignées "précancéreuses".

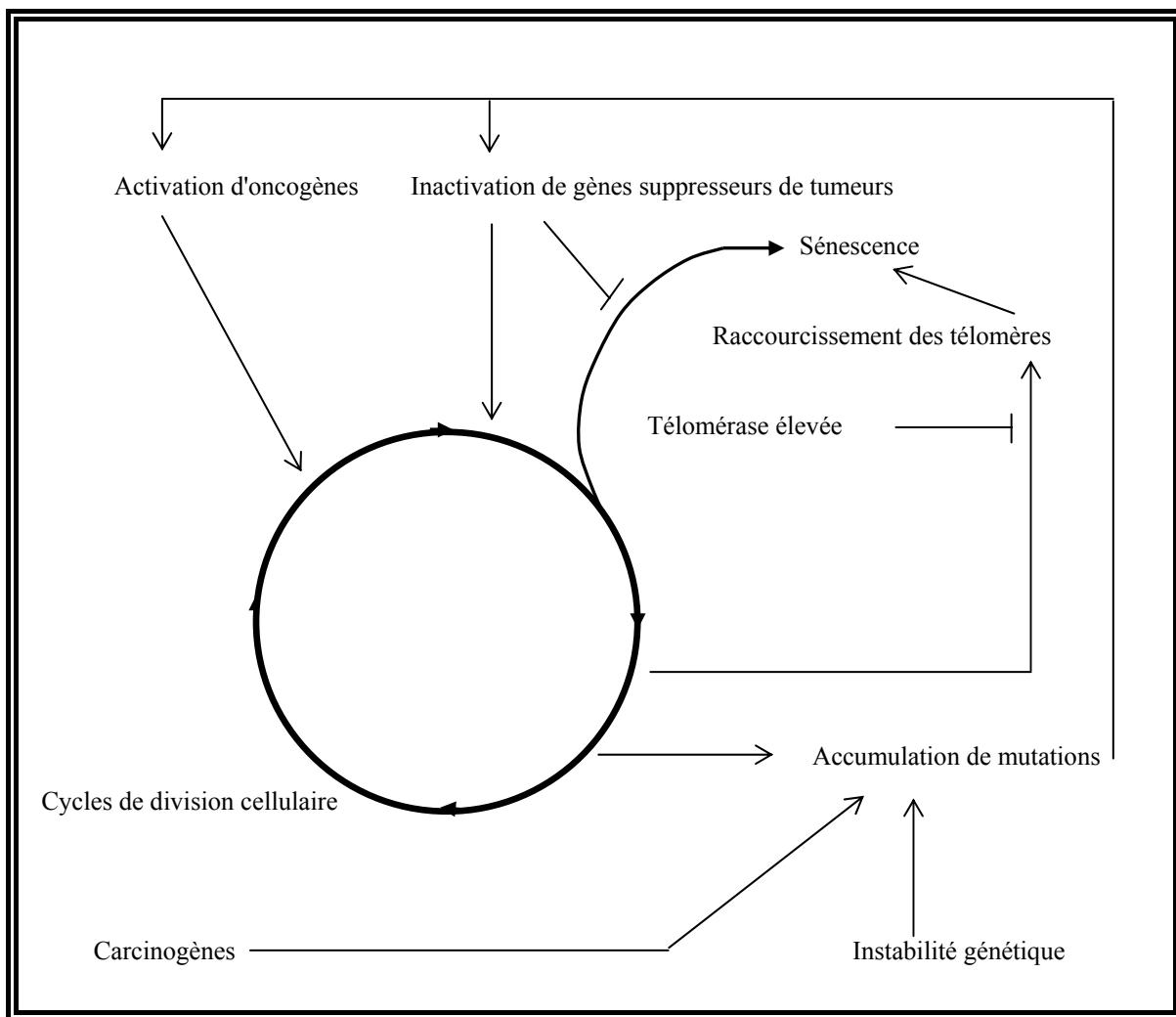
I.D Le cancer : maladie génétique, monoclonale, multi-étapes et multi-factorielle

Les principaux événements génétiques observés lors de la carcinogenèse regroupent l'inactivation de gènes suppresseurs, la surexpression ou l'activation par mutations de proto-oncogènes, la réactivation de la télomérase, l'instabilité des chromosomes et les changements épigénétiques (figure 7) [473]. Moins connus mais également très importants dans la Cancérogenèse, les changements épigénétiques sont définis comme des altérations transmissibles de la fonction du gène intervenant par l'intermédiaire de facteurs autres que des modifications de la structure de l'ADN [205, 363]. La méthylation de l'ADN dans la région promotrice du gène est un de ces changements qui modifient l'expression d'un gène.

La formation d'un cancer s'effectue selon un processus en plusieurs étapes. Son développement est dû à l'accumulation, au fil des générations cellulaires, d'anomalies successives sur différents gènes. Cette accumulation confère un avantage sélectif au clone cellulaire (issu de la première cellule mutée) qui, à chaque mutation nouvelle, devient de plus en plus agressif et échappe aux mécanismes de contrôle. Il s'agit d'un processus multifactoriel car les anomalies génétiques sont multiples et résultent de l'interaction entre le génome d'une cellule et des facteurs environnementaux.

Le concept de la carcinogenèse par étapes successives (*multistep carcinogenesis*), suggéré en 1975 par NOWELL [316] a été depuis largement documenté par les données expérimentales (modèles aviaires, murins et humains de transformations *in vitro*) et les études cliniques des cancers humains.

Figure 7. Schéma récapitulatif de la cancérogenèse moléculaire, adapté selon DE GUNZBURG [91].



- Les carcinogènes (substances chimiques, radiations ionisantes, etc.) ainsi que l'augmentation du nombre des divisions cellulaires provoquent l'accumulation de mutations qui aboutissent à l'activation d'oncogènes favorisant la prolifération, et à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs.
- Ces mécanismes sont amplifiés par l'instabilité génétique résultant de la perte de plusieurs mécanismes assurant la stabilité et l'intégrité du génome.
- Chaque étape utilise un grand nombre de divisions cellulaires, ce qui implique une perte accélérée d'ADN télomérique et un vieillissement prématûr des cellules précancéreuses.
- Cependant, l'augmentation de l'activité télomérase participe à l'immortalisation des cellules, prélude à l'acquisition du phénotype tumoral.

En effet, les chercheurs ont tenté depuis de nombreuses années de reproduire dans des cellules normales cultivées *in vitro* les étapes précoce de la progression vers l'état cancéreux [66] :

- Ainsi, dès 1976, l'analyse du premier virus transformant connu, le virus du sarcome de Rous, a montré que des cultures primaires de fibroblastes embryonnaires de poulet pouvaient être transformées par un oncogène unique, l'oncogène *src*. D'autres oncogènes, comme *ras* ou *myc*, pris séparément, transforment les cellules primaires aviaires de poulet. Cependant, ces cellules ont une durée de vie limitée, sans possibilité d'immortalisation.
- Au début des années 80, l'introduction de deux oncogènes (*myc* et *ras*) dans des cellules primaires de rongeurs a permis de transformer les cellules embryonnaires de rat en induisant la formation de foyers de prolifération même à faible concentration cellulaire. La grande majorité des foyers obtenus était capable de proliférer en culture à long terme et des lignées cellulaires de rongeurs préalablement immortalisées pouvait être transformées par un seul oncogène (probablement parce que les cellules "immortalisées" ont déjà franchi une des étapes essentielles de la Cancérogenèse).

Bien qu'il s'agisse là de conditions expérimentales très réductrices, ne tenant, par exemple, aucun compte des phénomènes de vascularisation et de dissémination tumorales, elles ont néanmoins permis au fil des ans de caractériser des gènes associés au processus tumoral et de confirmer que le cancer est l'aboutissement de multiples événements génétiques.

En 1999, l'équipe américaine de Robert WEINBERG a démontré la possibilité d'induire la transformation maligne complète de cellules normales humaines (cellules rénales embryonnaires et fibroblastes de l'épiderme) par une combinaison de trois gènes. Cette transformation est obtenue en soumettant les cellules immortalisées par l'introduction du gène de la télomérase (le gène *hTERT*) à l'action de deux oncogènes. Le premier est un gène *ras* muté, l'autre l'antigène grand T du virus SV40 (ou LT pour Large T) qui agit en inactivant TP53 et pRB [148].

Récemment, les mêmes auteurs ont progressé dans l'étude de la Cancérisation *in vitro*, en utilisant des cellules épithéliales normales de sein appelées HMEC (*human mammary epithelial cells*) [105]. Ils montrent que la combinaison des trois gènes précédemment cités crée les conditions de la transformation de ces cellules qui sont alors capables de générer des tumeurs par greffe chez des souris immunotolérantes. Une autre notion forte qui émerge est que le niveau d'expression de la protéine Ras oncogénique est essentiel pour la Cancérisation,

les auteurs ayant pu montrer que les cellules exprimant l'oncogène faiblement n'induisaient pas de tumeurs sous-cutanées, ni ne proliféraient nettement en agar mol (en l'absence d'ancre à un support). Une approche cytogénétique leur a permis de constater que toutes les populations de cellules HMEC à bas et hauts taux d'expression de Ras contenaient des altérations caryotypiques de nombres et de formes très variés. Parmi celles-ci, certaines impliquaient le chromosome 8 (trisomie, translocation), responsables d'une augmentation du nombre de copies de *c-myc*. De plus, les auteurs ont démontré l'importance du stroma fibroblastique normal qui entoure la tumeur pour accroître l'efficacité de son induction et le raccourcissement de son délai d'apparition.

Ces résultats, issus d'une conjonction de la biologie moléculaire et de la médecine expérimentale, valident le modèle d'oncogenèse actuel tout en ajoutant à sa complexité et permettent de jeter les bases d'un système expérimental pour mieux disséquer les facteurs qui participent plus ou moins à la cancérogenèse du sein. Il reste à savoir si l'on peut transposer tel quel ce modèle de tumorisation *in vitro* à la cancérogenèse mammaire chez la femme. Plusieurs observations vont dans ce sens alors que d'autres ne sont pas en faveur d'une telle extrapolation [214]. D'une façon générale, l'oncogenèse mammaire reste mal comprise. Les connaissances des événements moléculaires sur les transitions marquant les étapes de la cancérogenèse mammaire (résumées par la séquence hyperplasie - hyperplasie atypique - carcinome canalaire *in situ* - carcinome invasif) sont maigres et il n'existe pas, à l'heure actuelle, de modèle établi de la cancérogenèse multi-étapes dans le cas du cancer du sein. De plus, la détermination du rôle des hormones stéroïdiennes dans la carcinogenèse mammaire reste, à ce jour, un problème complexe.

La carcinogenèse colique, quant à elle, est exemplaire de l'oncogenèse multi-étapes qui fait se succéder, dans une cellule normale de l'épithélium colique, des mutations touchant des gènes suppresseurs et des oncogènes pour aboutir à une cellule transformée capable de métastaser. Un modèle de carcinogenèse moléculaire, faisant intervenir toute une série d'étapes entre la cellule colique normale et cancéreuse, a d'ailleurs été proposé en 1989 par FEARON et VOLGELSTEIN [113]. Les mutations surviennent dans un ordre déterminé parallèlement à la progression phénotypique de tumeur bénigne (polype adénomateux bénin) en tumeur maligne (adénocarcinome invasif). Dans toutes les étapes, des mutations des gènes *mismatch repair* peuvent mener à une instabilité génomique facilitant le développement, par acquisition de mutations supplémentaires, de la prochaine étape. Néanmoins, ce schéma par étape est une simplification excessive de la réalité, le nombre de gènes impliqués dans la

carcinogenèse colique étant sans doute plus important. Ce concept de la carcinogenèse par étapes successives s'applique également au cancer bronchique [489].

Le cancer apparaît lorsque certaines cellules d'un organisme ont perdu la capacité de contrôler leur prolifération et ont réussi à échapper aux mécanismes de surveillance qui, dans ces circonstances, les conduiraient à la mort. Les cellules cancéreuses ne cessent de se diviser ; devenues immortelles et insensibles aux signaux venus de l'extérieur, elles se multiplient à

II. LES TECHNIQUES D'ETUDE PERMETTANT L'ANALYSE DES ALTERATIONS GENETIQUES OBSERVEES DANS LES TUMEURS

Les techniques de détection des anomalies génétiques sont assez variées. Elles diffèrent par leur approche : détection des aberrations chromosomiques, détection des anomalies de la transcription des gènes (surexpression, amplification, mutation, etc.) ou mise en évidence d'anomalies du produit du gène.

II.A Les prélèvements et la fixation des tumeurs

Le choix d'une méthode d'analyse d'un fragment tissulaire nécessite d'adapter un protocole de gestion bien déterminé et une stratégie de partition des prélèvements pour les différentes techniques [13] (tableau 3).

Les prélèvements cellulaires sont obtenus par cytoponction. Ils sont le plus souvent réalisés *in vivo*, par exemple dans les tumeurs mammaires ou ganglionnaires. Ils peuvent également être obtenus à partir de pièces d'exérèse par aspiration à l'aiguille fine dans la tumeur. Les prélèvements tissulaires sont utilisés frais, congelés ou fixés et inclus en paraffine. Le tissu fixé et inclus en paraffine à l'avantage de permettre des études rétrospectives. Pour les techniques de cytogénétique, l'obtention de cellules en cours de division par culture en suspension ou en monocouche est indispensable.

La fixation est une étape essentielle dans la préparation tissulaire. Son but est de s'opposer à l'autolyse tissulaire et de conserver aux tissus une structure la plus proche possible de la structure *in vivo*. La fixation se fait par immersion du prélèvement dans un liquide fixateur et répond à des règles strictes qui motivent le transfert rapide des prélèvements vers le laboratoire. Elle doit être immédiate, se faire dans un volume suffisant de fixateur correspondant à 10 fois le volume de la pièce opératoire, et surtout être brève pour éviter la rétraction cellulaire. Une fixation prolongée est l'obstacle majeur aux techniques immunohistochimiques car les fixateurs agissent en modifiant la structure des protéines. Cependant, l'effet nocif des fixateurs est limité par une durée brève de la fixation. Cette durée dépend de la taille du prélèvement : 1 à 5 heures pour une biopsie, 24 heures pour une pièce opératoire. La résistance partielle des protéines à la fixation et à l'inclusion en paraffine

Tableau 3. Les différentes méthodes pouvant être réalisées à partir des tissus selon leur mode de fixation, d'après AUDOUIN [13].

	Fixation		Congélation	Tissus frais	Prélèvement cellulaire
	Formol	Bouin			
Etude morphologique standard	++	++	-	+	+
Cytogénétique	-	-	-	-	-
Hybridation <i>in situ</i>	++	-	++	+	+
PCR à partir des tissus	++	-	+++	+	+
Immunohistochimie	++	+	+++	+	+ (1)
Cytométrie de flux	+	-	++	+	+

(1) Conservation à -20°C ou -80°C des étalements sur lames afin de préserver la majorité des antigènes
Valeur de la méthode notée (-) à (++) en fonction de la conservation tissulaire

permet de détecter une partie des protéines sur le matériel usuel d'anatomie pathologique. L'activité antigénique peut être restaurée, dans certains cas, par l'action d'enzymes protéolytiques ou par l'effet de la chaleur par les micro-ondes.

Il n'existe pas de fixateur universel idéal. La conservation des acides nucléiques (qui sont, comme les protéines, partiellement masqués ou détruits par la fixation et l'inclusion en paraffine) dépend essentiellement du choix du fixateur. Deux types de fixateurs sont habituellement utilisés. Les solutions de formol à 10 % permettent l'utilisation des tissus fixés pour l'immunohistochimie, les techniques de biologie moléculaire (les solutions de formol en particulier le formol tamponné, conservent la plupart des acides nucléiques) ou de cytométrie de flux. Le liquide de Bouin aqueux ou alcoolique permet une bonne analyse morphologique. Les tissus fixés dans le liquide de Bouin peuvent être utilisés pour l'immunohistochimie, mais ne sont utilisables ni pour les techniques de biologie moléculaire en raison des cassures des acides nucléiques, ni pour les techniques de cytométrie de flux.

La congélation d'un fragment tissulaire à -180°C (azote liquide) est parfois utile en pathologie tumorale. Elle permet une excellente conservation des ADN et des ARN cellulaires ainsi que de la majorité des protéines. Elle peut donc être utilisée pour les techniques d'hybridation et d'immunohistochimie.

II.B Les aberrations chromosomiques

II.B.1 Techniques d'observation des chromosomes

C'est uniquement au cours de la division cellulaire qu'il est possible d'observer au microscope des chromosomes individualisés dont le nombre, la taille et la forme sont constants et caractéristiques pour toutes les cellules somatiques d'une espèce donnée, et qui se regroupent en paires de chromosomes homologues (à l'exception de la paire des chromosomes sexuels, souvent morphologiquement très différents).

La propriété la plus exploitée des chromosomes est de présenter le long de leurs bras, à la suite de colorations ou de traitements particuliers, des bandes plus ou moins colorées dont la succession et la taille constituent un motif précis et reproductible, visible au microscope optique. Cette propriété, très précieuse, permet d'identifier les chromosomes, d'assembler un caryotype, de décrire finement des remaniements chromosomiques ou structuraux, de localiser des marqueurs et de comparer les chromosomes entre eux.

Les progrès combinés des techniques de biologie moléculaire et de microscopie optique et électronique permettent de proposer une image beaucoup plus précise de l'organisation architecturale, topologique, et fonctionnelle de l'ADN au sein des chromosomes eucaryotes et d'identifier les altérations génétiques de grande taille concernant une région chromosomique ou un chromosome entier.

- La cytogénétique (étude du caryotype des cellules) classique utilise des colorants pour mettre en évidence les chromosomes des cellules normales (à partir des lymphocytes sanguins) ou tumorales, avec ou sans dénaturation préalable [468].
- Une coloration simple permet de visualiser facilement la morphologie et le nombre des chromosomes. Une solution de Giemsa tamponnée et diluée à 4% est utilisée pendant 3 minutes. Ce colorant contient des thiazines qui se lient aux groupements phosphates de l'ADN.
- A l'aide du marquage chromosomique, il est possible de mettre en évidence certaines structures d'organisation interne des chromosomes. On parle de "*banding*". Les méthodes de marquage mettent en évidence une alternance de bandes claires et sombres, caractéristiques de chaque chromosome, et qui rendent l'identification plus précise de segments chromosomiques :
 - Les bandes G (Giemsa) sont obtenues par dénaturation enzymatique et les bandes R (Reverse) par dénaturation thermique. Ces deux types de marquage sont complémentaires, ils révèlent l'euchromatine (régions chromosomiques où l'ADN est transcrit).
 - Les bandes C (Centromère) révèlent les régions riches en hétérochromatine constitutive.
 - Les bandes Q (Quinacrine), observées en fluorescence, sont superposables aux bandes G.
 - Les bandes T (Télomère) sont dérivées de la technique des bandes R puisqu'elles représentent les bandes télomériques R particulièrement résistantes à la dénaturation.

Figure 8. Caryotype normal de chienne.

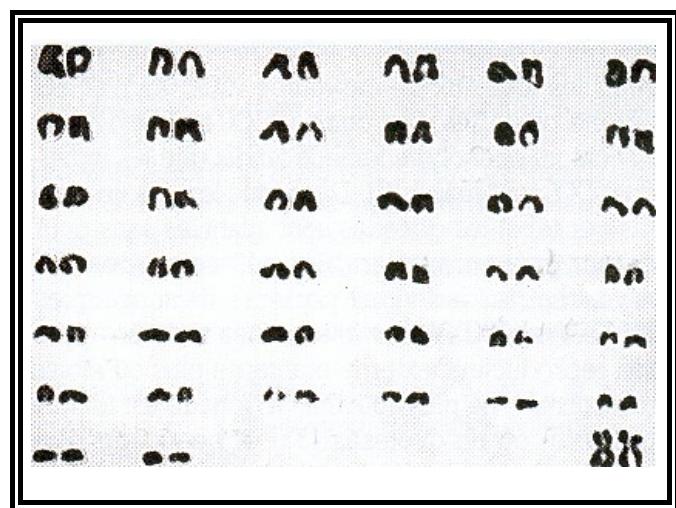
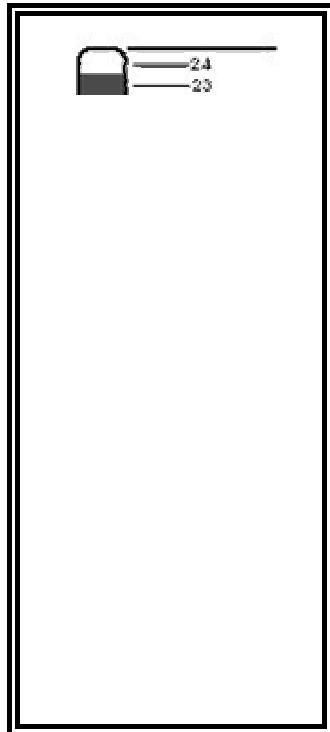


Figure 9. Exemple du chromosome 9 humain.



- Les bandes N (NOR), représentant les régions organisatrices du nucléole (NOR) qui codent pour l'ADN ribosomique, sont mises en évidence par une coloration spécifique à l'argent ou par dénaturation.

Les chromosomes sont ensuite appariés et ordonnés selon leur longueur et la topographie des bandes, deux critères spécifiques d'une paire donnée de chromosomes. Le caryotype permet l'observation et la classification des chromosomes présents au cours de la métaphase (figure 8). Le schéma de bandes fournit la base d'une terminologie commune pour décrire les chromosomes des cellules normales ou pathologiques (figure 9). La technique de bandes la plus fréquente est connue sous le nom de G-banding (*Giemsa-banding*).

L'examen du caryotype constitue un moyen global d'exploration du génome. Il permet de révéler des chromosomes surnuméraires, manquants ou marqueurs (représentant le produit de diverses aberrations de structure). La résolution de la technique cytogénétique classique empêche évidemment a priori d'envisager la détection d'anomalies géniques [24].

- Les progrès réalisés en biologie moléculaire ont permis le transfert des techniques moléculaires à l'étude des tissus et permettent d'explorer des parties de chromosomes trop petites pour être repérées au microscope.

La mise au point dans les années 90, de la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH, *fluorescence in situ hybridisation*), a permis d'explorer la totalité du génome au kilobase près à l'aide de sondes fluorescentes. Cette technique de cytogénétique moléculaire, utilisée sur des préparations cytologiques, permet de visualiser *in situ*, sur les chromosomes métaphasiques ou les noyaux interphasiques, après dénaturation thermique, la réassociation moléculaire ADN-ADN d'une sonde génique ou anonyme spécifique, à sa cible chromosomique. Cette hybridation est révélée par un signal fluorescent spécifique de la sonde.

Les peintures chromosomiques, totales ou partielles, obtenues après tri de chromosomes ou microdissection, sont des cocktails de séquences formant des sondes spécifiques de chromosomes ou des régions chromosomiques. Disponibles commercialement en plusieurs couleurs, ces réactifs bouleversent la cytogénétique, car des remaniements variés précédemment passés inaperçus sont désormais détectables [24, 391].

La technique de FISH permet ainsi de détecter des réarrangements de chromosomes, comme par exemple la délétion d'un locus d'un gène suppresseur de tumeur, accompagnant la mutation sur l'autre allèle du gène.

L'hybridation génomique comparative (CGH) combine des techniques cytogénétiques et moléculaires permettant une analyse détaillée et précise du matériel chromosomique à l'intérieur de la totalité du génome. La CGH consiste à hybrider ensemble un mélange équimoléculaire d'ADN tumoral marqué par la fluorescéine (vert) et d'ADN normal marqué par la rhodamine (rouge), en présence d'ADN Cot 1 (non marqué) comme compétiteur des séquences répétitives, sur des chromosomes humains normaux, véritables micromatrices naturelles. Les images en fluorescence sont saisies par un système d'imagerie numérisée qui permet de classer les chromosomes et d'établir des profils du rapport des fluorescences vertes/rouges le long de ces derniers. La couleur rouge d'un segment de chromosome traduit un déficit de l'ADN tumoral, donc une perte de cette région chromosomique alors qu'un segment de chromosome coloré en vert signe l'excès de séquences de cette région, donc une sur-représentation. Une intense bande verte signe l'amplification de l'ADN tumoral de cette région [24, 391].

Cette technique est particulièrement adaptée à la détection des anomalies quantitatives du génome tumoral. Elle permet de caractériser le génome des cellules tumorales et d'y détecter des anomalies non balancées, comme des délétions, mais ne permet pas de mettre en évidence les aberrations chromosomiques ne mettant pas en jeu de perte ou de gain d'ADN, comme des translocations équilibrées [24].

Afin d'augmenter la résolution de l'analyse (1 à 2 kb), l'ADN peut être étiré sous forme de fibres, après également par des techniques variées (halo, peignage). Ces fibres forment d'excellentes cibles pour la FISH [24].

II.B.2 Etude quantitative de l'ADN

Le déséquilibre quantitatif des chromosomes, par rapport à la situation normale diploïde, est le changement génétique le plus visible durant la cancérogenèse. Ce déséquilibre, mis en évidence sur le caryotype des cellules, peut également être observé lors de l'analyse cytométrique.

Les techniques de cytométrie, représentées par la cytométrie en flux et la cytométrie à balayage par analyse d'image, tiennent une place prépondérante dans le domaine de la cancérologie. L'étude cytométrique des cellules tumorales s'intéresse au contenu en ADN de la population majoritaire composant la tumeur maligne. L'évaluation de la ploïdie de l'ADN (ADN-ploïdie) rend compte quantitativement du degré d'anomalies chromosomiques des tumeurs. La présence de clones tumoraux à contenu en ADN anormal (populations ADN aneuploïdes) peut donc être appréciée.

La cytométrie en flux, la plus populaire de ces deux techniques, permet grâce à l'utilisation de réactifs fluorescents, de réaliser une analyse individuelle, rapide et précise des cellules en suspension. Les cellules en suspension sont guidées dans un fin capillaire, jusqu'à l'extrémité d'une buse, où elles vont traverser le faisceau d'un laser qui va exciter les fluorochromes présents. Chaque fluorochrome correspond à un immunomarquage d'un antigène de surface ou à un agent intercalant de l'ADN. Chacun d'entre eux va émettre une fluorescence qui sera séparée et transformée en signal électrique. Son intensité, exprimée par un numéro de canal, sera visualisée sur un écran par des histogrammes mono ou bi-paramétriques. La vitesse d'analyse (1000-2000 événements/seconde) permet l'examen d'un nombre important de cellules qui peuvent être triées et collectées sur certains appareils. Les prélèvements cellulaires, déjà en suspension, sont utilisés directement. On peut aussi analyser des tissus solides ou des cellules adhérentes à un support. Une suspension de noyaux cellulaires est alors obtenue après dissociation des cellules tumorales et du stroma [13].

La cytométrie par analyse d'image, historiquement plus ancienne, est moins répandue et moins rapide mais offre l'avantage de fournir un contrôle visuel des cellules et des territoires tumoraux analysés. Une coloration spécifique de l'ADN permet d'accéder au contenu en matériel génétique d'un noyau cellulaire par simple mesure de transparence du noyau. Cette transparence est évaluée par l'intégrale de la densité optique sur la surface du noyau. Cette densité optique intégrée est calibrée en valeur d'ADN-ploïdie par référence à une population nucléaire stable normale. L'analyse cytodensitométrique du contenu en ADN des noyaux d'une population cellulaire représentative de la tumeur permet d'obtenir un diagramme d'ADN-ploïdie représentatif de la répartition des différentes cellules dans le cycle. Ces deux types d'histogramme permettent d'étudier la distribution des cellules dans le cycle cellulaire :

- Les cellules contenant 2N chromosomes sont les cellules en G₁ et les cellules non proliférantes.

- Les cellules contenant 4N chromosomes sont en G₂ ou en mitose.
- Entre ces deux valeurs, on trouve les cellules en phase S.

Lorsque le pic dominant ou le pic G₀/G₁ est similaire à un pic G₀/G₁ de référence (d'une population cellulaire diploïde) alors l'histogramme est défini comme diploïde. Dans les tissus normaux et dans la plupart des tumeurs de faible grade ou peu prolifératives, environ 85% de la population cellulaire forme un pic G₀/G₁ et 15% des cellules sont en phase S, G₂ et M.

L'index ADN (DI) est défini par l'importance de la déviation de la quantité d'ADN par rapport à la normale. Les cellules diploïdes correspondent à l'index 1. L'index ADN d'une population cellulaire aneuploïde peut être inférieure à 1 (hypoploïdie) ou supérieure à 1 (hyperploïdie). Lorsqu'il existe plus d'un pic aneuploïde, alors la population cellulaire est multiploïde (il existe plusieurs clones de cellules ayant une quantité d'ADN irrégulière, non multiple de 2N). Elle est tétraploïde lorsque l'on trouve un index DI compris entre 1,9 et 2 et qu'il existe un pic G₂/M. Les tumeurs polymorphes comprennent au moins deux types cellulaires impossible à séparer.

II.C Les altérations des gènes

La majorité des méthodes d'identification des mutations géniques de petite taille (mutations ponctuelles, délétions, insertions ou réarrangements de moins de 500pb), passe par une étape d'amplification en chaîne (PCR pour *polymerase chain reaction*) de l'ADN à étudier, afin d'augmenter la quantité de matériel nucléaire, puis par une étape d'électrophorèse (SSCP pour *single strand conformational polymorphism*), d'hybridation (*Southern blot*, *Northern blot*), parfois les deux, voire de séquençage [217].

II.C.1 Techniques moléculaires de base

Au début des années 70, l'invention des méthodes du génie génétique a permis de créer un outil d'investigation d'une portée considérable. Il est ainsi possible de découper l'ADN en petits fragments, de l'ordre de un ou de quelques milliers de paires de bases, à l'aide d'endonucléases de restriction (enzymes découvertes en 1970), véritables ciseaux moléculaires, ou de transcrire *in vitro* une séquence d'ARN messager (ARNm) en une

séquence d'ADN complémentaire (ADNc), grâce à la transcriptase inverse initialement découverte en 1970 dans les virus oncogènes à ARN.

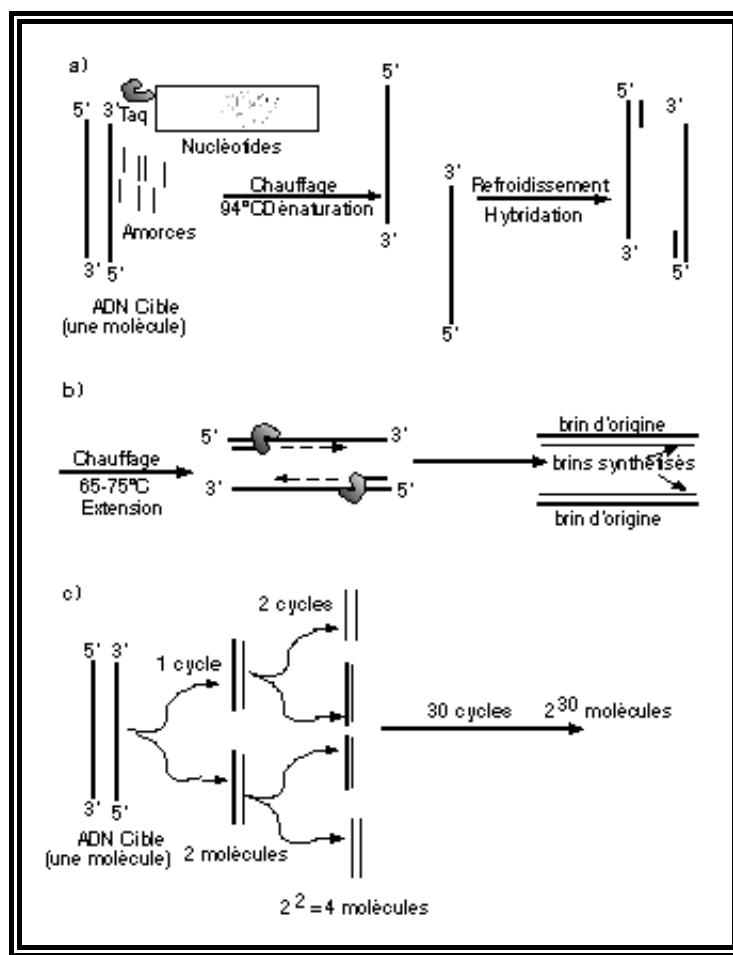
Les stratégies et les techniques d'analyse de l'ADN (et de l'ARN) se fondent sur une caractéristique fondamentale de l'ADN, la complémentarité de ses bases constitutives. Tout fragment d'une de ses deux chaînes s'apparie spontanément à un fragment de l'autre chaîne dès qu'il y a correspondance de leur séquence de base. Cette propriété d'hybridation est mise à profit pour la reconnaissance d'un gène au moyen d'une sonde moléculaire, c'est à dire d'un segment d'ADN bien identifié et marqué avec un traceur radioactif ou fluorescent afin de pouvoir être suivi. De plus, la molécule double brin peut être dénaturée, c'est à dire, rendue simple brin par chauffage à 80°C ou par traitement alcalin. Ces capacités ont conduit à une grande variété de techniques d'analyse des gènes, incluant les plus récentes innovations des puces à ADN.

* Le clonage consiste à produire un fragment d'ADN en grande quantité. Dans ce but, il est inséré dans un vecteur représenté par un fragment d'ADN, le plus souvent circulaire, qui existe dans un organisme de développement rapide et aisément transformable (bactérie, levure ou virus). Comme l'organisme se développe rapidement, on obtient en peu de temps un nombre important de copies du vecteur. Cette méthode, extrêmement lourde et longue, est abandonnée au profit de la PCR lorsque le fragment à amplifier n'est pas trop long (inférieur à 10 kilobases).

* La PCR mise au point en 1985 par Karry MULLIS, est une technique qui a révolutionné la biologie moléculaire. Elle permet de repérer et d'amplifier *in vitro* (broyats de tissus et de cellules), par répétition de réactions d'elongation en présence d'une ADN polymérase et d'amorces nucléotidiques spécifiques, une séquence d'acide nucléique dont on connaît les deux extrémités [435]. Il est ainsi possible de repérer un fragment d'ADN ou de gène précis, même présent en quantité infime dans un mélange, puis de l'amplifier rapidement (figure 10). Les produits d'amplification sont visualisables après avoir été soumis à une migration par électrophorèse en gel d'agarose, puis à une coloration avec le bromure d'éthidium et une révélation aux ultraviolets (figure 11). La vitesse étant dépendante de la masse moléculaire, donc du nombre de bases de l'ADN testé, la présence et la taille des amplicons pourront être vérifiées.

A partir d'un fragment tissulaire analysé sur le plan morphologique, il est ainsi possible d'extraire de l'ADN sur des coupes et ainsi d'analyser certaines séquences d'acides

Figure 10. Principe de la PCR.

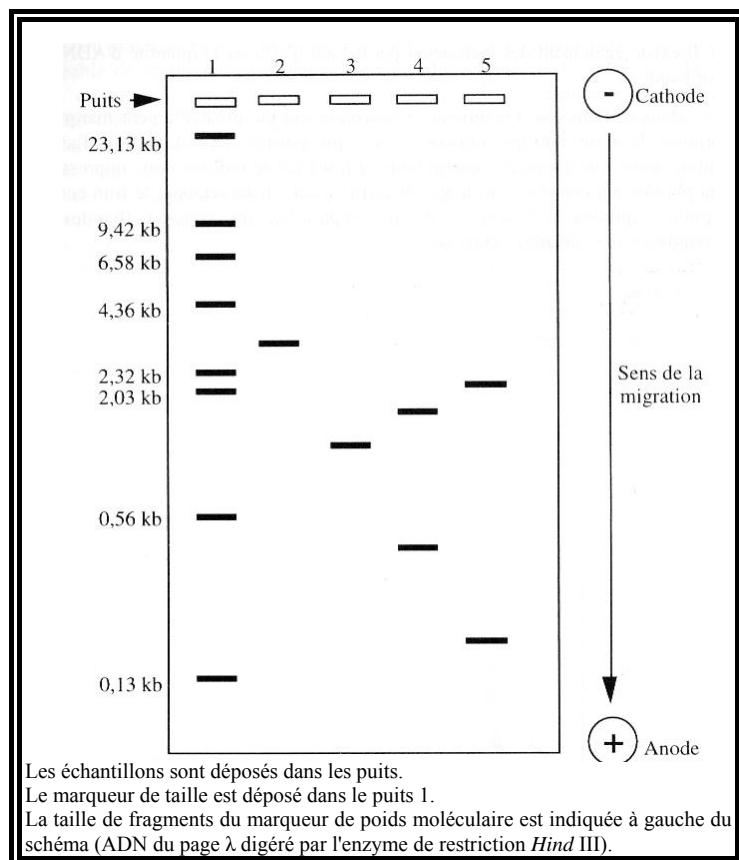


Le principe de l'amplification *in vitro* repose sur la répétition de plusieurs processus :

- La dénaturation des deux brins d'ADN à température élevée (environ 95°C) afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténaires (a).
- L'hybridation d'oligonucléotides (amorces) complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible (la température est alors ramenée à une valeur comprise entre 40°C et 65°C afin de permettre une bonne fixation des amorces) (a).
- La réaction d'elongation (à la température optimale de 72°C), par une ADN polymérase thermostable (la *Taq* polymérase), à partir des amorces hybridées (b).
- Les produits de ce premier cycle sont ensuite dénaturés par la chaleur. Les amorces sont à nouveau hybridées avec les brins d'ADN provenant du premier cycle d'amplification, chaque brin servant de matrice à la polymérase (c).

A chaque cycle, le nombre de copies du fragment d'ADN est doublé : en théorie 2^n molécules sont ainsi obtenues après n cycles. Une telle quantité de molécules dont la taille est connue, est alors facilement repérable par migration dans un gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium.

Figure 11. Principe de l'électrophorèse d'acides nucléiques, d'après TAGU [435].



Des fragments d'ADN obtenus par PCR (produits d'amplification) ou suite à l'action d'une enzyme de restriction (fragments de restriction), peuvent être analysés et séparés suivant leur taille sur un gel d'agarose ou d'acrylamide.

- Le mélange contenant l'ADN est déposé à l'extrémité d'un gel qui est ensuite soumis à un champ électrique.
- Les molécules d'ADN (chargées négativement) migrent dans un champ électrophorétique vers l'anode.
- En passant au travers des mailles de l'agarose, les molécules se séparent selon leur taille : les molécules les plus grandes sont davantage retenues que les molécules plus petites et migrent moins vite donc moins loin dans le gel.
- Afin de visualiser les fragments d'ADN après électrophorèse, le gel est trempé dans une solution contenant du bromure d'éthidium. Cette molécule s'intercale entre les bases des acides nucléiques et possède la propriété d'émettre une fluorescence rouge orange lorsqu'elle est excitée sous la lumière ultraviolette.
- Le gel est alors observé sous une lampe à ultraviolet et les molécules d'ADN complexées au bromure d'éthidium deviennent visibles.
- Comme la distance de migration est proportionnelle au logarithme du nombre de bases, il est possible de déterminer la taille des fragments d'ADN obtenus en comparant leur mobilité électrophorétique à celle de fragments d'ADN de taille déterminée (marqueur de taille).

nucléiques. Il est aussi possible de rechercher des séquences d'ADN (ou d'ARN) après amplification directe sur des coupes tissulaires sans extraction préalable d'ADN du tissu (techniques de PCR et de RT-PCR *in situ*) [13].

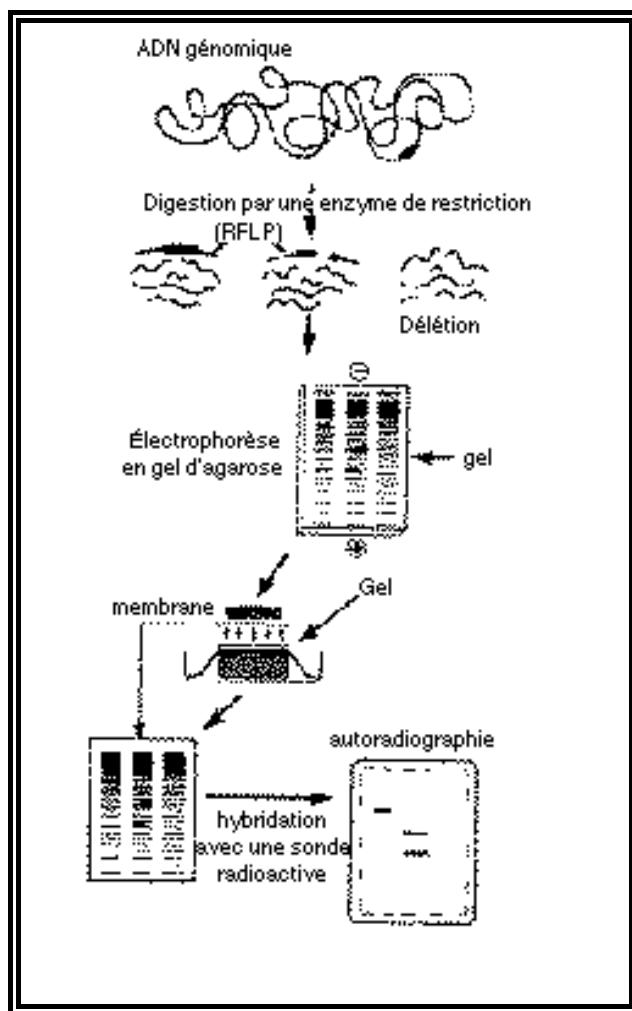
* La RT-PCR (*reverse transcriptase-coupled polymerase chain reaction*) a été développée pour permettre la détection d'un ARNm. En effet, de nombreux ARNm ne sont présents dans les cellules qu'en très petit nombre et les hybridations moléculaires ne sont parfois pas assez sensibles pour détecter des quantités infimes d'ARN cible. Le principe consiste à extraire les ARN totaux des tissus étudiés et de les copier *in vitro* en ADNc simple-brin, grâce à l'action de la transcriptase inverse. Les molécules d'ADNc obtenues servent alors de matrice à une réaction PCR en utilisant un couple d'amorces spécifiques de la séquence de l'ARN d'intérêt. Les fragments obtenus après les cycles de RT-PCR sont visualisables après avoir été soumis à une migration par électrophorèse en gel d'agarose puis à une coloration avec le bromure d'éthidium. La différence avec la PCR réalisée directement sur l'ADN génomique est double :

- D'une part, on met en évidence non seulement l'existence d'un gène (avec ses mutations éventuelles), mais également son expression.
- D'autre part, l'ADNc qui sera soumis à la PCR est différent de l'ADN génomique car dépourvu des séquences introniques, ce qui permet de mettre en évidence des éventuelles anomalies d'épissage.

* L'hybridation moléculaire permet de repérer ou de rechercher une molécule d'ADN ou d'ARN spécifique dans une population hétérogène. Le principe est de marquer, par un traceur radioactif ou chimique (la sonde), la séquence d'ADN connue et purifiée (la cible) que l'on veut récupérer dans une population. Lorsque la molécule sonde reconnaît son homologue dans la population de molécules cibles, elles s'hybrident (figure 12) [435].

- L'hybridation ADN/ADN (la sonde est constituée d'une molécule d'ADN ainsi que la cible), inventée en 1975 par SOUTHERN, est appelée *Southern blotting*.
- L'hybridation ARN/ADN (la sonde est constituée d'ADN alors que la cible est un ARN) est nommée *Northern blotting*.
- On parle de *Slot-blotting* ou de *Dot-blotting* lorsque les acides nucléiques sont déposés respectivement sous forme de trait (*Slot*) ou de gouttes (*Dot*). Ces deux dernières techniques sont plus rapides à mettre en œuvre.

Figure 12. Principe du Southern blot.



- L'ADN à analyser est digéré par une enzyme de restriction.
- On le fait migrer dans un gel d'agarose, chaque fragment d'ADN se positionne dans le gel selon sa taille.
- L'ADN est dénaturé dans le gel par traitement alcalin et transféré (*blotting*) sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon.
- La membrane est hybrideée avec une sonde radioactive de séquence complémentaire à la séquence du gène que l'on cherche à mettre en évidence.
- L'hybridation de la sonde spécifique avec sa séquence cible présente sur la membrane est mise en évidence par autoradiographie de la membrane avec un film radiographique qui sera impressionné par la radioactivité de la sonde fixée à sa cible. Il existe aujourd'hui des sondes "froides" utilisant des techniques de marquage non radioactifs.

A la différence des techniques précédentes qui sont réalisées sur des broyats de tissus, l'hybridation *in situ* s'effectue sur une coupe histologique de tissu, apportant ainsi des informations précises sur la localisation des acides nucléiques étudiés. Cette technique correspond à la détection microscopique d'un signal d'hybridation entre une sonde marquée et les acides nucléiques, ADN ou ARN. Elle est la seule technique de biologie moléculaire permettant de localiser les acides nucléiques dans les différents territoires d'

II.C.3 Techniques de précriblage

Pour la plupart des laboratoires de recherche et de diagnostic, il est préférable d'utiliser une ou plusieurs méthodes de criblage permettant de trier les échantillons et d'établir ensuite, par séquençage ciblé, la nature précise du changement. Les techniques de criblage permettent de tester, en une seule manipulation, plusieurs centaines de paires de bases, afin de repérer la région anormale du gène où se trouve la mutation. Ces méthodes repèrent les mutations non-sens, faux-sens, et les délétions ou insertions créant des protéines tronquées. La plupart nécessite un séquençage secondaire du fragment anormal pour connaître la localisation et la nature exacte de la mutation.

Parmi les méthodes physiques les plus utilisées, l'électrophorèse d'ADN simple-brin ou SSCP (polymorphisme de conformation simple brin) permet la détection de mutations (substitution d'une seule base, micro-insertion ou délétion) dans une région précise d'un gène. Le principe repose sur le fait que, dans un gel de polyacrylamide non dénaturant, les ADN simples brins présentent une mobilité spécifique due à la conformation spatiale résultant de la formation de liaisons hydrogène et électrostatiques. La présence d'une mutation engendre un profil de migration électrophorétique anormal, ce qui est révélé par une variation de migration. Ainsi, deux séquences d'ADN très proches peuvent se différencier sur la base de la conformation de leur forme monocaténaire : deux allèles d'un même gène seront distingués. Cela permet, par exemple, de détecter un allèle mutant chez un individu [343]. Elle peut être utilisée pour détecter un très faible nombre de cellules affectées, avec des substitutions, insertions ou délétions sur une seule base (par exemple des mutations ponctuelles du gène *TP53* ou *ras*).

En pratique, après amplification de la région à étudier (PCR, RT-PCR) et dénaturation, les fragments simples brins vont migrer dans un gel non dénaturant. La détection des fragments peut se faire par différentes techniques, dont le marquage radioactif des amorces ou la révélation du gel par coloration à l'argent. Lorsqu'une mutation est présente, deux bandes supplémentaires, correspondant aux brins sens et anti-sens mutés, sont observables sur le gel.

Cette méthode simple, rapide et efficace, voit cependant sa sensibilité diminuer pour des fragments de plus de 200 pb. Cependant, des produits de PCR de plus grande taille peuvent être coupés par un mélange approprié d'enzymes de restriction, de façon à réduire à 200 pb la taille moyenne des fragments analysés par SSCP.

D'autres techniques physiques, plus complexes et plus sensibles, permettent un criblage rapide d'une portion du génome après amplification génique [217] :

-La DGGE (*denaturating gradient gel electrophoresis*) repose sur la séparation en conditions dénaturantes des homoduplex et hétéroduplex générés après amplification par PCR des ADN normaux et mutés. Cette technique plus complexe que la précédente permet l'étude de produits PCR jusqu'à 600 pb avec une très bonne sensibilité.

-La CDGE (*constant denaturant gel electrophoresis*) et la TTGE (*temporal temperature gel electrophoresis*) sont des variantes de la technique précédente qui permettent l'étude de larges fragments. Elles sont très sensibles et permettent d'éviter l'étape du séquençage car le profil de migration du fragment est spécifique du type de mutation.

II.C.4 Recherche simultanée de mutations dans plusieurs gènes

Les puces à ADN (*DNA chips*) ou microréseaux (*micro arrays* ou *DNA arrays*) permettent l'analyse simultanée de plusieurs milliers de gènes dans un échantillon biologique sain ou malade. Le mot *array* fait référence à un support solide (matrice en verre ou en nylon) sur lequel a été fixé un "jeu" ordonné de sondes d'oligonucléotides et/ou ADNc. Il s'agit donc d'un *blot* classique. L'extraordinaire de la technologie est la miniaturisation du procédé puisque la matrice est de la taille d'une lame de microscope et contient de 10 000 sondes ADNc à 400 000 sondes oligonucléotiques. L'hybridation de cette matrice avec de l'ADN provenant de l'échantillon que l'on veut étudier va donner un profil génotypique caractéristique de cet échantillon. L'ADN à tester est marqué en fluorescence et hybridé avec la matrice, soit seul, soit conjointement avec un ADN de référence marqué par un fluorochrome différent. Le profil obtenu après excitation par laser de la matrice hybridée est la résultante de la "quantité" de l'ADN test par rapport à celui de référence ou de la "qualité" de cet ADN test [217].

Concernant la recherche de mutations, la matrice contient soit n oligosondes de séquence aléatoire pour déterminer la séquence de l'ADN test, soit des oligonucléotides de séquence spécifique des gènes (ou régions des gènes) que l'on veut étudier. L'analyse des données est informatisée. Cette technique permet de rechercher selon les modalités choisies des mutations connues ou non, dans un ou plusieurs gènes. La diffusion de cette technologie dans les laboratoires de recherche ou de diagnostic est actuellement limitée par le coût et par celui de l'équipement nécessaire.

II.D Mise en évidence des produits des gènes

La technique *Western blot* permet de détecter des protéines. Cette technique est globalement la même que la technique *Northern blot*. On utilise une membrane de nitrocellulose et la sonde est représentée par un anticorps spécifique de la protéine que l'on recherche. Un deuxième anticorps permet ensuite de détecter le complexe antigène-anticorps formé.

L'immunohistochimie est une méthode de détection d'une protéine, sur coupe tissulaire ou sur un étalement cytologique, qui se fait à l'aide d'un anticorps, révélé par une réaction colorimétrique enzymatique ou par une substance fluorescente, et observé au microscope. L'immunohistochimie présente de nombreux intérêts en cancérologie puisqu'elle permet de mettre en évidence à l'intérieur ou à la surface de la cellule un constituant spécifique d'un type cellulaire donné. Elle peut ainsi permettre de détecter, entre autres, la présence et la localisation du produit d'un oncogène ou d'un gène suppresseur de tumeur ou d'une protéine intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire.

L'accumulation d'une protéine, suite à une mutation d'un gène peut donner lieu à une autoimmunisation avec production d'anticorps. La détection d'anticorps sériques peut permettre de mettre en évidence la présence du produit d'un gène comme c'est le cas pour la protéine TP53.

II.E Recherche de gènes de prédisposition dans les formes familiales de cancer

Jusque dans les années 80, l'isolement d'un gène passait obligatoirement par l'identification préalable et la caractérisation de son produit. La connaissance de la protéine permet de déduire les caractéristiques de l'ARN messager à partir duquel elle est traduite, puis de "remonter" au gène dont la transcription a donné l'ARNm. Dans le courant des années 80, une nouvelle démarche s'est développée, grâce à l'établissement de cartes génomiques de plus en plus denses. Il s'agit de la "génétique inverse" par opposition à la "génétique classique". Elle consiste en l'identification directe de gènes impliqués dans des maladies héréditaires (et donc dans les formes familiales et héréditaires de cancers) dont la protéine défective est inconnue, à partir de leur localisation sur l'ADN génomique. Le terme de génétique inverse a

été abandonné pour celui de clonage positionnel qui correspond à l'isolement du gène à partir de sa position sur l'ADN [12].

➤ Il s'agit, tout d'abord, de mettre en évidence des familles au sein desquelles il existe un haut risque de survenue de cancers comme les cancers du colon, de l'ovaire ou du sein. Cette étape correspond à la recherche de pedigrees dans lesquels ségrège la maladie à étudier. L'analyse de ces familles doit être extrêmement stricte. La méthode de référence est la comparaison entre le risque relatif de cancer chez les membres de la famille ayant une relation de parenté au premier degré et le risque relatif de la population générale.

➤ Les analyses de ségrégation sont basées sur des modèles mathématiques qui permettent de déterminer la probabilité d'une prédisposition génétique (dominante, récessive, polygénique) ou d'une prédisposition plutôt liée au mode de vie ou un mélange des deux. Ces analyses ont permis, dans la plupart des familles où l'on observe une incidence élevée d'un type de cancer (sein, ovaire, colon), d'orienter vers une prédisposition génétique liée à la présence d'une mutation rare et affectant un petit nombre de familles. L'hétérogénéité des cas et des familles justifie que ces analyses soient menées à une large échelle, sur des arbres généalogiques aussi étendus et complets que possible.

➤ Les études de liaison permettent ensuite de déterminer la localisation régionale du gène, grâce à l'exploitation de la carte du génome humain.

➤ L'étape suivante correspond au clonage du gène responsable de la maladie. Une fois la localisation génétique du locus obtenue, la région isolée est encore très grande. Dans le cas où aucun indice ne pourrait orienter la recherche du gène, on essaie tout d'abord de réduire au minimum la portion d'ADN le contenant. On a ensuite recours à des techniques de biologie moléculaire. Dans une banque d'ADN génomique, on recherche les fragments qui contiennent les marqueurs (de séquence nucléotidique connue) encadrant le *locus* morbide (inconnu). Ces fragments sont supposés contenir tout ou une partie du gène recherché. On isole donc un ou plusieurs fragments d'ADN génomique de quelques centaines de kilobases, contenant le *locus* morbide.

➤ Il faut ensuite démontrer que le gène recherché est atteint, c'est à dire prouver que le fragment d'ADN cloné comporte au moins un gène et que l'un de ces gènes est bien celui que l'on recherche [12]. Sans entrer dans les détails, il est alors possible de :

- Mettre en évidence des exons (séquence de gène dont le transcript persiste dans l'ARNm mature après épissage des introns).
- Déterminer la séquence nucléotidique de l'allèle normal et la comparer à celle que l'on rencontre chez les individus malades : on peut trouver une différence qui peut être par exemple une délétion, une inversion ou une mutation ponctuelle. Dans ce dernier cas, il faut montrer que cette mutation n'est pas un simple polymorphisme.

Une autre stratégie particulièrement intéressante est l'approche "gène candidat". Une fois que l'intervalle de localisation est le plus restreint possible, une recherche dans les banques de données permet de savoir si des gènes, de la même espèce ou d'une espèce différente, ont déjà été localisés dans cette région. Si tel est le cas, on peut déjà rechercher si, parmi les gènes présents dans cet intervalle, certains apparaissent comme de bons candidats et si, au sein de ces gènes sélectionnés, des mutations sont impliquées dans le phénotype étudié [186]. Cependant, rares sont les cas où la suspicion d'un gène candidat a pu conduire à l'identification de gène de prédisposition au cancer.

Cet aperçu montre que les techniques moléculaires de détection des anomalies d'un gène sont très diverses. Spécificité et sensibilité varient d'une technique à l'autre et sont généralement inversement corrélées à la facilité de la mise en œuvre de celle-ci. On distinguera donc les techniques réservées à la recherche médicale des techniques que l'on peut utiliser en routine.

III. LES PRINCIPALES ANOMALIES GENETIQUES OBSERVEES DANS LES TUMEURS HUMAINES

La relation causale entre la survenue d'un cancer et l'existence d'altérations génétiques est désormais bien établie. La compréhension de ce phénomène complexe qu'est la carcinogenèse passe par l'identification de ces nombreuses altérations génétiques ou mutations, dont tout ou une partie est responsable soit de l'initiation, soit de la progression tumorale. Le génie génétique et le programme de décryptage du génome humain ont accéléré l'identification des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs.

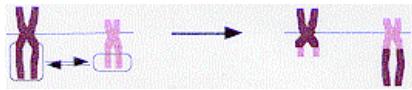
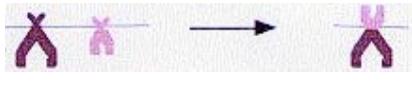
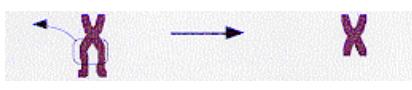
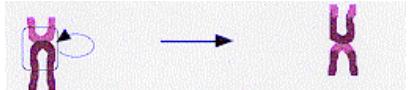
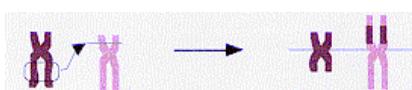
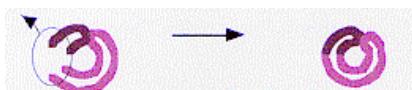
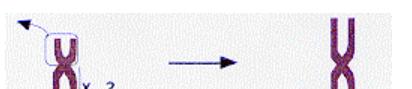
III.A Les aberrations chromosomiques

La présence d'anomalies chromosomiques dans les cellules cancéreuses humaines a d'abord été mise en évidence dans les hémopathies. L'extension de l'analyse cytogénétique aux tumeurs solides s'est avérée beaucoup plus délicate en raison de la difficulté de leur mise en culture et du nombre et de la complexité de leurs anomalies chromosomiques [24]. Il est maintenant démontré que la plupart des tumeurs malignes humaines présentent des aberrations chromosomiques structurales (translocations, délétions ou amplifications) ou numériques, répertoriées dans des bases de données [280]. La plupart de ces aberrations sont acquises, elles se développent lors de la formation de la tumeur.

➤ Les anomalies de structure proviennent de cassures chromosomiques qui peuvent engendrer de nombreux réarrangements chromosomiques. Ces aberrations chromosomiques peuvent affecter la fonction des gènes localisés dans ces régions altérées, selon divers mécanismes (tableau 4) :

- Le gain de matériel génétique va de simples sur-représentations de segments chromosomiques, de signification moléculaire encore mal connue, à des amplifications assez fréquentes dans certains types de tumeurs solides. Sur les caryotypes, on reconnaît l'amplification génique de deux façons [391] :
 - Sous forme de régions hypercolorantes (HSR pour *Homogeneously Staining Regions* ou ABR pour *Abnormally Banding Regions*), segments de coloration homogène attachés à un ou à plusieurs chromosomes, faits de duplications en tandem d'une séquence génique.

Tableau 4. Anomalies chromosomiques visibles sur un caryotype.

Translocation réciproque	Echange entre deux chromosomes d'une partie de leurs bras	
Translocation Robertsonienne (fusion centrique)	Réunion centromérique de deux chromosomes acrocentriques avec perte de leurs bras courts	
Délétion	Perte d'un segment au sein d'un chromosome	
Inversion péricentrique	Un chromosome se casse de part et d'autre du centromère et se recolle de manière erronée	
Insertion	Un fragment de chromosome se casse, les régions flanquant ce fragment se recollent et le fragment se réinsère à un autre endroit, soit sur le même chromosome, soit sur un autre chromosome	
Chromosome en anneau	Délétions plus ou moins étendues aux deux extrémités d'un chromosome et recollement du segment intermédiaire (par absence de télomères), aboutissant à une structure annulaire	
Isochromosome	Perte d'un bras entier d'un chromosome, remplacé par la duplication de l'autre bras	
Chromosome marqueur	Elément chromosomique de taille variable non reconnaissable (chromosomes hautement remaniés)	
Fragments double minute (DM)	Très petits éléments supplémentaires, souvent par deux	
HSR (<i>homogeneously staining region</i>)	Région de coloration homogène et de taille variable, présente au sein d'un ou de plusieurs chromosomes	

- Sous forme de gènes double minute (DM), petits points sombres de chromatine, vus en fin de métaphase, pouvant correspondre à la première phase d'amplification génique ; ils s'intègreraient ensuite pour former des HSR.
- La perte d'information génétique, par délétion, translocation déséquilibrée ou tout autre mécanisme, entraîne une perte d'hétérozygotie ou de fonction. La perte d'hétérozygotie a été associée à la délétion d'une partie plus ou moins importante du chromosome contenant des gènes suppresseurs de tumeurs (exemple du rétinoblastome).
- La formation de gènes de fusion, dont l'exemple classique est celui du sarcome d'Ewing (tumeur osseuse maligne de l'enfant et du jeune adulte) avec la fusion des gènes *FLII-EWS* consécutive à la translocation t(11;22)(q24;q12), peut aboutir à l'expression d'une protéine anormale [24].

Les altérations génétiques correspondant aux anomalies des chromosomes sont souvent complexes. Alors que beaucoup de ces aberrations semblent être dues au hasard, reflétant l'instabilité du génome des tumeurs, certaines pourraient être spécifiques de tumeurs. Ainsi, actuellement, plus d'une vingtaine de types tumoraux humains sont caractérisés par des remaniements récurrents (tableau 5) [24]. Les analyses moléculaires menées à partir de ces données ont abouti à l'identification des gènes impliqués dans les remaniements et ont permis de proposer pour ces tumeurs des modèles fondamentaux de carcinogenèse [24].

Plusieurs régions chromosomiques contenant des oncogènes sont amplifiées dans les tumeurs du sein (par exemple 17q11-12 contenant l'oncogène *erbB-2*, 8q12 et 8q24 avec entre autres le gène *myc*). Il est également décrit un nombre élevé de délétions de larges segments de chromosomes (par exemple les segments 8p, 16q, 17p), susceptibles de contenir un gène suppresseur de tumeur [174].

➤ Les cellules cancéreuses présentent très souvent des anomalies du nombre de chromosomes, provenant soit d'une ségrégation inégale des chromosomes, soit d'un défaut de cytokinèse, c'est-à-dire de séparation des 2 cellules filles. Si la cellule ne possède plus le contrôle lui signalant que la mitose est anormale, elle poursuit alors sa division pour produire des cellules aneuploïdes.

**Tableau 5. Exemples d'anomalies chromosomiques des tumeurs humaines,
d'après MORRIS et DOBSON [295].**

Tumeurs	Anomalies chromosomiques	Gènes
Leucémie myéloïde chronique Leucémie aiguë myéloblastique promyélocyttaire Leucémie aiguë lymphoblastique de type Burkitt Lymphome folliculaire	t(9;22)(q34;q11) t(15;17)(q22;q11-12) t(8;14)(q24;q32) t(14;18)(q32;q21)	<i>ABL</i> et <i>BRC</i> <i>RARA</i> et <i>PML</i> <i>MYC</i> et <i>IgH</i> <i>IgH</i> et <i>BCL2</i>
Liposarcome Rhabdomyosarcome alvéolaire Sarcome d'Ewing Rétinoblastome Tumeur de la thyroïde Méningiome, neurinome de l'acoustique	t(12;16)(q13;p11) t(2;13)(q35;14) t(11;22)(q24;q12) del(13)(q14q14) t ou inv(10q11) del(22)(q12)	<i>CHOP</i> et <i>FUS</i> <i>PAX3</i> et <i>FKHR</i> <i>EWS1</i> et <i>FLII</i> <i>RB1</i> <i>RET</i> et <i>PTC</i> <i>NF2</i>

Entre parenthèses : les chromosomes entre lesquels se sont faites les translocations (t), délétions (del) ou inversion (inv).

(q) correspond au bras court du chromosome impliqué dans le remaniement, il est suivi du nombre représentant la région du bras.

(-22) signifie perte d'un chromosome 22.

Les tumeurs contiennent fréquemment des éléments aneuploïdes ou multiploïdes (c'est à dire avec un contingent contenant plusieurs clones de cellules ayant une quantité d'ADN irrégulière, non multiple de 2N). Dans le cas du myélome multiple, par exemple, on retrouve une hypoploïdie dans 15 à 25% des cas et une hyperploïdie dans 50 à 65% des cas. De plus, dans la majorité des cas, le nombre de chromosomes surnuméraires des plasmocytes oscille entre 1 et 10 [204]. Ce nombre est bien modeste quand on le compare aux grandes hyperploïdies des cancers. Par exemple, dans le cancer du sein, les index ADN oscillent entre 1,20 et 1,90 [30]. De plus, la présence d'hypoploïdie dans les cancers du sein n'est pas fréquente (environ 2%) [122]. Les lésions mammaires non cancéreuses sont très rarement aneuploïdes [19].

Un nombre anormal de centrosomes associé à une aneuploïdie est très souvent rencontré dans les cellules tumorales. Ainsi, dans le cancer du sein, des anomalies de taille, de forme ou de nombre des centrosomes sont fréquemment observées [224]. De plus, il existe une corrélation positive significative entre le nombre d'anomalies des centrosomes et le niveau du déséquilibre chromosomique. En outre, il a été montré que l'apparition d'anomalies de type aneuploïdie et amplification des centrosomes serait due à une activité anormale (surexpression ou absence) de protéines kinases impliquées dans la ségrégation des chromosomes et de la cytokinèse [89].

III.B Exemples de gènes impliqués dans la Cancérogenèse

Un aperçu des principaux gènes décrits dans les cancers humains et en particulier dans le cancer du sein de la femme permet de se faire une idée du rôle qu'ils jouent dans la formation de certains cancers lorsqu'ils sont altérés.

III.B.1 Gènes suppresseurs de tumeurs

III.B.1.a Le gène *TP53*

➤ Structure du gène et de la protéine

Le gène *TP53*, considéré dans un premier temps comme un oncogène, est le premier gène suppresseur de tumeur identifié chez les humains. Il code pour une phosphoprotéine

nucléaire de 393 acides aminés, la protéine TP53, de 53 kilodaltons, découverte en 1979 par Arnold LEVINE et David LANE [208] et élue molécule de l'année en 1993.

Le gène *TP53*, situé sur le bras court du chromosome 17 chez l'Homme, apparaît très bien conservé au cours de l'évolution des espèces. Sa séquence est maintenant parfaitement déterminée (figure 13). Il est composé de 11 exons et de 10 introns. L'exon 1 est toujours non codant et la distribution des exons et des introns est globalement identique si on compare les gènes *TP53* de l'Homme, de la Souris, du Rat et du Hamster [420].

Chez les humains, le gène *TP53* possède le plus souvent un polymorphisme dans sa région codante (changeant l'identité de l'acide aminé Arg/Pro), au niveau du codon 72 (CGC/CCC). Un certain nombre d'autres polymorphismes sont observés dont des substitutions de bases aux codons 21, 36, 47, 148 et 213 [25]. Les polymorphismes retrouvés sur le gène humain *TP53* pourraient être associés à une plus grande susceptibilité à développer des cancers [419].

La protéine TP53 possède plusieurs domaines de structure correspondant à des domaines fonctionnels (figure 14). Cinq domaines hautement conservés durant l'évolution ont été identifiés. Quatre de ces cinq domaines (II à V) sont localisés dans la région centrale de la protéine [420]. Le domaine C-terminal possède la propriété de détecter les lésions nucléiques et d'activer la protéine TP53 en un état actif, lui permettant de se fixer à l'ADN cellulaire au niveau de certains sites. L'état de phosphorylation des domaines N- et C- terminaux régule également la propriété de fixation du domaine central. Cette fixation du domaine central entraîne la transactivation de certains gènes par le domaine N-terminal [420].

➤ Rôles de la protéine TP53 sauvage

Les rôles du produit du gène sauvage *TP53* sont très complexes et encore incomplètement compris. La protéine TP53, présente en faible quantité dans le noyau des cellules normales, est définie comme un facteur de transcription nucléaire ayant diverses fonctions incluant la régulation du cycle cellulaire, la maintenance de la stabilité du génome, l'induction de l'apoptose dans les cellules stressées, la détection des réparations de l'ADN et la régulation d'autres facteurs de transcription [138].

Figure 13. Le gène *TP53* humain, d'après SOUSSI [419].

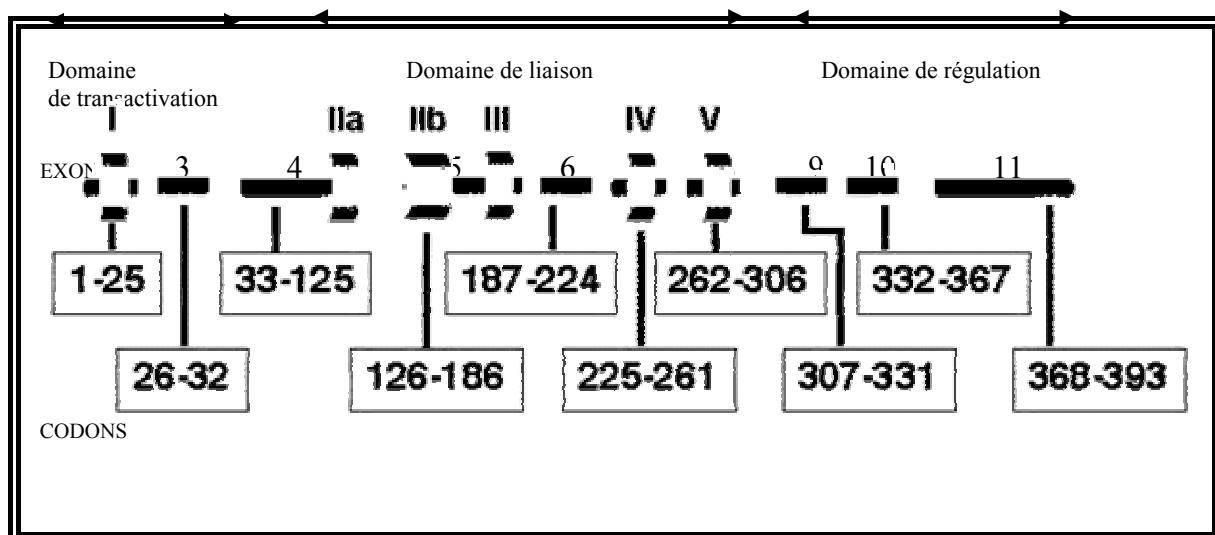
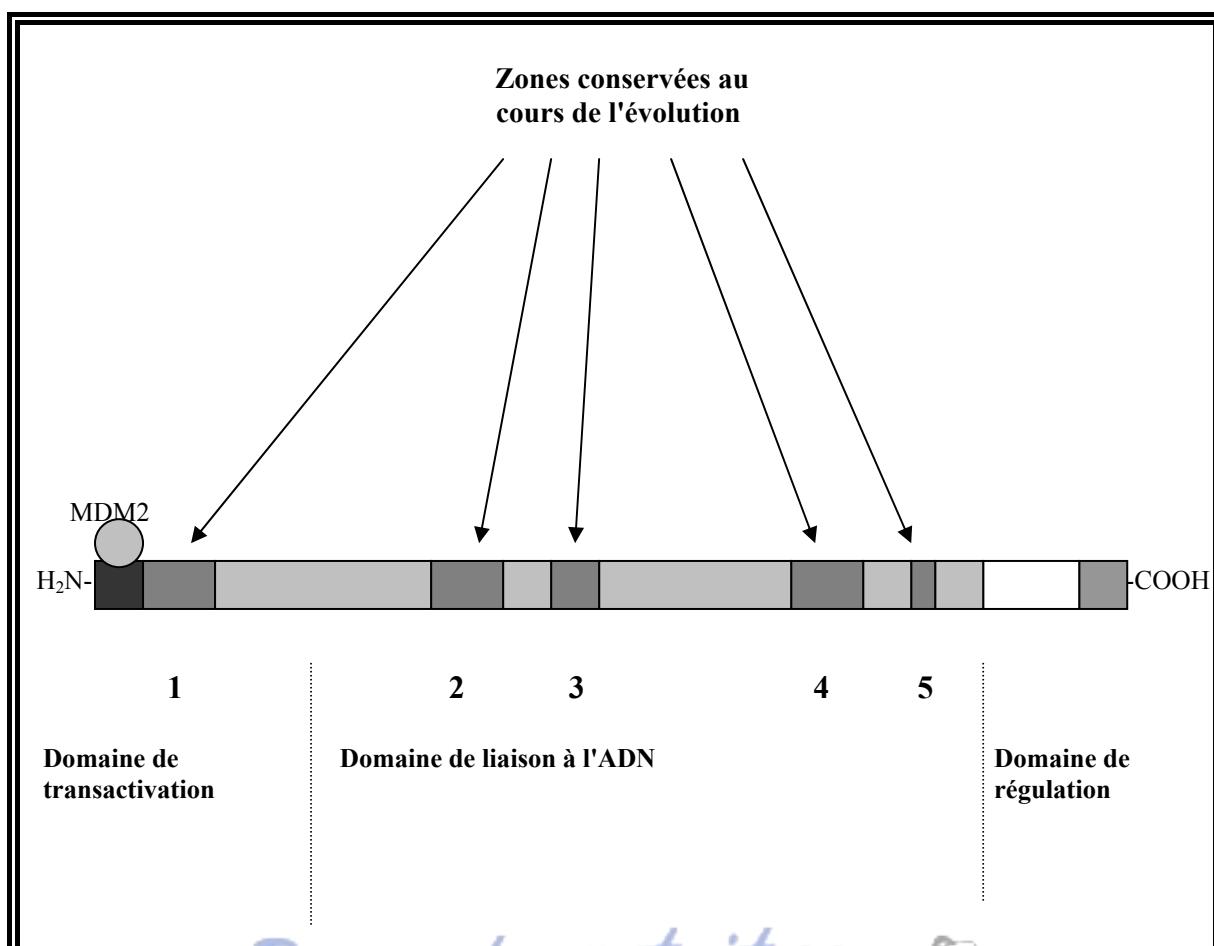


Figure 14. Schéma de la structure biochimique de la protéine TP53 humaine, d'après SOUSSI [421].



Dès que la cellule est stressée (manque d'oxygène, activation de certains oncogènes, infection virale) ou endommagée, la concentration en TP53 augmente grâce à une diminution de sa dégradation physiologique. Cette accumulation de protéine TP53 sauvage peut avoir deux effets exclusifs sur les cellules (figure 15) [416] :

- Un blocage transitoire du cycle cellulaire au niveau des phases G₁ et G₂, mis à profit par la cellule pour induire une réponse lui permettant la réparation des lésions. Ce blocage sera levé quand la machinerie cellulaire aura réparé la lésion.
- L'induction de l'apoptose des cellules si les lésions de l'ADN ne sont pas réparées, par l'intermédiaire de son activité transcriptionnelle sur le gène *Bax-1*.

Les voies de signalisation qui activent la protéine TP53 ainsi que ses partenaires après ces divers stress cellulaires sont multiples (figure 16) [131]. L'ensemble de ces phénomènes contribue à la stabilité de l'intégrité génétique puisque grâce à la protéine TP53, les cellules contenant un ADN endommagé ne pourront plus se diviser et transmettre les anomalies de leur génome aux cellules filles, ce qui a valu à la protéine TP53 le nom de gardienne du génome.

➤ Inactivation de la protéine sauvage

L'inactivation des fonctions de la TP53 se fait principalement par deux modalités :

- Les mutations du gène représentent le mécanisme le plus fréquent d'inactivation de la protéine TP53 dans les cancers. La protéine TP53 est alors soit absente ou tronquée, soit anormale et donc non fonctionnelle. La présence de mutations du gène *TP53* peut être la conséquence de l'action d'un agent carcinogène (rayonnements UV dans les cancers cutanés, aflatoxine B et virus de l'hépatite B dans les cancers hépatiques, tabac dans les cancers du poumon...), soit celle d'un processus spontané.
- Des interactions avec différentes protéines peuvent aussi moduler l'activité de TP53. Ainsi, l'inactivation fonctionnelle du gène *TP53* peut être due, en particulier dans certains sarcomes des tissus mous, à la surexpression de la protéine MDM2 conduisant à la formation d'un complexe inactif TP53/MDM2 qui bloque le domaine de transactivation de la protéine TP53 [416].

Figure 15. *TP53* gardien du génome, d'après SOUSSI *et al.* [416].

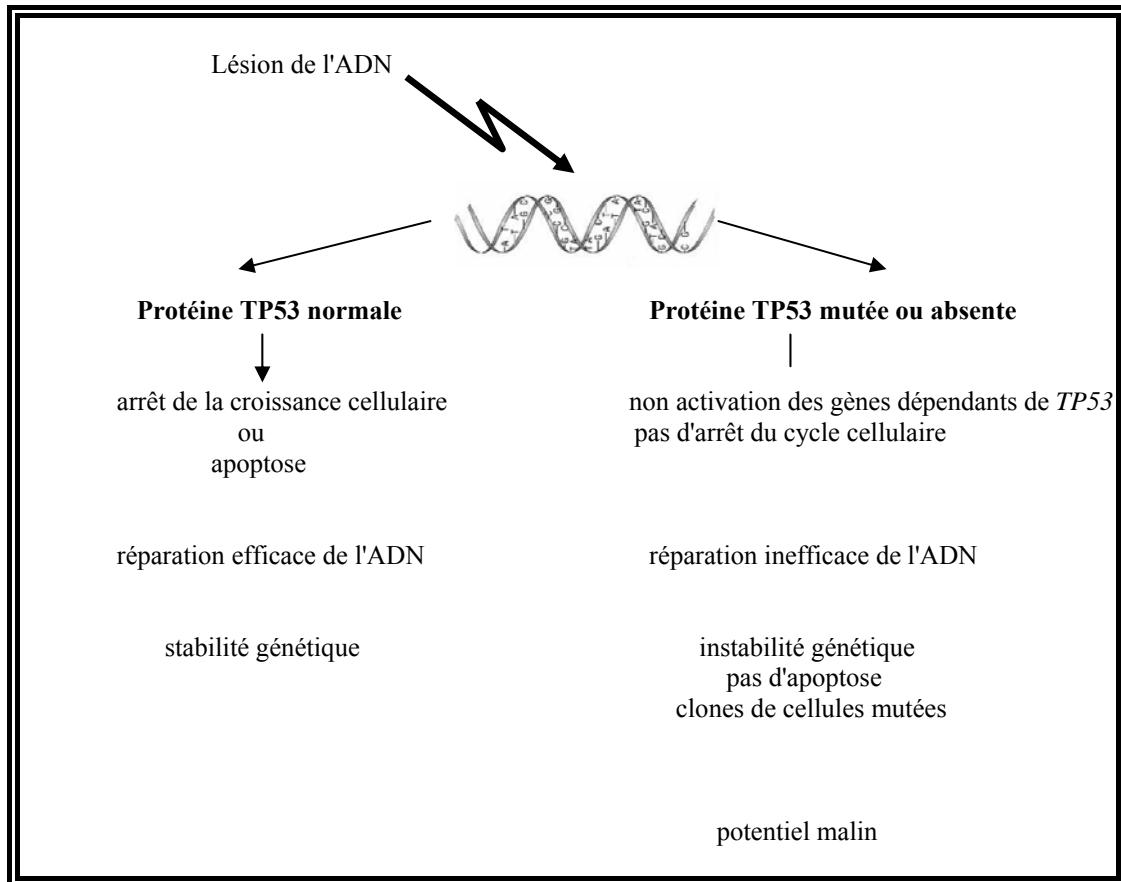
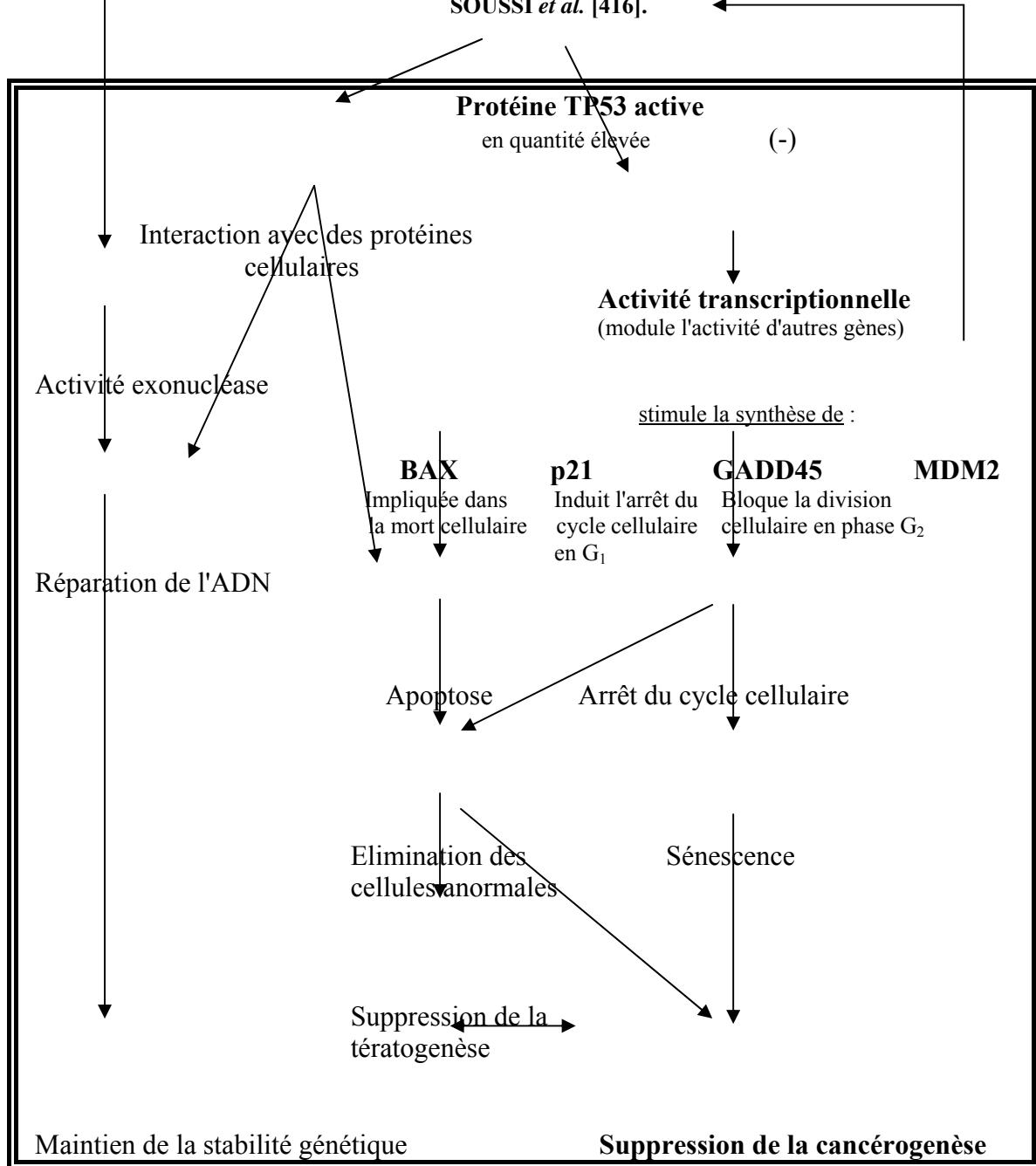


Figure 16. La protéine TP53, ses voies de signalisation et quelques-uns de ses partenaires, adapté selon SOUSSI *et al.* [416].



- La protéine TP53 favorise l'expression de la protéine BAX impliquée dans la mort cellulaire.
- L'action de la protéine TP53 sur le cycle cellulaire se fait par l'intermédiaire de la protéine p21 : la protéine TP53 se lie à une séquence spécifique de l'ADN, en agissant sur le gène *WAF1* (*Wild type p53-Activated Fragment*) ce qui stimule la production de la protéine p21 et bloque la mitose en phase G₁ (phase permettant l'évaluation des anomalies de l'ADN). L'augmentation de la production de TP53 suscite également l'augmentation de la production de GADD45 bloquant le cycle cellulaire en phase G₂ (phase permettant la réparation des anomalies de l'ADN).
- La protéine TP53 stimule la synthèse de la protéine MDM2 (*Mouse Double Minute*). Celle-ci peut ensuite se lier au domaine de transactivation de TP53 et donc inhiber son activité transcriptionnelle. En outre MDM2, en se fixant sur la protéine sauvage TP53 induit une dégradation de celle-ci. Cependant, dans une situation de stress, la protéine TP53 est phosphorylée à l'endroit exact où peut se fixer MDM2, empêchant ainsi l'association TP53/MDM2 et donc la dégradation de TP53.

Quelle que soit la cause d'altération des fonctions de la protéine TP53, il en résulte une perte de ses fonctions normales au sein des cellules, ce qui favorise la croissance cellulaire. La plupart des mutations inactivent la capacité de liaison spécifique à l'ADN de TP53, ce qui permet aux cellules de proliférer dans des conditions où elles devraient être éliminées. Les mutations du gène *TP53* procurent donc un avantage sélectif pour l'expansion clonale des cellules pré-néoplasiques et néoplasiques [150]. De plus, les cellules concernées présentent une instabilité génomique (aneuploïdie, mutations successives) due à l'inactivité de TP53 sur les systèmes de réparation de l'ADN permettant l'émergence de clones cellulaires de malignité accrue [484].

Non seulement les mutations inactivent la fonction de régulateur négatif de la prolifération cellulaire de la protéine TP53 mais il y aurait participation de la protéine TP53 mutante au phénotype transformé. Cette activité oncogénique de ces différentes protéines mutantes selon la mutation du gène, va, à l'inverse de la protéine sauvage, favoriser la division cellulaire. Cependant, ces diverses TP53 mutantes montrent un comportement hétérogène et leurs activités oncogéniques ne sont pas encore complètement établies [421].

➤ *TP53* et cancers humains

Les mutations du gène *TP53* représentent les anomalies génétiques acquises les plus fréquemment observées dans les cancers humains. Ainsi, 40 à 50% des tumeurs malignes contiennent une modification de *TP53* [138]. Ces mutations sont considérées comme une étape critique dans le développement d'une large variété de tumeurs humaines (ostéosarcome, cancer du colon, du poumon et du sein [138, 421]). Elles sont en effet retrouvées dans 15 à 34% des tumeurs du sein [266] et en particulier dans 25% des cas de cancers du sein sporadiques [168]. De plus, la perte ou la mutation de ce gène suppresseur caractérise le syndrome de Li-Fraumeni, forme héréditaire de cancers touchant l'enfant et l'adulte jeune, caractérisée par un large spectre tumoral incluant, en particulier, les sarcomes des tissus mous, les ostéosarcomes, les tumeurs cérébrales, les corticosurrénalomes et les cancers du sein pré-ménopausiques [241].

Les mutations de *TP53* sont présentes dès les premiers stades tumoraux des tumeurs du poumon, de l'estomac, de la peau, de l'utérus et du sein. Des mutations du gène *TP53* ont ainsi été mises en évidence dans les tumeurs pré-néoplasiques du sein et les tumeurs bénignes [138, 272]. Par contre, dans les cancers de l'endomètre, des ovaires, du foie, de la prostate, de

la vessie, de la thyroïde, du colon ainsi que dans les leucémies, la perte de la protéine TP53 est considérée comme tardive [138].

Les mutations du gène *TP53* dans les tumeurs humaines sont hétérogènes. Elles sont, en effet, dispersées sur plus de 250 codons différents [150]. Environ 280 des 393 codons du gène peuvent être touchés par une mutation et les codons 175, 245, 248, 249, 273 et 282 représentent les points chauds des mutations chez l'Homme [418]. Chez les humains, l'analyse de la répartition des mutations fait apparaître des associations particulières entre certains types de cancers et des événements mutationnels, ces variations pouvant être dues à l'implication de divers carcinogènes [415, 421, 422]. D'un point de vue fonctionnel, il a été démontré que l'hétérogénéité des mutations entraîne une hétérogénéité de perte de fonction plus ou moins importante et de nombreuses études indiquent que les paramètres cliniques diffèrent suivant la localisation de la mutation (résistance aux traitements par exemple) [418].

La majorité des mutations du gène *TP53* décrites dans les cancers humains est située dans la région centrale du gène qui contient 4 des 5 domaines hautement conservés au cours de l'évolution (régions "hot spot" des mutations de *TP53*) localisés à l'intérieur des exons 5 à 8 [62]. Cette région code pour une partie de la protéine TP53 essentielle à l'interaction TP53-ADN [62]. Il est prouvé que les mutations situées à l'intérieur de ces domaines jouent un rôle significatif dans la cancérogenèse mammaire [138].

Les mutations du gène *TP53* dans les tumeurs humaines sont représentées à 90% par des mutations ponctuelles. Elles aboutissent à une substitution d'acides aminés dans la région centrale de la protéine TP53, entraînant la synthèse d'une protéine anormale, inactive, non dégradée et qui va s'accumuler dans le noyau des cellules tumorales [463]. Ces événements mutationnels concernent le deuxième allèle du gène, le premier ayant été perdu lors d'un remaniement génétique qui a conduit à la délétion d'une partie plus ou moins importante du chromosome (perte d'hétérozygotie du chromosome 17p qui contient le locus du gène *TP53*) puisqu'en effet, dans la plupart des tumeurs humaines, les deux allèles du gène *TP53* sont inactivés [138]. Les 10% restants sont des mutations non-sens ou de petites délétions qui ne conduisent pas à l'accumulation de TP53 [418].

De plus, l'analyse des mutations ponctuelles qui modifient le gène *TP53* dans les cancers humains, et enfin

pyrimidine (thymine et cytosine), alors qu'une transversion est le remplacement d'une purine par une pyrimidine et vice et versa. Soixante pour cent des transitions G:C→A:T affectent un dinucléotide CpG [421] et résultent de la désamination de la 5-methylcytosine [138]. En effet, la région codante de *TP53* comporte 39 dinucléotides CpG qui sont autant de sites potentiels de transitions G:C→A:T dues à des désaminations spontanées de la 5-méthylcytosine de ces dinucléotides (facteurs endogènes) [415, 421, 422]. A l'inverse, le principal type de mutation rencontré dans les cancers du poumon est représenté par la transversion G:C→T:A compatible avec l'action de carcinogènes, alors que les transitions aux sites CpG sont plus rares. De même, les transitions G:C→A:T aux sites non CpG et les transitions A:T→G:C sont fréquentes dans les cancers de la tête et du cou associés à la combinaison de l'alcool et du tabac [150].

L'analyse des mutations du gène *TP53* dans les cancers du sein montre une hétérogénéité tant au niveau de la fréquence des mutations, de la proportion de délétions et d'insertions, ainsi qu'au niveau de la fréquence des transversions [421] : 80% des mutations du gène *TP53* sont des mutations faux-sens, les autres mutations étant représentées par des mutations non-sens, des délétions et des insertions. Cette hétérogénéité pourrait être expliquée par une variabilité importante dans les divers facteurs de risques tels que les facteurs hormonaux, génétiques, et alimentaires [421]. Il est montré, par exemple, des variations des mutations de ce gène liées à l'origine géographique des patientes ainsi qu'à des différences ethniques [156]. Des variations dans le métabolisme des xénobiotiques pourraient être à l'origine de cette diversité [415, 421, 422].

Au début des années 90, des études ont permis de mettre en évidence des mutations constitutionnelles du gène *TP53* dans des familles atteintes du syndrome de Li-Fraumeni. Les tumeurs examinées présentaient une perte de l'allèle sauvage suggérant que l'inactivation de *TP53* résultait de deux événements successifs (altération germinale puis altération somatique) selon le modèle de KNUDSON et COMINGS [241]. Depuis, de nombreuses études ont montré que les mutations constitutionnelles de *TP53* pouvaient être détectées approximativement dans 70% des familles atteintes du syndrome de Li-Fraumeni.

III.B.1.b Les gènes *BRCA1* et *BRCA2*

Chez les femmes, 5 à 10% des cancers du sein seraient liés à des facteurs de prédisposition héréditaires (transmission autosomique dominante d'une anomalie génétique) [74]. Les analyses de liaisons et les stratégies de clonage positionnel ont conduit, au milieu des années 90, à l'identification de deux gènes associés aux formes familiales de cancers du sein et de l'ovaire chez la femme : les gènes *BRCA1* (*Breast Cancer 1*) et *BRCA2* (*Breast Cancer 2*), situés respectivement sur les chromosomes 17 (17q12-21) et 13 (13q12-13) [270, 479]. Ces deux gènes feraient partie d'une famille fonctionnelle de gènes appelés *caretakers*, capables d'informer la cellule sur l'existence de lésions dans son ADN et, éventuellement de participia 12 Tm/rocessues der (pacation[1164]. ae)Tj0100131 Tc 12 0 0 123501.86037 553.09955 Tm rl en

protéine BRCA1 participerait ainsi à la régulation de la transition G₂/M et à la duplication des centrosomes par une régulation de la transcription de gènes requis pour ces deux fonctions [213]. Néanmoins, le mécanisme qu'utilise BRCA1 afin d'augmenter l'activité transcriptionnelle demeure inconnu.

Il est toutefois certain que la protéine BRCA1 joue un rôle important dans le contrôle de la stabilité et de l'intégrité génomiques. Son absence, suite à des mutations du gène *BRCA1*, peut ainsi favoriser l'accumulation d'altérations génétiques (inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et/ou activation d'oncogènes) nécessaires à la survenue du phénotype transformé.

La perte de la fonction du gène *BRCA1* apparaît comme une étape cruciale dans l'oncogenèse des cellules épithéliales mammaires et ovariennes. En effet, il existe des éléments en faveur de son implication dans le contrôle de la prolifération cellulaire de l'épithélium mammaire en réponse aux stimulations hormonales. Ainsi, l'apport exogène du gène *BRCA1* au moyen d'un vecteur rétroviral inhibe la prolifération cellulaire et tumorale de lignées cancéreuses mammaires et ovariennes, et l'inhibition expérimentale de son expression conduit à l'accélération de la croissance des cellules épithéliales mammaires normales et malignes. Cet effet ne s'exerce pas sur des cellules épithéliales autres que mammaires, ce qui indique un effet hautement spécifique de tissu [440]. Il semblerait donc que *BRCA1* agisse comme un suppresseur de tumeur dans les tissus mammaires et ovariens (tissus réceptifs à l'action activatrice des œstrogènes sur la division cellulaire) en réprimant l'activité des récepteurs aux œstrogènes et donc en empêchant les effets des œstrogènes sur la prolifération cellulaire. Pourtant un argument vient contredire cette théorie, puisque la plupart des cancers impliquant *BRCA1* n'expriment pas de récepteurs aux œstrogènes.

Plusieurs centaines de mutations du gène, dispersées tout au long de la séquence codante, ont jusqu'ici été décrites. Plus de 80% des mutations aboutissent à une protéine tronquée (mutations non-sens, mutations avec décalage du cadre de lecture ou altération de l'épissage) [270]. Les principales mutations concernent les exons 2, 5, 6, 11, 13 et 20. Les mutations les plus fréquentes décrites jusqu'ici sont les mutations 185delAG et 5382insC initialement observées dans les populations Juives ashkénazes. A l'opposé, la majorité des mutations faux-sens n'ont pas de significations cliniques connues, à l'exception de celles touchant le motif "ring finger". L'analyse du taux de prolifération des cancers du sein liés au gène *BRCA1* a permis de montrer que les mutations situées dans les régions conservées

étaient associées à des tumeurs hautement prolifératives, ce qui suggère que ces régions jouent un rôle important dans le contrôle de la prolifération cellulaire de la glande mammaire.

Les mutations de *BRCA1* sont responsables d'environ la moitié des cas de cancers du sein familiaux [146]. Il apparaît que les femmes qui héritent d'anomalies sur le gène *BRCA1* ont un risque extrêmement élevé de développer un cancer du sein (87% à 70 ans), cancers qui se développeront dans la moitié des cas avant l'âge de 50 ans [314]. L'analyse des tumeurs du sein de patients ayant hérité d'un gène *BRCA1* muté révèle que plus de 90% ont perdu l'allèle sauvage [412].

Les cancers du sein associés au gène de susceptibilité *BRCA1* présentent des caractéristiques spécifiques : un fort taux de tumeurs de haut grade (fortement prolifératives et faiblement différenciées), une augmentation du taux d'expression de la protéine TP53, et une diminution de l'expression des récepteurs aux œstrogènes ont souvent été rapportés.

Des perturbations de l'expression du gène pourraient être impliquées dans la genèse des cancers sporadiques. Peu de mutations ponctuelles ou mutations avec altération du cadre de lecture ont été identifiées alors que d'importantes mutations somatiques de *BRCA1* sont fréquemment retrouvées [434]. La perte d'hétérozygotie (LOH) dans la région où se situe le gène *BRCA1* est retrouvée dans 40 à 80% des carcinomes du sein sporadiques [84]. Dans certains cas de cancers du sein sporadiques, le rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation négative du gène *BRCA1* a été mise en évidence.

Dans 70% des cas qui ne sont pas dues à des mutations de *BRCA1*, des mutations de *BRCA2* sont retrouvées. Ces mutations sont également associées à une augmentation du risque de cancer du sein chez les hommes [479]. Une mutation spécifique, 6174delT, est fréquente chez les Juifs ashkénazes, soit environ dans 1% de cette population. Toutes les mutations reconnues du gène *BRCA2* aboutissent à une fin prématurée de la synthèse protéique qui entraîne une perte de fonction du gène suppresseur de tumeur [479]. La fonction exacte de la protéine *BRCA2* demeure inconnue mais son implication dans la réparation des dommages de l'ADN (en interagissant avec la protéine RAD51) et dans la régulation de la transcription a été rapportée. Toutes les pertes de la région 13q12-13 détectées dans les tumeurs issues de patients portant un gène *BRCA2* muté impliquent l'allèle sauvage [143]. Comme c'est le cas pour *BRCA1*, les mutations du gène *BRCA2* sont rares dans les formes sporadiques du cancer du sein.

Les fonctions de BRCA1 et BRCA2 semblent donc liées à leurs associations, dans les cellules somatiques et dans les cellules méiotiques, avec de multiples acteurs des processus de réparation de l'ADN, en particulier RAD51, homologue eucaryote de la recombinase RecA d'*E. Coli* qui participe à l'échange de brins lors de la recombinaison homologue [117]. Un rapport récent suggère que les altérations du gène *Rad51* pourraient être impliquées dans le développement des formes familiales de cancers du sein [188]. De plus, il semblerait que le risque de cancer de sein chez les femmes porteuses d'une mutation de *BRCA2* est fortement influencé par un polymorphisme de RAD51 (polymorphisme 135C) [221].

Des études récentes semblent indiquer l'existence d'un autre gène associé au cancer du sein de nature héréditaire [439]. La présence de mutations de ce gène, nommé *BRCA3*, entraînerait 16 fois plus de risques de développer la maladie chez les femmes qui en sont atteintes. Cependant, la diversité des mutations héréditaires, la taille modeste des familles (en terme d'analyse de liaison) où coexistent des cas de cancers du sein survenant à un âge jeune et avancé, et la pénétrance probablement modérée de ce nouveau gène de prédisposition rendent difficile l'identification d'un nouveau locus de prédisposition.

III.B.1.c Le gène *WAF1*

Le gène *WAF1* (*Wild Type p53-activated Fragment*) également connu sous le nom de *CDKN1A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*), *CIP1* (*cdk2 inhibiting protein*) ou encore *SDII* (*senescence cell-derived inhibitor-1*), est situé sur le locus humain 6p21.1.

Le produit de ce gène, la protéine p21 de 18kD, comprend des domaines interagissant avec plusieurs protéines. Elle se lie en effet aux cdk2, cdk4, cdk6, et bloque le passage de la phase G₁ vers la phase S [103]. La protéine sauvage TP53 stimule la synthèse de la protéine p21, grâce à son activité transcriptionnelle sur le gène *WAF1*, en réponse aux dommages de l'ADN [237] (figure 16). La protéine p21 se lie, en outre, au PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) qui est un co-facteur important de la polymérase δ, stimulé lors de la division cellulaire, et qui est nécessaire à la réPLICATION de l'ADN.

Chez les femmes atteintes de carcinome mammaire, il existe une corrélation entre les mutations de *TP53* et la perte de fonction de la protéine p21 [181].

III.B.1.d Le gène *INK4*

Le gène *INK4*, également appelé *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) et *MTS1* (*multiple tumor suppressor 1*), code pour la protéine p16^{INK4} (ou p16) appartenant à la famille INK4 des protéines inhibitrices de la cdk4. Il existe de fréquentes mutations du gène *INK4* (situé sur le locus humain 9p21), au cours des cancers aboutissant à des divisions non contrôlées, ce qui en fait un gène suppresseur de tumeur [399]. Des études récentes indiquent que la perte de la fonction de la protéine p16 résultant de l'hyperméthylation de la région promotrice, pourrait être un événement précoce de la cancérogenèse [18]. La perte de p16 a pour résultat l'impossibilité d'empêcher la phosphorylation de pRB et donc d'immobiliser le cycle cellulaire. Une étude récente indique que la surexpression de la protéine p16 est associée aux carcinomes mammaires humains [271].

III.B.1.e Le gène *RB1*

La protéine nucléaire pRb, produit du gène *RB1* du rétinoblastome, est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Ce gène est situé sur le chromosome humain 13 (13q14.2). Le rétinoblastome est une tumeur des rétinoblastes (cellules précurseurs de la rétine) envahissant rapidement le cerveau, qui se manifeste chez des enfants (1 sur 20 000) nés avec un allèle du gène *RB1* défectueux dans toutes leurs cellules, et chez lesquels se produit une mutation accidentelle du deuxième allèle au niveau des rétinoblastes. Il existe également des cas non héréditaires (formes sporadiques) lorsque deux mutations successives se sont produites par hasard dans un rétinoblaste. Chez certains sujets traités pour un rétinoblastome ayant atteint l'âge adulte, l'anomalie du gène *RB1* peut être impliquée dans l'apparition d'un nouveau type de cancer comme par exemple l'ostéosarcom

transmet un signal à TP53 en réponse aux dommages de l'ADN (en particulier les cassures de l'ADN induites par les radiations) et phosphoryle la protéine BRCA1 laquelle déclenche des mécanismes de réparation de l'ADN via BRCA2, activant ainsi la réparation de l'ADN.

Les mutations de ce gène sont à l'origine d'une pathologie caractérisée par une sensibilité aux radiations accrue, par une prédisposition aux cancers, et par des troubles cérébelleux et thymiques. Les enfants atteints d'ataxie-télangiectasie portent des mutations sur les deux allèles du gène. Ils présentent une immunodéficience, des anomalies cérébrales, et ont une prédisposition aux cancers, en particulier aux lymphomes.

Il semblerait qu'environ 0,5 à 1% m(76pul,

r ux cancer dustei.

r

III.B.1.h Le gène *CDH1*

Le gène *CDH1* (*cadherin 1*) code pour la cadhérine E (*E-cadherin*), glycoprotéine transmembranaire appartenant à une famille de molécules calcium-dépendantes impliquées dans la reconnaissance intercellulaire, la morphogenèse et le maintien de l'intégrité tissulaire. La cadhérine E forme avec les caténines, le système cadhérine-caténine responsable de l'adhésion intercellulaire dans tous les tissus épithéliaux. Chez l'Homme, elle est également appelée uvomoruline ou Cell-CAM [85].

La connexion, par l'intermédiaire des caténines, entre les cadhérines E et les filaments d'actine régule la force de l'adhésion entre les cellules. Une perturbation dans l'expression ou la fonction de ce complexe induit une perte de l'adhésion intercellulaire. La disparition de la synthèse de cadhérines ou une perte de leur fonction, favorise expérimentalement l'invasion tumorale. A l'inverse, la transfection des cellules malignes avec de l'ADNc codant pour la cadherine E leur fait perdre leur phénotype invasif [476]. De façon générale, un programme de dédifférenciation se met en place quand les interactions cadhérines-caténines sont déstabilisées [341].

La cadhérine E est donc considérée, à cause de ces effets, comme un suppresseur de tumeur. Il est maintenant démontré que la perturbation de ce complexe est un des principaux événements ayant lieu lors des toutes premières étapes du développement du cancer [476].

Les mutations et la perte d'expression du gène *CDH1* (situé sur le locus 16q22.1), sont observées dans de nombreuses tumeurs épithéliales, dont les tumeurs du sein [381] et en particulier dans les carcinomes du sein lobulaires [33].

Différents mécanismes sont impliqués dans la perte d'expression du gène selon le type de carcinome du sein, en particulier, la perte d'hétérozygotie (16q22.1 étant une région fréquemment affectée par la perte d'hétérozygotie dans les tumeurs sporadiques du sein), associée à la disparition complète de l'expression de la molécule dans le carcinome lobulaire infiltrant [11]. Selon BUKHOLM *et al.*, la protéine TP53 pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'expression de E-cadherin [57].

III.B.2 Les oncogènes

III.B.2.a L'oncogène *c-erbB-2*

Le gène *c-erbB-2* (*epidermal receptor for breast carcinoma*), également appelé *ERBB2*, *HER-2* et *NEU* (en raison de l'homologie des gènes *neu*, retrouvé dans les neuroglioblastomes de rat, et *v-erbB-2*, intégré dans le génome de cellules d'érythroblastoses aviaires), appartient à une famille d'oncogènes (*c-erbB-1*, *c-erbB-2*, *c-erbB-3* et *c-erbB-4*) codant pour des récepteurs à activité tyrosine kinase qui participent à la signalisation de la croissance cellulaire. Des études récentes ont montré que les membres de cette famille ont la propriété de former des homo et des hétérodimères et que *c-erbB-1*, *c-erbB-2*, et *c-erbB-4* jouent un rôle, respectivement, dans la croissance du système canaliculaire, la formation lobulo-alvéolaire et la sécrétion des protéines du lait chez les rongeurs [86].

L'oncoprotéine $p185^{HER/neu}$ (ou $p^{185}erbB-2$, *c-erbB-2*, et *NEU*) codée par l'oncogène *c-erbB-2* est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, très proche structurellement du récepteur du facteur de croissance épidermique EGF (*epidermal growth factor*) et des protéines *c-erbB-3* et *c-erbB-4* [29].

La surexpression des protéines erbB a été mise en évidence dans diverses cellules tumorales humaines, ce qui laisse à penser que l'activation anormale de leur activité kinase contribue à la Cancérogenèse ou à la progression tumorale [29]. La protéine oncogénique pourrait posséder la même capacité fonctionnelle mais répondre différemment aux systèmes de régulation, ce qui aurait pour effet le détournement des processus de division cellulaire au profit de la prolifération tumorale.

Le principal mécanisme d'activation du gène *c-erbB-2* implique une amplification génique. Il semblerait, cependant, que d'autres altérations génétiques puissent être responsables de la surexpression du produit. En revanche, chez l'Homme, il n'existe jamais d'activation par translocation ou mutations ponctuelles [29].

La surexpression de la $p185^{HER/neu}$ est retrouvée dans de nombreux cancers humains. C'est le cas dans 20 à 25% des cancers du sein et dans 10 à 40% des adénocarcinomes de l'estomac, des poumons, des ovaires, et des glandes salivaires. Environ 75% des cancers du sein avec envahissement ganglionnaire montrent une surexpression de $p185^{HER/neu}$ [40, 173].

III.B.2.b L'oncogène *c-kit*

Le proto-oncogène *c-kit* (ou *KIT*) est impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire et la différenciation. Il est associé à de multiples fonctions impliquant la multiplication et la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse hématopoïétique,

des cellules germinales, des cellules nerveuses, et la migration des mélanocytes, au moins chez la Souris [127].

Son produit, la protéine KIT, est un récepteur membranaire tyrosine kinase pour les cellules souches (*stem cell factor* SCF ou *mast cell growth factor* MGF). Chez l'Homme, il est exprimé dans diverses cellules de tissus normaux : mastocytes, mélanocytes et cellules épithéliales mammaires entre autres [207]. Il est également exprimé dans certaines tumeurs malignes : mélanomes, carcinomes pulmonaires et carcinomes mammaires [72]. Cependant, les résultats concernant l'expression de *c-kit* dans les tumeurs du sein ne sont pas constants. Il semblerait que l'expression de la protéine KIT diminue quand le caractère malin des tumeurs du sein augmente [449].

Plusieurs types de mutations ponctuelles dans la région juxtamembranaire du gène, conduisant à une phosphorylation en l'absence de la liaison du ligand, et responsables de l'activation (indépendante du ligand) du récepteur, ont été détectées dans des lignées de mastocytes tumoraux, de souris, de rat et d'humains, ainsi que chez des patients atteints de mastocytoses multisystémiques, et dans des tumeurs gastro-intestinales [125]. Ces résultats indiquent qu'une mutation du gène *c-kit* peut conduire à une activation autonome des précurseurs des mastocytes, activation constitutive qui peut conduire à leur prolifération incontrôlée. Cependant, le rôle du gène *c-kit* dans la cancérogenèse est compliqué et demande à être clarifié.

III.B.2.c L'oncogène *c-yes*

Le proto-oncogène cellulaire *c-yes* (ou *YES1*) est l'homologue du gène viral *v-yes* porté par le virus du sarcome aviaire Yamaguchi. Il fait partie de la famille des gènes *src*, dont les membres (*c-blk*, *frg*, *fyn*, *lyn*, *hck*, *tkl* et *src*) sont associés à une activité tyrosine kinase [431]. Ce gène a été isolé, cloné et séquencé chez les humains, les poulets et les amphibiens [431]. Le gène humain est situé sur le chromosome 18. Il code pour une protéine contenant 543 acides aminés (nommée $p61^{c\text{-}yes}$ ou *c-yes*) qui agit comme la protéine tyrosine kinase $pp60^{c\text{-}src}$ [397, 431]. Cette protéine est modifiée après sa transcription par l'addition de l'acide myristique, un petit lipide (la protéine est dite myristilée), ce qui permet l'attachement à la membrane cytoplasmique (essentiel pour son activité). Les protéines tyrosine kinase jouent un rôle important dans la régulation de la croissance cellulaire en phosphorylant les résidus tyrosine ou sérine/thréonine. La phosphorylation sur résidu tyrosine est associée à des voies de signalisation intracellulaire impliquées dans de nombreuses réponses cellulaires, comme la

prolifération et la différenciation [490]. La dérégulation des tyrosine kinases, conduit *in vitro* à l'apparition d'un phénotype transformé [397].

Le gène *c-yes* humain est exprimé dans différents tissus (les reins, la rétine, le foie) et surtout dans le cerveau [397, 490], suggérant un rôle dans la prolifération et/ou la différenciation de ces cellules. Des anomalies des profils de restriction de l'ADN génomique ou la surexpression de l'oncogène ont été décrits dans des tumeurs humaines et en particulier dans les cancers gastriques [394, 429]. Un certain nombre d'observations confirme le rôle joué par l'activation de la tyrosine kinase *c-yes* dans la cancérogenèse mammaire [305]. Des niveaux élevés d'activité tyrosine kinase *c-yes* sont, du reste, retrouvés dans une large proportion de cancers du sein [59, 305].

III.B.2.d L'oncogène *c-myc*

Le gène humain *c-myc* (ou *MYC*), localisé à la position 8q24, appartient à la famille des proto-oncogènes codant pour des facteurs nucléaires qui jouent un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire normale en modulant la transcription d'autres gènes. Ces facteurs de transcription possèdent un site de liaison spécifique avec l'ADN et des domaines de liaison permettant leur activation par les hormones ou les facteurs de croissance. Il existe en général une grande conservation de ces facteurs de transcription entre les espèces.

Le gène *c-myc* a tout d'abord été identifié comme un gène viral, *v-myc*, provoquant une leucémie myélomonocytaire chez le poulet [92]. Chez l'Homme, on distingue deux autres formes, *N-myc* et *L-myc*, impliquées respectivement dans le neuroblastome (tumeur sympathique provenant des cellules de la crête neurale formant les ganglions sympathiques et la médullosurrénale) et le carcinome pulmonaire à petites cellules.

Le gène *c-myc* code pour deux protéines Myc-1 (ou p67) et Myc-2 (ou p64), qui sont des phosphoprotéines nucléaires d'une demi-vie d'environ 30 minutes, régulateurs positifs de la progression du cycle cellulaire. Les protéines Myc contiennent plusieurs domaines :

- Deux domaines de liaison avec l'ADN : un domaine "hélice-boucle-hélice" et un domaine glissière à leucine.
- Un domaine de reconnaissance de localisation nucléaire (permettant à la protéine Myc nouvellement synthétisée de passer du cytoplasme vers le noyau).

- Un domaine d'activation de la transcription.

La liaison à l'ADN nécessite la dimérisation avec une autre protéine du même type, la protéine Max, alors que les hétérodimères Mad–Max constituent des antagonistes des hétérodimères Myc–Max. Le gène *c-myc* est exprimé essentiellement pendant la période de transition G₀/G₁. Les protéines Myc et l'ARN messager du gène *c-myc* sont pratiquement indécelables dans les cellules au repos. Lors du passage de G₀ en G₁, une synthèse rapide s'effectue (on parle de gène de réponse précoce). Le gène *myc* continue à être exprimé pendant la phase S, notamment sous l'influence du signal passant par la tyrosine kinase Src. Les cellules ayant un taux élevé de Myc ont des besoins faibles en facteurs de croissance, un taux de croissance élevé, un temps G₁ court, et ne peuvent sortir du cycle cellulaire. Ce gène permet de passer outre l'arrêt du cycle en G₁, contrôlé par *TP53*, en induisant un inhibiteur de l'inhibiteur des cdks (le gène *WAF1*). L'inhibition de Myc (par des anticorps) conduit à la différenciation cellulaire. De façon plus physiologique, cette inhibition peut être provoquée par l'augmentation de la concentration des protéines Mad qui rentrent en compétition avec Myc pour leur dimérisation avec Max. Les inducteurs de la différenciation entraînent une augmentation du taux de Mad, en même temps qu'une baisse du taux de Myc.

Le gène *c-myc* est exprimé dans presque toutes les cellules en prolifération, dans les tissus adultes ou embryonnaires, et une expression anormalement élevée est mise en évidence dans une grande variété de tumeurs humaines, incluant, entre autres, les cancers du sein, du colon, de l'ovaire, l'adénocarcinome gastrique et le myélome [312]. Plusieurs études ont montré le rôle de l'expression de *c-myc* dans différentes étapes de la cancérogenèse. Une expression élevée de Myc est considérée comme étant importante pour la progression du caractère malin mais non essentiel pour la formation des métastases [423].

Différents mécanismes moléculaires, aboutissant à une dérégulation de l'expression de *c-myc*, ont été identifiés dans des cultures cellulaires : amplification du gène, mutation, réarrangement (translocation) avec augmentation de la transcription [110]. Des altérations de ce gène, principalement des amplifications, sont retrouvées dans environ 25% des carcinomes du sein [470].

III.B.2.e Les oncogènes *ras*

La famille des gènes *ras* comprend les proto-oncogènes H-*ras* et K-*ras* (ou Ha-*ras* et Ki-*ras* pour *Harvey et Kirsten Sarcoma viral oncogene*), et N-*ras* (*neuroblastoma RAS viral oncogene*) exprimés dans tous les tissus et impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire [14]. Ces gènes, situés respectivement sur les chromosomes humains 11p15.5, 12p12.1 et 1p13.2, codent pour trois protéines Ras différentes (H-, K- et N-Ras), de poids moléculaire de 21kd et situées sur la face interne de la membrane plasmique. Ces trois protéines contiennent 188 acides aminés. Elles sont identiques sur les 80 premiers acides aminés et présentent une homologie de 85% sur les 85 résidus suivants alors que l'extrémité carboxy-terminale est très divergente.

La protéine Ras appartient à la vaste famille des GTPases monomériques (les protéines G) liant le GTP (Guanine Tri-Phosphate). Les protéines G sont très conservées au cours de l'évolution (de la levure à l'Homme). Les protéines Ras sont de véritables commutateurs biochimiques en équilibre entre deux formes, l'une inactive, liée au GDP, l'autre active car liée au GTP, capable d'interagir avec des protéines effectrices. Le passage de l'une à l'autre de ces deux conformations est étroitement régulé dans la cellule. La transition Ras-GTP actif vers Ras-GDP inactif est catalysée par les protéines GAP (*GTPase activating protein*) qui stimulent la faible activité GTPasique intrinsèque de Ras. La transition inverse, Ras-GDP inactif vers Ras-GTP actif, est catalysée par les protéines GEF (*guanine-nucleotide-exchange factor*) qui provoquent la libération du GDP et la fixation du GTP. Quand Ras est activée, elle fixe le GTP et transmet le signal par son interaction avec d'autres protéines, ce qui provoque la division cellulaire. Cette activation de Ras est limitée dans le temps : pour s'interrompre et cesser de signaler, la protéine détache l'un de ses phosphates du GTP qui devient GDP, suite à l'action d'une enzyme GAP. Les protéines Ras couplent ainsi les récepteurs avec les effecteurs intracellulaires, et à ce titre exercent un contrôle important dans la transmission du signal.

Lorsque les gènes *ras* (ou ceux codant pour l'enzyme GAP) sont mutés, la forme oncogénique de Ras dans les tumeurs humaines ne peut plus être interrompue, ce qui conduit à une croissance cellulaire anarchique. L'activité GTPase est perdue, et il existe une accumulation de la protéine Ras sous forme active liée au GTP. Du fait de son rôle pivot entre la membrane cellulaire et le noyau, on comprend facilement que toute altération du gène *ras*, provoquant une stimulation non contrôlée de cette protéine, puisse jouer un rôle essentiel dans

la Cancérogenèse. La protéine Ras, encore appelée p21^{Ras}, est donc une des protéines intermédiaires entre les récepteurs et les facteurs de transcription de l'ADN.

Les mutations ponctuelles des gènes N-, K- et H-*ras* représentent le type de mutation le plus fréquemment observé dans les tumeurs humaines. Elles sont retrouvées dans environ 30 à 60 % des tumeurs malignes humaines, principalement dans les tumeurs hématopoïétiques pour N-*ras*, du pancréas, du colon, des poumons et des ovaires pour K-*ras* et de l'estomac, de la vessie et de la thyroïde pour H-*ras* [91, 471]. Les mutations ponctuelles sont principalement mises en évidence à l'intérieur des codons hot-spots 12, 13 et 61 et ont pour effet une liaison constitutive au GTP et une activation constitutive des voies de signalisation aval [14]. Les mutations ponctuelles des oncogènes *ras* ont également été mises en évidence expérimentalement sur des tumeurs induites chez les rongeurs, en particulier sur des tumeurs mammaires [167, 243, 424], ces dernières étant associées de façon constante à une activation des gènes H- ou K-*ras* [471]. De rares observations d'amplification génique ont été rapportées (visibles sur le caryotype sous forme de HSR ou de fragments double minute).

Les mutations des gènes *ras* sont plus rares dans les tumeurs du sein (environ 5 à 10% pour H- et K-*ras*) mais il ne faut pas minimiser le rôle des ces gènes dans le développement de ce type de tumeur car il est possible que des mécanismes autres que les mutations ponctuelles aboutissent à une dérégulation des voies de signalisation impliquant ces GTPases dans le cancer du sein [73, 240].

III.B.2.f L'oncogène *MDM2*

Le gène *MDM2* ou *mdm-2* (*murine double minute*) est situé sur le chromosome humain 12 sur le locus 12q13-q14 et code pour une phosphoprotéine cellulaire de 90 kD, la protéine MDM2 (ou mdm2). Celle-ci interagit avec un grand nombre de protéines impliquées dans le contrôle de la croissance cellulaire. De telles interactions favorisent la prolifération cellulaire et peuvent expliquer le potentiel oncogénique du gène *MDM2* quand il est surexprimé dans les cellules [458]. Ainsi, cet oncogène à la possibilité d'inactiver la fonction du gène suppresseur de tumeur *TP53* (figure 16). En effet, il a été démontré que la protéine MDM2 forme un complexe, à la fois avec la protéine TP53 de type sauvage et mutée, en se liant au domaine de transactivation de la protéine, ce qui lui permet de réguler l'activité de *TP53* en bloquant le domaine de transactivation du gène nécessaire à son activité

transcriptionnelle [290, 416]. Le gène *MDM2* peut également induire la dégradation de la protéine TP53 [458]. De plus, *MDM2* est régulé par le gène *TP53* lui-même, qui module l'activité de ce gène grâce à son activité transcriptionnelle [482].

Le gène *MDM2* est amplifié et surexprimé dans une large variété de tumeurs humaines, en particulier dans les sarcomes des tissus mous [319] mais l'est moins souvent dans la majorité des tumeurs épithéliales, incluant les tumeurs du sein [446].

III.B.2.g Les gènes des cyclines A et D1

La cycline A est une protéine de 60 kDa ayant un rôle important dans l'induction de la phase S. Elle est détectable durant la phase S et augmente au cours de la progression du cycle cellulaire vers la phase G₂. En médecine humaine, les altérations de la cycline A ont récemment été identifiées dans plusieurs types de tumeurs (tumeurs de l'œsophage, de la cavité orale, du poumon, de l'utérus) mais très rarement dans les tumeurs du sein.

Les cyclines D1, D2 et D3, dites aussi cyclines G1, sont particulièrement importantes car elles agissent principalement en régulant l'activité des cdk4/cdk6 dans la phase G₁ du cycle cellulaire. Chez les humains, la cycline D1 est une protéine de 36 kDa, produit du gène *CCND1*, également connu sous le nom de *PRAD1* (*parathyroid adenomatosis 1*) ou *BCL1*, localisé à la position 11q13. La cycline D1 est exprimée à un niveau élevé dans de nombreuses lignées cancéreuses et, originellement, le gène humain de cette cycline a été isolé comme un oncogène activé suite à des remaniements chromosomiques [296]. Différentes études suggèrent l'implication de la cycline D1 dans la croissance des cellules épithéliales normales et malignes, sous la dépendance des stéroïdes [376]. L'absence de cycline D1 chez la Souris entraîne une absence de maturation lobulo-alvéolaire terminale des glandes mammaires [408]. La dérégulation de l'expression du gène de la cycline D1, acquise soit par amplification génique, soit par surexpression de la protéine elle-même, est un phénomène important en oncogenèse humaine, en particulier dans les tumeurs du sein [17]. L'amplification du gène *CCND1*, mise en évidence dans 15 à 20% des cancers du sein, est étroitement corrélée à l'expression des récepteurs aux œstrogènes (ER). De plus, l'expression du gène de la cycline D1 est induite par le 17 béta-œstradiol dans les cellules cancéreuses mammaires [67].

III.B.3 Le gène *S100A4*

Les protéines S100 font partie d'une famille de petites protéines fixant le calcium. Elles interviennent dans diverses activités cellulaires (progression du cycle, transmission des signaux, différenciation cellulaire), en modulant l'activité d'autres protéines, appelées protéines cibles, par l'intermédiaire du calcium. En effet, le calcium (Ca^{2+}) joue un rôle universel dans les mécanismes de transduction des signaux d'activation extra-cellulaires contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que l'apoptose. Le rôle messager du calcium est lié à l'existence de récepteurs intracellulaires qui fixent le calcium et répondent par des modifications de leur structure (calciprotéines S100) ou de leur activité (isoformes calcium-dépendantes de la protéine-kinase C). Environ 18 protéines S100 sont connues et la plupart a été identifiée dans un grand nombre d'espèces [260]. Chez l'Homme, la majorité des gènes S100 codant pour ces protéines est localisée sur le chromosome 1, dans une région fréquemment concernée par des réarrangements chromosomiques dans divers types de cancers [385]. Ces gènes consistent, le plus souvent, en trois exons séparés par deux introns, la longueur des trois exons étant bien conservée entre les espèces [359].

Une des protéines S100, la S100A4, connue sous différents noms : Mts1 (*metastasis-associated 1*), p9ka, calvasculin ou CAPL (*calcium binding protein placental homologue*), constituée de 100 acides aminés, est largement distribuée dans les tissus normaux [260]. Sa participation dans la progression des tumeurs et la formation des métastases a été démontrée et il semblerait que ces actions passent par une stimulation de l'angiogenèse. Il existe une relation entre le niveau d'expression du gène *S100A4* (*MTS1*) et le caractère malin ainsi que la présence de métastases [140]. De plus, une étude récente révèle que la protéine Mts1 a la possibilité de se fixer sur la protéine TP53 au niveau de son domaine de régulation C-terminal et ainsi d'interférer avec l'activité de liaison spécifique à l'ADN de TP53 [141]. Ces mécanismes pourraient accélérer la perte des fonctions de la protéine TP53 sauvage et contribuer au développement d'un phénotype plus agressif durant la progression tumorale [141].

Des niveaux élevés d'ARN messager correspondant à S100A4 sont retrouvés dans des carcinomes du sein associés à une extension aux nœuds lymphatiques locaux [3]. De plus, la protéine S100A4 est exprimée (immunohistochimie) dans des carcinomes du sein et des

cancers des ovaires ou du colon [385]. Par contre, à notre connaissance, il n'existe pas de données concernant les mutations du gène dans l'espèce humaine.

L'oncogenèse est un processus à plusieurs étapes qui nécessite conjointement l'activation d'oncogènes dominants et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Sur les quelques 30 000 gènes que contient le génome humain, une centaine de gènes oncogènes et une trentaine de gènes suppresseurs de tumeurs ont été identifiées. Alors que certains gènes sont impliqués dans la cancérogenèse d'un seul ou d'un petit nombre de cancers (les gènes *APC*- impliqué dans les cancers colorectaux sporadiques, et *WT1*-du néphroblastome ou tumeur de Wilms), d'autres, comme les gènes *TP53* et *ras*, présentent la particularité d'être altérés dans beaucoup de types tumoraux.

Des altérations de certains gènes apparaissent fréquemment dans un grand nombre de cancers du sein. Il s'agit de l'amplification des proto-oncogènes *c-erbB-2* et *c-myc*, de la dérégulation du gène de la cycline D1, des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2* et *RBI*. A l'opposé, les mutations des gènes *ras* sont plutôt rares dans les cancers du sein alors qu'elles sont fréquemment observées dans les autres cancers humains.

Environ 10% des cancers du sein sont des formes familiales parmi lesquelles la moitié s'accompagne de mutations au niveau de gènes *BRCA1* ou *BRCA2*. Le syndrome de Li-Fraumeni, lié au gène suppresseur de tumeur *TP53*, pourrait expliquer 1% des cancers du sein survenant avant l'âge de 35 ans. Le risque de développer un cancer du sein serait trois fois supérieur à la normale chez les femmes ayant une des deux copies du gène *ATM* altéré. De même, les femmes atteintes de la maladie de Cowden, impliquant une mutation du gène *PTEN*, ont également un risque accru de cancer du sein. Il est vraisemblable que d'autres gènes seront décelés chez certaines familles présentant des cas de formes familiales de cancers du sein non liées à des mutations dans ces 5 gènes.

Finalement, il apparaît que les progrès de ces 25 dernières années ont permis d'identifier et de caractériser les principaux acteurs moléculaires du processus de cancérisation.

Le développement de la cytogénétique a permis d'apporter, à partir des années 70, un nouvel éclairage sur la progression tumorale grâce à l'étude du caryotype des cellules tumorales mais c'est grâce aux techniques permettant l'étude de la structure et du mode de fonctionnement des gènes, c'est-à-dire aux techniques de biologie moléculaire, que la conception du cancer "maladie du génome" a émergé. En effet, l'analyse des innombrables mutations génétiques observées dans les cellules cancéreuses a permis d'apprécier la fonction précise de ces gènes au sein des phénomènes cellulaires fondamentaux (cycle cellulaire, différenciation, apoptose, stabilité génique).

Le décodage du génome humain et l'élaboration de cartes physiques et génétiques ont également permis de caractériser de nombreux gènes dont les mutations sont responsables de syndromes héréditaires de prédisposition aux tumeurs. La caractérisation de ces gènes et les études concernant la fonction de leurs produits ont ouvert des pistes très prometteuses dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques à la base des cancers héréditaires, mais aussi du cancer en général, ces gènes étant également impliqués dans certaines formes sporadiques.

La base génétique polygénique de la maladie cancéreuse confère à chaque tumeur un phénotype et un potentiel évolutif propres. L'étude systématique de l'expression de multiples gènes (notamment grâce au saut technologique que représentent les "puces à ADN") devrait permettre d'identifier le profil moléculaire de chaque tumeur, patient par patient. Avec la caractérisation, non plus de quelques altérations, mais de plusieurs milliers, il sera possible de dresser une véritable carte d'identité de la tumeur, "signature moléculaire" qui se traduit par l'altération d'une série particulière de gènes. Cette signature devrait permettre, en particulier, de préciser le diagnostic, d'évaluer avec un meilleur degré de confiance le pronostic et de cibler les drogues anticancéreuses les plus efficaces pour chaque tumeur.

Deuxième partie

LES BASES MOLECULAIRES DES TUMEURS MAMMAIRES DE LA CHIENNE

I. GENERALITES SUR LA MAMELLE NORMALE ET LES TUMEURS MAMMAIRES DE LA CHIENNE

La mamelle est un organe glandulaire propre aux femelles des mammifères qui a pour finalité de nourrir le petit qui vient de naître et d'assurer sa défense immunitaire. Les tumeurs mammaires représentent un groupe de tumeurs important chez la chienne de part leur fréquence et leur gravité.

I.A Structure, anatomie et physiologie de la glande mammaire normale

La mamelle est une glande tubulo-alvéolaire composée. Il s'agit d'une glande exocrine dont l'unité fonctionnelle est le lobule. Un système ramifié de canaux excréteurs se termine en cul-de-sac par des portions sécrétrices tubulo-alvéolaires. La portion sécrétrice de la glande correspond à l'épithélium de l'alvéole et à celui de la portion intralobulaire du canal terminal. Du tissu conjonctif sépare les différents lobules. Des cellules myoépithéliales, à propriétés contractiles, sont présentes tout au long des structures épithéliales, canalaire et lobulaires de la glande. Elles sont disposées entre la lame basale et les cellules épithéliales (Figure 17) [202].

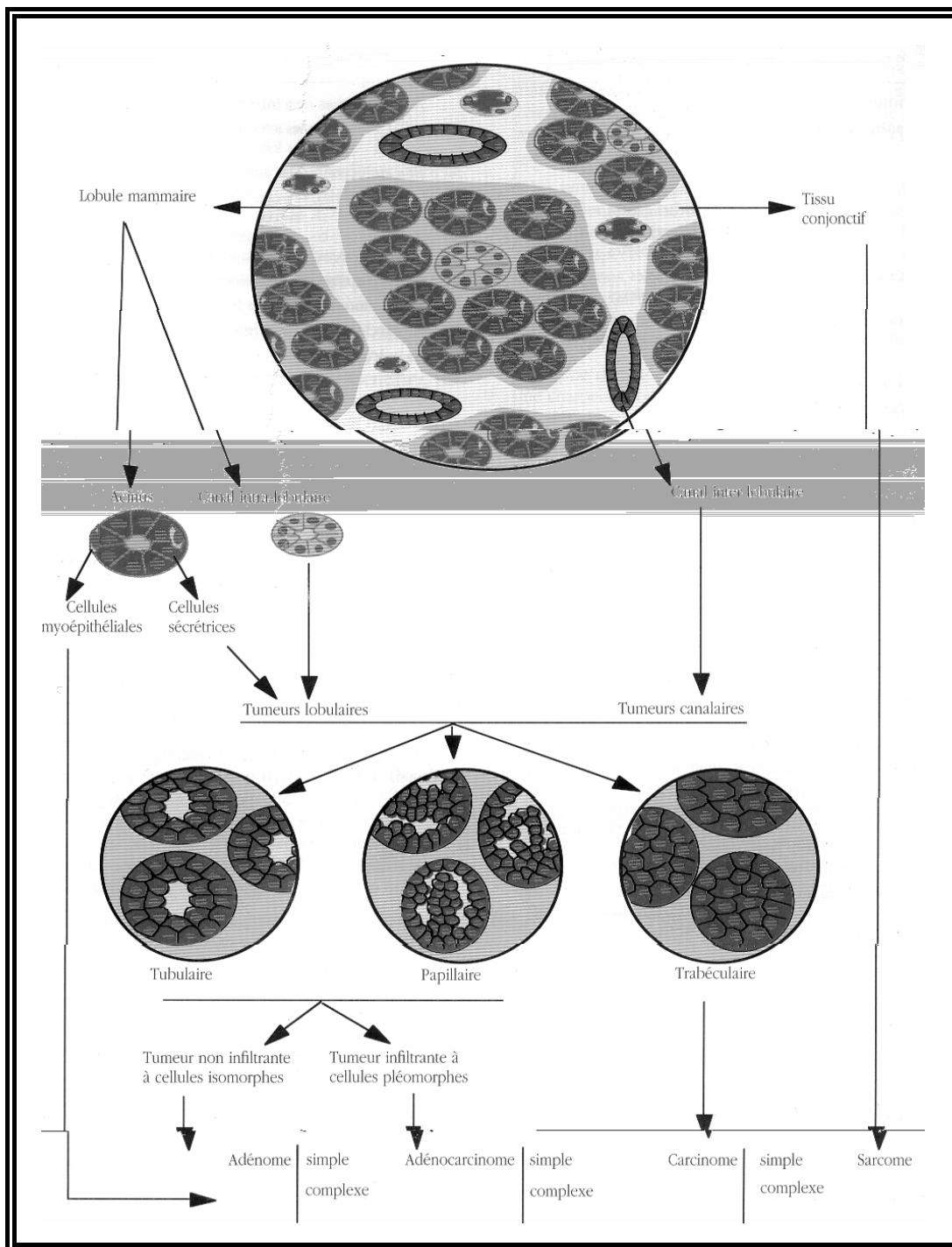
La chienne possède 5 paires de mamelles réparties en 2 chaînes latérales, droite et gauche, nettement séparées par la ligne médiane :

- M1 = mamelle thoracique antérieure
- M2 = mamelle thoracique postérieure
- M3 = mamelle abdominale antérieure
- M4 = mamelle abdominale postérieure
- M5 = mamelle inguinale

Les glandes M1 et M2 sont irriguées par les branches perforantes de l'artère thoracique interne et accessoirement par l'artère thoracique latérale et les artères intercostales. Les glandes M3, M4 et M5 sont irriguées par les rameaux de l'artère épigastrique superficielle caudale. La circulation de retour est assurée par les veines correspondantes.

Dans l'espèce canine, chaque chaîne est drainée par deux lymphocentres [202]. Le lymphocentre axillaire est constitué de un ou deux nœuds lymphatiques axillaires principaux

Figure 17. Le tissu mammaire et les principales tumeurs mammaires, d'après MAGNOL *et al.* [239].



noyés dans la graisse du creux axillaire, et d'un nœud lymphatique axillaire accessoire situé dans le premier ou le deuxième espace intercostal. Le lymphocentre inguinal superficiel est constitué d'un à quatre nœuds lymphatiques inguinaux situés dorso-latéralement à la chaîne mammaire.

La fonction de la glande mammaire est la sécrétion du lait. Elle est donc liée physiologiquement à l'allaitement du chiot et chronologiquement au post-partum. La glande mammaire a une activité cyclique avec des phases successives de développement, de sécrétion, d'involution et de repos. Cette activité est placée sous l'influence de séquences complexes de stimulus endogènes hormonaux et exogènes sensoriels [202].

La croissance du tissu mammaire normal est sous la dépendance de facteurs hormonaux et peptidiques nombreux. Parmi ces facteurs, les stéroïdes ovariens, dont la sécrétion est cyclique, sont indispensables au développement glandulaire normal, même si d'autres hormones, telles que la prolactine, sont aussi impliquées dans le processus de croissance. Les hormones ovariennes, progestérone et œstrogène, agissent directement ou indirectement par leurs actions sur d'autres hormones ou facteurs de croissance (prolactine, IGF1 (somatomédine), EGF (*epidermal growth factor*), TGF α (*transforming growth factor alpha*)) ou sur leurs récepteurs. Une meilleure compréhension du comportement de certaines hormones au cours du processus mammaire normal permet d'appréhender leurs rôles dans le développement des tumeurs mammaires.

Avant les premières chaleurs, le système canaliculaire excréteur de la glande mammaire est rudimentaire et les tubulo-alvéoles sont absents. Au moment des premières chaleurs, sous l'influence de la sécrétion des œstrogènes ovariens, les glandes mammaires se développent : la prolifération canaliculaire s'accompagne d'un important développement du tissu conjonctif interlobaire et interlobulaire ainsi que d'une multiplication des cellules adipeuses. En dehors du cycle œstral, de la gestation et de l'allaitement, les glandes mammaires restent "au repos".

La glande mammaire de la chienne subit durant le cycle œstral une séquence bien définie de modifications histologiques, tant dans les structures épithéliales que dans le stroma. Au cours du pro-œstrus et de l'œstrus, les œstrogènes favorisent la croissance du système

canalicular et du stroma. La prolifération du système alvéolaire et des cellules myoépithéliales (métœstrus et diœstrus) est dépendante de la progestérone.

Pendant la première moitié de la gestation, sous l'influence des stéroïdes sexuels et tout particulièrement de la progestérone, les ramifications terminales du système canalicular prolifèrent et de très nombreuses tubulo-alvéoles glandulaires se développent. Dès les premiers mois de la gestation, sous l'influence de la sécrétion de prolactine, les cellules glandulaires des tubulo-alvéoles commencent à sécréter le colostrum.

Le rôle des facteurs de croissance produits localement est particulièrement important dans le contrôle de la mammogenèse :

- Les cellules épithéliales produisent le TGF α , sous l'effet des œstrogènes.
- Les cellules myoépithéliales sécrètent l'IGF1.
- Les fibroblastes sécrètent un facteur de croissance pour les cellules épithéliales.
- Les adipocytes sécrètent la prostaglandine PGE₂ sous l'influence de l'hormone de croissance, et libèrent également des lipides tel que l'acide linoléique favorisant la croissance mammaire.

Pendant la gestation, la sécrétion lactée est inhibée par la progestérone ainsi que par l'EGF et le TGF- β produits localement. La disparition des effets inhibiteurs de l'œstrogène et de la progestérone sur la prolactine, induit la lactation. La lactogenèse (montée de lait) s'effectue dans les jours qui suivent la mise-bas, grâce à l'accroissement de la sécrétion de prolactine et au renversement de l'équilibre progestérone/prolactine.

Une lactation de di-œstrus peut s'observer chez la chienne non gestante lors de la pseudo gestation. Encore appelée "grossesse nerveuse", il s'agit d'un trouble du comportement se traduisant par la simulation d'une mise-bas et/ou le déclenchement d'une lactation. Ce phénomène très courant est souvent considéré comme quasiment physiologique dans cette espèce, la chienne présentant alors toutes les modifications hormonales, psychologiques et physiques caractéristiques des états de gestation et de lactation. On connaît cependant mal les mécanismes qui président à l'apparition des lactations nerveuses chez la chienne. Ce phénomène serait lié à la longue phase d'activité du corps jaune, qu'il y ait ou non gestation. La croissance et le développement du tissu mammaire semblent d'ailleurs similaires au départ chez les chiennes gestantes et non gestantes. En effet, contrairement à la plupart des espèces

de mammifères, le développement mammaire cyclique en l'absence de gestation est poussé au moins jusqu'au stade de sécrétion [97].

I.B Classification des tumeurs mammaires

Les tumeurs mammaires se développent à partir des différents constituants cellulaires du parenchyme mammaire (figure 17). La difficulté majeure dans l'identification des tumeurs mammaires canines est leur polymorphisme tissulaire (fréquent pour un même nodule) ainsi que leur nature souvent différente d'un nodule à l'autre. Ceci explique la difficulté d'une classification simple et complètement acceptée [121, 132, 153].

La classification histologique des tumeurs mammaires canines, proposée par l'OMS en 1974, est basée sur la classification humaine de 1968 [153]. Elle repose essentiellement sur des critères morphologiques à travers l'identification de l'origine cytogénétique de la tumeur. Cette classification distingue 3 grands groupes de tumeurs : épithéliales, conjonctives et mixtes, présentant des caractères soit de tumeurs bénignes, soit de tumeurs malignes. La dernière version de la classification de l'OMS datant de 1999, introduit une notion de pronostic en différenciant les différents carcinomes (non-infiltrants, complexes ou simples) [279]. Les différentes catégories de tumeurs sont classées selon leur potentiel de malignité (Tableau 6).

- Les tumeurs épithéliales se développent selon une architecture donnée : tubulaire, papillaire (éventuellement kystique) ou trabéculaire. Alors que les deux premiers aspects sont communs aux adénomes et aux adénocarcinomes, le troisième n'est observé que dans une forme particulière de tumeur épithéliale maligne appelée carcinome trabéculaire qui se présente sous la forme de cordons massifs [239].
- La charpente conjonctivo-vasculaire peut donner naissance à différentes tumeurs mésenchymateuses bénignes ou malignes (sarcomes).
- Les tumeurs mixtes réunissent à la fois des cellules de type épithelial et des cellules de type conjonctif.

Tableau 6. Classification histologique des tumeurs et des dysplasies mammaires des carnivores, O.M.S 1999, d'après MISDORP *et al.* [279].

1-Tumeurs mammaires malignes

Carcinomes

- Carcinome non infiltrant (*in situ*)
- Carcinome complexe
- Carcinome simple
 - carcinome tubulopapillaire
 - carcinome solide
 - carcinome anaplasique
- Carcinomes de types spéciaux
 - carcinome à cellules fusiformes
 - carcinome à cellules squameuses
 - carcinome mucineux
 - carcinome riche en lipides

Sarcomes

- Fibrosarcomes
- Ostéosarcomes
- Autres sarcomes (chondrosarcomes et liposarcomes)

Carcinosarcomes

Carcinomes ou sarcomes présents dans une tumeur bénigne

2-Tumeurs mammaires bénignes

- Adénomes
 - simples
 - complexes
 - basaloïdes
- Fibro-adénomes
- Tumeurs mixtes bénignes
- Papillomes canalaires

3-Tumeurs non classifiées

4- Dysplasies mammaires bénignes ou d'aspect bénin

- Hyperplasies canalaires
- Hyperplasies lobulaires
 - épithéliales
 - adénoses
- Kystes
- Ectasies canalaires
- Fibroscléroses
- Gynécomasties

La distinction des caractères simple ou complexe et lobulaire ou canalaire de la prolifération représentent des points d'intérêt secondaires [239] :

- Une tumeur mammaire est qualifiée de simple lorsqu'elle est constituée uniquement de cellules épithéliales.
- Elle est qualifiée de complexe lorsque participent les cellules myoépithéliales qui introduisent un contingent cellulaire supplémentaire dans une tumeur devenue pluritissulaire. Cette composante myoépithéliale peut subir des remaniements métaplasiques (métaplasie chondroïde et/ou osseuse) : on parlera alors de tumeur mixte (cellules épithéliales + cellules myoépithéliales + foyers de métaplasie). Cette tumeur mixte sera bénigne si toutes ses composantes le sont, et maligne si une seule de ses composantes l'est. Le carcinosarcome désigne une tumeur où les deux composantes sont malignes.
- Les tumeurs issues de l'acinus ou des canaux intralobulaires seront qualifiées de lobulaires.
- Celles prenant naissance à partir de canaux interlobulaires, de canalaires.

On parle de carcinome inflammatoire lors de la présence de placards érythémateux mal délimités, douloureux et chauds, associés en périphérie sur la peau glabre de la face interne des cuisses et de l'abdomen, à des nodules multiples. Il s'agit de métastases propagées par voie lymphatique, à partir de l'épicentre mammaire et qui, une fois émergées cliniquement, constituent une carcinose cutanée.

La fréquence relative des principaux types histologiques varie parfois d'une enquête à une autre. Cependant, environ 50% d'entre elles sont des tumeurs malignes auxquelles il faut ajouter des tumeurs bénignes et des lésions dysplasiques non tumorales (Tableau 7) [42, 202, 347]. Les tumeurs malignes sont représentées en très grande majorité par les adénocarcinomes. Le terme fibro-adénome est utilisé pour les tumeurs bénignes mixtes qui représentent les tumeurs bénignes les plus fréquentes chez la chienne. Elles peuvent contenir des éléments osseux ou cartilagineux (dérivés des éléments myoépithéliaux) en plus des éléments épithéliaux. Les dysplasies résultent d'altérations des mécanismes de prolifération et d'involution du tissu glandulaire au cours de ses modifications cycliques.

Tableau 7. Incidence des différents types histologiques de tumeurs mammaires chez la chienne d'après BOSTOCK *et al.* [42] et LAGADIC *et al.* [202].

Types de tumeur	Incidence (%)		Types de tumeur
	[42]	[202]	
TUMEURS BENIGNES	51	50	TUMEURS BENIGNES
Tumeurs bénignes mixtes, fibro-adénomes, adénomes complexes	89	79	Adénomes simples ou complexes
Adénomes simples	10	21	Tumeurs bénignes mixtes
Tumeurs bénignes mésenchymateuses	1		
TUMEURS MALIGNES	49	50	TUMEURS MALIGNES
Carcinomes solides	34,5	3,5	Carcinomes solides ou métaplasiques
Adénocarcinomes tubulaires	31,5	84	Adénocarcinomes simples et complexes
Adénocarcinomes papillaires	17,5		Carcinomes anaplasiques
Carcinomes anaplasiques	8	0,5	Total carcinomes
Total carcinomes	91,5	88	Sarcomes
Sarcomes	6,5	2	Carcinosarcomes
Carcinosarcomes (tumeurs malignes mixtes)	2	10	(tumeurs malignes mixtes)

I.C Evolution des tumeurs mammaires

Les lésions dysplasiques du parenchyme glandulaire sont le plus souvent observées en association avec des tumeurs, et leur évolution propre est difficile à juger. On reconnaît des dysplasies typiques ou atypiques en fonction du degré de différenciation des cellules épithéliales. Les dysplasies atypiques peuvent être considérées comme des mastopathies pré-cancéreuses [132]. Il a été démontré que les chiennes atteintes de dysplasie atypique présentaient un risque significativement accru de développer un carcinome plus de 2 ans après la mastectomie [132].

Les tumeurs bénignes ne récidivent habituellement pas après exérèse. Il est cependant possible de voir apparaître au cours du temps des tumeurs bénignes successives sur des mamelles différentes. Des tumeurs bénignes peuvent coexister avec des tumeurs malignes lors de l'évolution de tumeurs mammaires multiples. La fréquence réelle de cette association est très imprécise (l'examen histologique n'étant pas systématiquement réalisé sur toutes les tumeurs opérées), elle ne dépasserait pas 10% des cas de tumeurs multiples.

Environ 30% des carcinomes et 75% des sarcomes donnent naissance à des métastases [42]. L'extension par voie lymphatique est presque de règle en raison de la forte prédominance des cancers épithéliaux. Les métastases ganglionnaires dépendent du site anatomique de la tumeur, et sont le plus souvent unilatérales, parfois bilatérales. Les poumons représentent de loin le site d'implantation privilégié, à savoir 60 à 90% des métastases observées. Il ne faut pas oublier l'existence d'autres organes cibles, en particulier l'os, le foie et l'encéphale [118]. La généralisation et les récidives se produisent habituellement dans l'année qui suit l'exérèse chirurgicale.

Selon HELLMEN [161], les transitions entre dysplasies, tumeurs bénignes et carcinomes, parfois observées dans certaines tumeurs mammaires canines, reflètent probablement les trois phases évolutives permettant de passer d'une cellule normale à une cellule cancéreuse (initiation, promotion et progression tumorales). Ce schéma pathogénique est cependant très largement hypothétique puisque l'on ignore notamment, si le passage par une forme tumorale bénigne est indispensable avant l'évolution d'une tumeur maligne. Il n'est sans doute pas applicable à toutes les tumeurs mammaires de la chienne. En effet, toutes les dysplasies et tumeurs bénignes atypiques ne deviennent pas malignes malgré une morphologie

commune et de même, certaines tumeurs malignes se forment sans passage par un stade bénin [161].

La nature histologique d'un cancer est un élément important d'appréciation de son pouvoir évolutif. Différents types histologiques de tumeurs mammaires de la chienne sont reconnus. Cependant, la classification histologique des tumeurs malignes demeure mal établie, faute de posséder en pathologie vétérinaire une classification universellement admise, comme il en existe chez la femme. De plus, leur éclosion multicentrique (sur les deux chaînes mammaires), leur nature souvent différente d'un nodule à l'autre, leur polymorphisme tissulaire, fréquent pour un même nodule, rendent l'étude des tumeurs mammaires difficile.

II. ETIOLOGIE DES TUMEURS MAMMAIRES DE LA CHIENNE

L'étiologie des tumeurs mammaires de la chienne est encore indéterminée. A l'heure actuelle, deux facteurs peuvent être mis en cause avec plus ou moins de certitude. Il s'agit des facteurs hormonaux et des facteurs environnementaux alors que le rôle du facteur génétique n'est pas encore établi.

II.A Les facteurs hormonaux

Le rôle des hormones stéroïdiennes (et en particulier celui des œstrogènes) dans le développement du cancer du sein, a été très étudié depuis de nombreuses années. Dès la fin des années 30, des travaux menés sur le cobaye et la souris ont mis en évidence un lien entre œstradiol et tumeurs mammaires. Les décennies qui ont suivi ont largement confirmé cette conclusion chez l'animal, si bien que le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), classe cet œstrogène parmi les substances cancérogènes, pour l'animal de laboratoire mais aussi pour l'Homme [172]. Même s'il est évident que les hormones stéroïdiennes contribuent au développement des tumeurs du sein [230, 379], le rôle exact des modifications hormonales et, en particulier œstrogéniques, reste mystérieux puisque l'on ignore encore si celles-ci ont un rôle étiologique propre ou simplement une action promotrice [370].

Jusqu'à très récemment, les scientifiques interprétaient les observations réalisées chez l'animal de laboratoire comme la résultante de l'action activatrice exercée par l'œstradiol sur la division cellulaire. L'hormone agirait en augmentant le risque de faire proliférer des cellules dont l'ADN aurait été endommagé par d'autres facteurs, comme une mutation spontanée ou un agent toxique de l'environnement. Ces dernières années, les œstrogènes ont commencé à être étudiés sous l'angle de leur génotoxicité, c'est-à-dire de leur aptitude à provoquer des modifications anormales dans le génome [69]. La cancérogénicité de l'œstradiol viendrait surtout de la production de métabolites, les catécholœstrogènes, par suite de sa transformation par des enzymes spécifiques du métabolisme, les cytochromes P450, particulièrement abondantes dans le sein [68]. Certains auteurs se prononcent d'ailleurs pour une participation des œstrogènes et de leurs métabolites, à la fois lors de l'initiation et de la promotion du cancer du sein, bien que ces associations soient complexes [75].

Différents critères sont en faveur de l'hormono-dépendance des tumeurs mammaires de la chienne :

- L'ovariectomie pratiquée avant le premier œstrus réduit le risque tumoral à 0,05% par rapport à celui d'une chienne non stérilisée, ce risque s'établissant à 8% si la stérilisation est pratiquée après le premier œstrus, et à 26% si elle est effectuée après le deuxième œstrus [389]. L'effet protecteur de l'ovariectomie serait nul si elle intervient après l'âge de 2,5 ans [389]. Une ovariectomie tardive, après l'âge de 5 ans, aurait un effet préventif en ce qui concerne les tumeurs bénignes et les lésions dysplasiques mais ne permet pas de réduire le risque de tumeurs malignes [275]. Par contre, l'ovariectomie réalisée après le développement d'une tumeur mammaire n'a pas d'effet significatif sur la progression de la tumeur maligne [295].
- Chez les mâles, les tumeurs mammaires, pourtant très rares, sont fréquemment associées à des anomalies hormonales [152, 466], comme l'existence d'une production d'œstrogène d'origine tumorale lors de tumeur de Sertoli [351].
- L'administration de certains progestagènes, comme l'acétate de médroxyprogesterone, de mégestrol ou de chlormadinone, favorise le développement de tumeurs principalement bénignes et exceptionnellement malignes, s'il s'agit d'une administration prolongée et/ou à des doses très élevées [275]. Les résultats sont par contre contradictoires en ce qui concerne l'administration répétée de faibles doses de progestagènes dans le but de prévenir l'apparition des chaleurs : effet protecteur pour les uns [328], rôle favorisant sur l'incidence des tumeurs bénignes [275] et malignes pour les autres (incidence augmentant avec la durée du traitement) [426].
- 50 à 60% des tumeurs malignes et 70% des tumeurs bénignes possèdent à la fois des récepteurs aux œstrogènes (ER) et aux progestagènes (PR) [234, 268]. Ces récepteurs sont présents en quantité plus importante dans le tissu mammaire normal et dans les tumeurs bénignes que dans les tumeurs malignes alors qu'ils sont souvent absents dans les métastases [98, 234, 374].

- Une croissance plus importante des tumeurs mammaires durant l'œstrus et le metœstrus a été observée [41].

Si les études épidémiologiques réalisées chez la chienne ne permettent pas d'affirmer un effet initiateur à proprement parler des progestagènes dans cette espèce, elles semblent néanmoins confirmer un rôle promoteur direct ou indirect de ces substances dans une espèce particulièrement sujette au développement des lésions mammaires [97]. L12 459.65353 759u4.8D01.43976 0

dans les métastases, sont présents en quantité plus importante dans le tissu mammaire normal et dans les tumeurs bénignes que dans les tumeurs malignes [268, 372, 374]. De plus, selon GERALDES *et al.* [130], les tumeurs mammaires malignes ne possédant pas de récepteurs à la progestérone et aux œstrogènes, prolifèrent à un taux plus élevé que celles qui possèdent des récepteurs.

Différents auteurs ont établi le rôle stimulateur des progestagènes sur la sécrétion de l'hormone de croissance (GH pour *growth hormone*) chez la chienne. Ainsi, une augmentation de la concentration en GH survient parfois au cours du diœstrus (caractérisé par une production physiologiquement accrue de progestérone) et des niveaux élevés sont mis en évidence après traitement prolongé aux progestagènes de synthèse [289, 370, 396].

L'hormone de croissance ou hormone somatotrope, est une hormone polypeptidique produite par les cellules de l'antéhypophyse sous le contrôle de facteurs hypothalamiques. La GHRH (*growth hormone releasing hormone*) stimule la synthèse et la sécrétion de GH, alors que la somatostatine l'inhibe. L'hormone de croissance a des effets directs au niveau de ses tissus cibles (action sur le métabolisme glucidique, lipidique, protéique et minéral) ou agit par l'intermédiaire de facteurs de croissance insulinomimétiques : les somatomédines ou IGFs (*insulin-like-growth factor*) dont elle stimule la synthèse hépatique [398]. Une hypersécrétion chronique de GH, conséquence chez la chienne d'une hyperprogestéronémie (physiologique au cours de la période post-œstrale ou suite à l'administration de progestatifs de synthèse) entraîne une acromégalie se traduisant par la croissance exagérée des tissus mous, des os et des viscères et par un dérèglement du métabolisme glucidique [398].

Les somatomédines ou IGFs ont une activité *insulin-like* et stimulent les mécanismes de croissance cellulaire et tissulaire. L'IGF1 ou somatomédine C joue un rôle majeur dans la croissance des tissus musculaires, osseux et mammaires [398]. Les effets locaux des IGFs sont modulés au niveau tissulaire par les membres des IGF-binding proteins (IGFBPs) [289].

Différentes études ont montré que le lieu de production de l'hormone de croissance lors d'une imprégnation répétée et/ou prolongée de l'organisme par les progestagènes (hyperprogestéronémie iatrogène ou endogène) est la glande mammaire elle-même [287, 288, 396]. En parallèle à l'augmentation de la production de la GH induite par les progestagènes, on note également une élévation des niveaux sanguins de IGF1 et IGF2 aboutissant à une stimulation de la prolifération cellulaire [289].

Il est probable que cette production locale de GH intervienne dans la croissance mammaire physiologique au cours du cycle œstral et qu'elle soit en partie responsable de la stimulation, voire de la transformation tumorale, des cellules épithéliales mammaires. On connaît d'ailleurs le rôle important de l'hormone de croissance et des somatomédines dans la croissance des tumeurs mammaires de plusieurs espèces [192, 447]. Ceci pourrait expliquer la fréquence élevée des nodules mammaires chez les chiennes acromégales [210, 396]. L'hypothèse que la GH puisse jouer un rôle dans la pathogénie des tumeurs mammaires apparaît dès la fin des années 80 [372]. Le récepteur de l'hormone de croissance (GHR) est présent, chez la chienne, dans la mamelle normale ainsi que dans certaines tumeurs mammaires. Il est cependant possible que l'expression de la GH soit indépendante de la progestérone après acquisition de la malignité [210, 288]. De plus, il semblerait que cette expression dans la mamelle ne soit pas spécifique à la chienne, mais existe aussi chez la chatte et dans les tissus mammaires humains [288].

La prolactine est une hormone polypeptidique antéhypophysaire ayant un rôle sur le développement et la sécrétion mammaire. Elle contrôle également l'activité lutéale assurant le maintien de l'activité du corps jaune, essentiel au maintien de la gestation. Dans l'espèce canine, il n'a pas été mis en évidence de relation entre une augmentation de la sécrétion de prolactine suite à une stimulation de TRH (*thyrotropin-releasing hormone*) et l'apparition de tumeurs mammaires bénignes ou malignes [375]. Des récepteurs prolactine sont présents dans les tumeurs mammaires de la chienne, plus fréquemment dans les tumeurs bénignes que dans les tumeurs malignes. Néanmoins, le rôle joué par cette hormone dans la pathogénie des tumeurs mammaires reste imprécis [370].

Parmi les facteurs de croissance peptidiques, le TGF (*transforming growth factor*) et l'EGF (*epidermal growth factor*) pourraient jouer un rôle important dans la croissance des tissus mammaires normaux et néoplasiques dans différentes espèces [311, 337, 370]. Ces facteurs de croissance sont associés, dans les tumeurs mammaires canines, à la présence des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone [311]. De plus, la production de leurs récepteurs (EGF-R) est régulée par les œstrogènes. Les tumeurs malignes seraient les seules à sécréter des quantités importantes de TGF-alpha en réponse à l'action des œstrogènes selon le modèle proposé par LIPPMAN [225].

II.B Autres facteurs liés à la vie de reproduction

Contrairement à ce qui est confirmé chez la femme, aucune corrélation statistique n'a été observée entre certaines perturbations de l'activité génitale cyclique de la chienne (gestation précoce, nombre de mise-bas, âge au premier œstrus et irrégularité du cycle œstral) et la fréquence d'apparition des tumeurs mammaires [97, 389].

L'influence de la lactation de pseudogestation sur le développement tumoral suscite bien des controverses. Selon DONNAY et al. [97], les chiennes ayant des antécédents de lactations nerveuses courent plus de risques de développer ultérieurement des tumeurs mammaires que les chiennes chez qui aucune lactation nerveuse n'a été détectée, le risque étant d'autant plus élevé que les lactations sont fréquentes et que les chiennes sont âgées. De même, ELSE et HANNANT [107] constatent chez les populations à pseudogestation marquée, un pourcentage significativement plus élevé de tumeurs malignes (73%), par rapport à celui observé dans un groupe normal (40%). En contrepartie, de nombreuses études réfutent la pseudogestation comme facteur de risque tumoral [52, 328, 389]. Ainsi, BRODEY *et al.* [52] ont retrouvé le même pourcentage de pseudogestation dans la population affectée de tumeurs mammaires que dans le groupe témoin indemne.

II.C Les facteurs environnementaux

➤ Chez la femme, certains éléments plaident en faveur de l'intervention de facteurs environnementaux. On sait, par exemple, que les Asiatiques ont un risque moindre que les occidentaux de développer un cancer du sein. Or, si on étudie une population d'immigrés chinois aux Etats-Unis, on s'aperçoit qu'au niveau de la deuxième génération, le risque rejoint celui de la population occidentale. Des facteurs alimentaires ont alors été incriminés (consommation de graisses, obésité, alcoolisme), ainsi que des polluants chimiques (dioxine par exemple) [379]. Aux Etats-Unis, le taux de cancer du sein est plus faible chez les végétariens que chez les amateurs de viande [480].

Le facteur alimentation interviendrait par l'intermédiaire d'un apport calorique plus élevé, et d'une plus grande richesse en graisses animales. L'aspect le plus important serait la composition en acides gras et surtout leur saturation. Les acides gras auraient un effet sur la mamelle, via le système hormonal, en influençant l'exposition aux œstrogènes [75, 88]. Ainsi,

la corrélation entre la quantité de graisse et l'apparition de tumeurs mammaires est expliquée par la solubilité des hormones stéroïdes dans les graisses, ce qui faciliterait leur fixation aux récepteurs [63]. De plus, une étude récente indique qu'une restriction énergétique de 40% chez les femelles rats ACI (rattes ayant une propension à développer des tumeurs mammaires lors de traitement par le 17 béta-œstradiol E2) inhibe la formation de tumeurs mammaires, en partie en retardant la progression de l'hyperplasie atypique vers le carcinome [159]. Il est également établi chez l'Homme que le niveau énergétique de la ration alimentaire influence le développement de différentes tumeurs, dont les tumeurs du colon et du sein, et que leur inhibition est proportionnelle au degré de restriction imposé [441]. Il a été observé qu'une restriction énergétique inhibe la prolifération cellulaire et augmente la mort cellulaire par apoptose. De plus, dans cette situation, des concentrations élevées de protéine p27 sont observées, indiquant que la restriction énergétique inhibe la carcinogenèse, en partie en retardant la progression du cycle cellulaire [441].

Deux enquêtes épidémiologiques différentes ont démontré un rôle favorisant possible de l'alimentation et de l'état corporel des animaux sur l'apparition des tumeurs mammaires. La fréquence des tumeurs est statistiquement plus élevée chez les chiennes obèses, qu'il s'agisse de l'obésité constatée à l'âge de un an ou de celle existant un an avant la consultation pour tumeurs mammaires [336, 413]. La consommation d'un régime ménager (par opposition à une alimentation industrielle) serait un facteur favorisant de l'apparition des tumeurs [336]. Les régimes carnés à base de bœuf ou de porc comparé aux régimes riches en viande de volaille auraient également un effet favorisant [336]. Ces données sont cependant à considérer avec précaution en raison notamment de la faible fiabilité des enquêtes rétrospectives chez l'animal.

➤ Les femmes exposées à de hautes doses de radiations ionisantes émises par des corps radioactifs (comme le radium) lors de leur désintégration, ont un risque augmenté de cancer du sein, comme en témoignent les études effectuées sur les survivantes japonaises d'Hiroshima et de Nagasaki (fortes doses de rayonnements reçues pendant des durées limitées) [379]. De plus, selon NEUGUT *et al.* [313] par rapport à la population générale, les femmes traitées par radiothérapie pour un cancer du sein présentent une augmentation de 10 à 50% du risque de développer un autre cancer et un risque multiplié par 2 à 5 d'avoir un cancer du sein controlatéral [313].

Il n'existe pas d'études estimant l'incidence des tumeurs mammaires de la chienne après radiothérapie ni, à notre connaissance, de publications concernant les chiennes exposées accidentellement à des hautes doses de radiations ionisantes. Selon MOULTON, l'exposition de chiennes de race Beagle aux rayons X n'entraîne pas d'augmentation de l'incidence des tumeurs mammaires, mais les tumeurs apparaissent à un âge précoce [298]. Une étude de BENJAMIN *et al.* [22], montre que l'exposition de chiennes gestantes à des radiations ionisantes (60-cobalt gamma) entraîne une augmentation des cancers chez les chiots alors que le nombre de carcinomes mammaires observé chez les chiennes ne montre pas d'augmentation. Cependant les résultats dépendent des doses administrées et du type de radiations utilisées car ROSENBLATT *et al.* [361] ont mis en évidence une augmentation du risque de cancer mammaire chez les chiennes de race Beagle traitées dans des conditions expérimentales d'irradiation identiques.

➤ Alors que chez la femme l'influence des polluants chimiques sur l'apparition des tumeurs du sein a fait l'objet d'études épidémiologiques [88], il n'existe pas à notre connaissance d'études concernant l'action des facteurs chimiques sur la cancérogenèse des tumeurs mammaires dans l'espèce canine. Leur action sur l'ADN a, par contre, été démontrée chez la Souris et le Rat.

II.D Facteurs de prédisposition génétique ?

Il est maintenant bien établi que les femmes qui ont un membre de leur famille atteint d'un cancer du sein ont elles-même un risque augmenté de cancer du sein. L'augmentation du risque est d'autant plus élevé que le degré de parenté avec le sujet atteint est étroit et que le cancer du sein est survenu précocement [379]. Nous avons déjà indiqué que ces cancers du sein seraient dus à la transmission héréditaire d'une anomalie génétique (forme altérée des gènes *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*...).

La fréquence plus élevée de certains types de cancers dans certaines races ou familles de chiens suggère qu'une composante héréditaire puisse être importante dans le développement et la progression des tumeurs chez les chiens, et qu'il soit possible qu'il existe dans ces races, comme c'est le cas chez les humains, des facteurs prédisposants [276, 294]. Des études récentes de génétique moléculaire ont d'ailleurs permis d'établir la relation entre le caractère familial d'un type de cancer et une anomalie génétique pour deux types de tumeur :

- Des mutations de l'oncogène *c-kit* constituerait la clef d'une véritable prédisposition familiale au mastocytome dans la race Boxer [228, 231].
- Le complexe cystadénocarcinome rénal multifocal et dermatofibrose nodulaire héréditaire du Berger Allemand a été associé à un ensemble de 13 marqueurs génétiques associés portés par le chromosome 5 [183].

Il est difficile de distinguer clairement des races prédisposées à l'apparition des tumeurs mammaires, tant les résultats varient suivant les études et les pays dont elles émanent. D'une manière générale, on s'accorde à reconnaître une prédisposition des chiennes de race pure par rapport aux chiennes croisées [100]. Des études américaines font état d'une prédisposition, entre autres, des races Pointer, Setters anglais et irlandais, Labrador, Fox Terrier ainsi que des races Caniche et Cocker [76, 107, 347]. Dans une étude française, les races de petite taille (Teckel, Bichon, Caniche, Yorkshire et Pinscher) semblent prédisposées [269], ce qui pourrait simplement refléter la plus grande médicalisation dont font l'objet ces petits chiens de compagnie. Le Boxer, habituellement plus sujet à tous types de tumeurs [100], ne semble pas particulièrement prédisposé aux tumeurs mammaires selon PRIESTER [347, 348]. Pourtant, une étude norvégienne récente semble indiquer une prédisposition, dans ce pays, de la race Boxer, ainsi que des races Cocker, Springer et Teckel [286].

Selon le club américain de la race Skye Terrier, les tumeurs mammaires représenteraient la principale cause de décès dans cette race, en particulier chez des chiennes jeunes adultes [5]. Une étude en cours du Dr VIHNA de l'université de Michigan, sponsorisée par l'AKC (*American Kennel Club, Canine Health Foundation*), évalue la participation des gènes *BRCA1* et *BRCA2*, *TP53* et *ATM* dans les carcinomes mammaires chez le Skye Terrier [5, 6]. Selon le club du Skye Terrier, il y aurait, dans cette race, une relation entre les tumeurs mammaires et les hémangiosarcomes. Une mutation du gène *PTEN* pourrait ainsi être responsable de l'apparition des hémangiosarcomes, tumeurs mammaires et carcinomes de la thyroïde chez les Skye terriers [5, 6].

La seule publication concernant l'éventualité d'une prédisposition familiale aux tumeurs mammaires est celle de SCHAFER *et al.* [386]. Cette étude datant de 1998 est basée sur la probabilité qu'une caractéristique spécifique (l'apparition de tumeur mammaire) soit transmise d'un géniteur particulier afin d'établir le lien entre l'appartenance à une famille et l'apparition de tumeurs mammaires. Dans ce but, un examen clinique avec palpation des

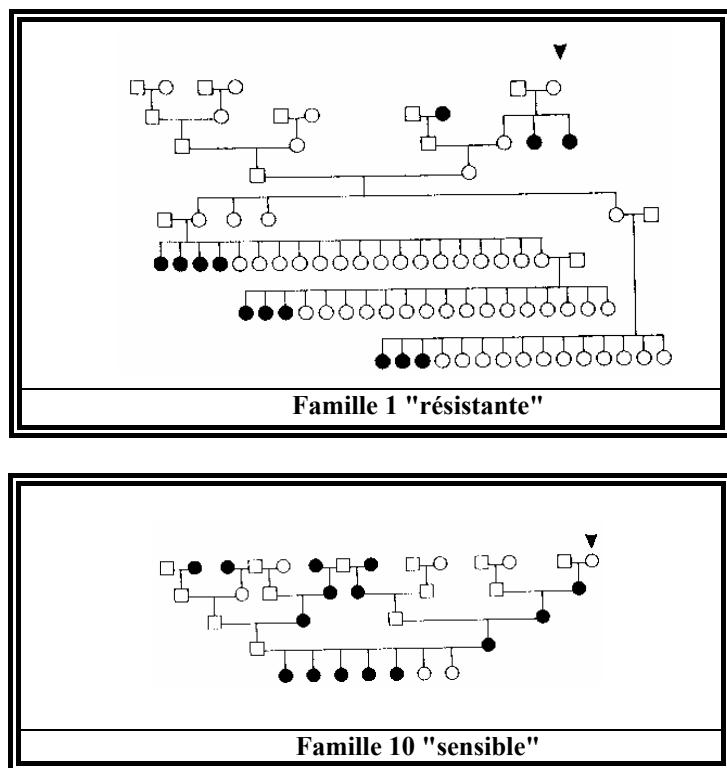
mamelles a été réalisé une fois par mois pour chaque chienne de race Beagle appartenant aux 28 familles issues de 28 génitrices et de 6 mâles. Seule la date d'apparition de la première tumeur mammaire a été prise en compte afin de simplifier l'analyse.

Il ressort de cette étude que les chiennes appartenant aux familles 1, 10, 18 et 26 présentent un risque significativement différent (par rapport aux femelles appartenant aux autres familles) de développer une tumeur mammaire. En étudiant une partie du pedigree des familles 1 et 10, on remarque un taux faible de tumeurs mammaires dans la famille 1 alors que la famille 10 est caractérisée par une fréquence élevée de chiennes atteintes de tumeurs mammaires (5 des 7 chiennes de la quatrième génération ont développé une tumeur mammaire) (figure 18). L'étude de la répartition des âges des chiennes au moment de l'apparition de leur première tumeur mammaire permet de mettre en évidence, parmi les 869 femelles atteintes de tumeurs mammaires, deux phénotypes différents : un phénotype dit "résistant" (2 familles dont la famille 1) et un phénotype dit "sensible" (également 2 familles comprenant la famille 10).

La résistance aux tumeurs mammaires est caractérisée par un âge tardif d'apparition (taux de tumeurs inférieur à 50% avant 17 ans), d'où une probabilité extrêmement faible de développer une tumeur mammaire, alors que le délai d'apparition des tumeurs chez les chiennes correspondant au phénotype "sensible" n'est que de 7,5 ans (la plupart des chiennes encore en vie à l'âge de 10 ans étant atteintes de tumeurs mammaires).

Les tests χ^2 appliqués à la répartition des types tumoraux observés dans les familles 1 et 10, appelées respectivement famille "résistante" et famille "sensible" (les 2 autres familles n'ayant pas été étudiées à cause du faible nombre de chiennes), indiquent qu'il n'existe pas de différences significatives entre la répartition des tumeurs bénignes/malignes ($P=0,778$), des types histologiques bénins ($P=0,098$), des types histologiques malins ($P=0,194$) et les 2 familles (tableau 8). Un individu de la famille "sensible" est donc prédisposé au développement d'une tumeur mammaire à un âge précoce par rapport à un individu de la famille dite "résistante" mais n'est pas prédisposé à un type histologique particulier. Le même facteur génétique (ou les mêmes facteurs génétiques) pourrait ainsi être responsable d'une sensibilité ou d'une résistance au développement des tumeurs bénignes et malignes [386]. Cependant, l'isolement par clonage positionnel du gène (ou des gènes) éventuellement responsable de la sensibilité (ou de la résistance) aux tumeurs mammaires dans ces deux familles n'était pas envisageable faute de disposer, à cette époque, de marqueurs génétiques spécifiques indispensables pour permettre la localisation du gène par une étude de liaison.

Figure 18. Pedigrees partiels des familles "résistante" et "sensible", d'après SCHAFFER *et al.* [386].



Les chiennes ayant au moins une tumeur mammaire sont représentées par des cercles noirs.
La flèche indique la femelle à l'origine de la colonie.
Les mâles sont représentés par des carrés.

Tableau 8. Nombre de tumeurs mammaires des différents types histologiques dans les familles dites "résistante" et "sensible", d'après SCHAFFER *et al.* [386].

Types histologiques	Famille "résistante"	Famille "sensible"
<u>Tumeurs bénignes</u>		
Adénomes simples	70	149
Adénomes complexes	25	19
Tumeurs bénignes mixtes	35	87
	7	22
<u>Tumeurs malignes</u>		
Adénocarcinomes simples	20	39
Adénocarcinomes complexes	7	12
Carcinomes solides	3	17
Carcinome à cellules fusiformes	8	6
Carcinome à cellules squameuses	1	1
Carcinome anaplasique	0	1
	1	2

Cette équipe s'est néanmoins attachée à évaluer l'expression des protéines TP53 et p^{185erbB-2} (produit de l'oncogène c-erbB-2) dans les tumeurs mammaires malignes des chiennes appartenant aux 2 familles. Cette analyse n'a cependant pas permis de mettre en évidence des différences significatives entre l'expression de ces protéines et l'appartenance à une famille (sensible ou résistante). Cependant, cette étude ne s'intéressant qu'à l'expression des protéines, il n'est pas possible d'affirmer que les altérations de ces deux gènes ne sont pas à la base de la prédisposition familiale aux tumeurs mammaires chez ces chiennes.

D'une manière générale, il n'a pas été trouvé de relation évidente entre les mutations du gène *TP53* observées dans certaines tumeurs et la race des chiens. Ainsi, les mutations du gène *TP53* ne seraient pas à la base de la prédisposition au mastocytome du Chien [133] et au complexe cystadénocarcinome rénal multifocal et dermatofibrose nodulaire héréditaire du Berger Allemand [183].

Néanmoins, en 1998, une étude concernant le statut du gène *TP53* dans les tissus normaux et tumoraux de 8 chiens traités avec un protocole COP (cyclophosphamide, vincristine, prednisolone) ou EP (épirubicine, prednisolone) pour des lymphomes primaires et secondaires, a permis de mettre en évidence, pour la première fois chez le Chien, l'existence de mutations germinales de ce gène [457]. En effet, un chien de 7 ans (de race Bull Mastiff), traité avec un protocole COP ayant permis une rémission de 35 semaines, est présenté comme étant hétérozygote pour le gène *TP53*, à la fois dans les tissus normaux (tissu hépatique et prélèvement de sang périphérique) et tumoraux (lymphome secondaire). La mutation germinale au niveau d'un des allèles de *TP53* est représentée par une insertion de deux paires de bases au codon 234, au sein de l'exon 7, entraînant un décalage du cadre de lecture et la transformation du codon 247 en un codon stop. Cette mutation germinale pourrait donc représenter une prédisposition aux lymphosarcomes pour ce chien appartenant à une race montrant une incidence élevée de ce type de tumeurs [321].

De même, un chien de race Boxer (race présentant habituellement une fréquence élevée de tumeurs) atteint d'un adénome mammaire a été identifié comme étant porteur de mutations germinales du gène *TP53* [459]. Selon VELDHOEN *et al.* [459], l'identification, chez ce chien de mutations du gène *TP53*, à la fois dans les tissus normaux et dans l'adénome mammaire, conforte l'origine germinale de ces altérations. Cependant, des études supplémentaires s'avèrent nécessaires afin de définir le rôle de ce gène suppresseur de tumeur dans la prédisposition aux tumeurs mammaires dans la race canine.

En conclusion, tous les auteurs s'accordent à dire que les tumeurs mammaires de la chienne sont sous dépendance hormonale. En l'état actuel des connaissances en recherche vétérinaire, il semblerait que les hormones stéroïdiennes agissent chez la chienne en stimulant la prolifération des cellules épithéliales mammaires transformées (rôle de promoteur). A la différence de ce qui se passe dans l'espèce humaine, il semble que ce soit les effets des progestagènes qui prédominent, plutôt que ceux des œstrogènes. Ainsi, l'imprégnation prolongée du tissu mammaire par des hormones progestagènes naturelles ou thérapeutiques serait responsable de l'évolution de lésions mammaires non tumorales, hyperplasiques puis dysplasiques qui, dans un certain nombre de cas, présenteraient ensuite une involution tumorale soit bénigne, soit maligne [294]. Pourtant, environ la moitié des tumeurs malignes n'expriment pas de récepteurs aux œstrogènes et à la progesterone, et donc évolueraient indépendamment de toute stimulation hormonale. Il est également possible que la progression vers le caractère malin s'accompagne d'un passage d'un état hormono-dépendant à un état non hormono-dépendant, comme c'est le cas pour le cancer du sein.

Alors que l'analyse des *loci* de prédisposition au cancer dans l'espèce humaine a abouti à la cartographie et au clonage de gènes de prédisposition, peu d'études se sont penchées, chez le Chien, sur la relation entre le caractère familial d'un type de cancer et une anomalie génétique. La distinction de races canines prédisposées à l'apparition des tumeurs mammaires n'est pas clairement établie et l'existence de familles au sein desquelles il existe un haut risque de survenue de ce type de tumeur doit être confirmée afin d'envisager l'identification de gènes morbides par clonage positionnel.

III. LES ETUDES CYTOGENETIQUES ET MOLECULAIRES DES TUMEURS MAMMAIRES DE LA CHIENNE

Les travaux de recherche en matière de génétique appliquée à la cancérologie canine sont globalement plus récents et nettement moins développés que chez l'Homme. Les tumeurs solides canines les plus étudiées dans les études cytogénétiques et de génétique moléculaire appliquée au cancer sont celles de la mamelle.

III.A Les techniques utilisées

Comme pour les caractérisations moléculaires de maladies héréditaires chez le Chien, deux approches sont possibles pour l'étude des gènes et de leurs anomalies dans les tumeurs du Chien.

➤ La première part du principe que les gènes impliqués dans le développement des tumeurs chez l'Homme, peuvent l'être également chez le Chien. On recherche alors la présence dans ces gènes d'éventuelles anomalies dans les tumeurs canines.

Ainsi, quand le gène à étudier est identifié et isolé chez l'Homme, la démarche à suivre pour caractériser le gène canin est évidente. Elle consiste à isoler, par clonage moléculaire, le gène canin orthologue, en exploitant le fait que la séquence nucléotidique du gène canin a suffisamment d'homologie avec le gène humain (les gènes étant fortement conservés entre les espèces) et à déterminer ensuite sa séquence. On définit comme orthologues deux gènes d'espèces différentes dont les séquences homologues dérivent d'un même gène ancestral. Le gène canin est d'abord isolé à partir d'un chien sain, puis à partir des échantillons de tumeur à analyser. La comparaison des deux séquences permet alors parfois d'identifier une mutation.

Cette approche permet d'avoir facilement accès au gène sans avoir besoin de le cartographier précisément au préalable. De plus, la génétique humaine et murine étant très en avance par rapport à celle des carnivores domestiques, il est tentant de tirer partie des acquis de la génétique de l'Homme et de la Souris [12].

➤ La deuxième approche correspond à l'identification de gènes de prédisposition par clonage positionnel. Cette approche présente deux contraintes de taille : la carte génétique du Chien doit être suffisamment dense pour être exploitable et il faut rechercher des pedigrees

appartenant à des familles de chiens dans lesquelles on remarque une incidence élevée du type de tumeur étudié.

La mise en évidence d'aberrations chromosomiques et l'approche gène candidat sont deux techniques qui permettent de déterminer le gène recherché beaucoup plus rapidement.

A ce jour, seule la première approche a été appliquée aux tumeurs mammaires de la chienne.

III.A.1 Etudes des chromosomes

La réalisation du caryotype du Chien est une tâche difficile en raison du nombre élevé de chromosomes et de leur morphologie. Le caryotype normal du Chien est composé de 78 chromosomes : 76 autosomes acrocentriques, relativement petits et difficiles à identifier (puisque'ils ont tous une morphologie semblable avec un centromère en position terminale), et deux chromosomes sexuels [395]. La complexité du caryotype canin a été un frein à son utilisation dans les protocoles de recherche [83]. Les études cytogénétiques appliquées à la cancérologie canine sont peu développées si on les compare à celles conduites chez l'Homme [102, 357].

Durant ces 25 dernières années, de nombreuses tentatives ont été réalisées pour produire un caryotype fiable et reproductible du Chien domestique, en utilisant diverses techniques de marquage chromosomique [48, 355, 395].

L'ordre et le dessin des bandes des seules 21 premières paires d'autosomes et des chromosomes sexuels ont été standardisés en 1995 par le comité de standardisation du caryotype du Chien [433], les chromosomes 22 à 38 (qui ont une taille et un dessin des bandes très proches) n'ayant pu être identifiés avec les techniques de bandes.

Les progrès techniques de ces dernières décennies ont ensuite permis d'identifier les 17 paires d'autosomes restantes grâce à l'utilisation de techniques sophistiquées : coloriage de chromosomes par FISH, technique DAPI (Di Aminido Phenyl Indol, colorant spécifique de l'ADN), et cytométrie de flux [48, 209, 355].

Les modes de numérotation des paires d'autosomes canins 17 à 38 divergeant entre les publications de deux équipes, la communauté scientifique travaillant sur la génétique du Chien s'est mise d'accord pour que la classification des chromosomes à utiliser soit la classification proposée par l'équipe du Dr BINNS [48, 49].

La majorité des études concernant le caryotype des cellules de tumeurs mammaires de la chienne utilise la technique de bandes [15, 16, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 354, 356]. L'application de la technique FISH, qui a pourtant simplifié l'identification des anomalies chromosomiques présentes dans les cellules tumorales de Chien, n'a été utilisée que dans une seule étude [436]. La ploïdie de l'ADN des cellules des tumeurs mammaires a également été estimée par cytométrie de flux ou par analyse d'image [95, 129, 162, 335, 373].

III.A.2 Caractérisation des gènes morbides

Le tableau 9 regroupe les techniques moléculaires utilisées dans les différentes études concernant les tumeurs mammaires de la chienne.

III.A.2.a Clonage et séquençage d'un gène canin

La détermination de la séquence du gène peut être réalisée à partir de l'ADN génomique [71] ou à partir de l'ADN complémentaire après extraction de l'ARN total de cellules d'un chien en bonne santé et amplification par RT-PCR [199, 257, 306, 453, 456]. La séquence nucléotidique obtenue peut être analysée pour son homologie avec celle rapportée pour les autres espèces par un logiciel d'analyse de séquence.

III.A.2.b Mise en évidence d'un gène canin correspondant au gène humain

Pour vérifier si l'ADN de la tumeur à analyser contient des séquences analogues au gène humain étudié, de l'ADN génomique est traité avec des enzymes de restriction. Après séparation en gel et transfert sur membrane de nylon, les fragments sont hybridés avec une sonde dérivée d'un clone d'ADNc du gène humain. L'observation de fortes bandes d'hybridation indique la présence d'au moins un gène canin présentant une hybridation croisée avec le gène humain.

Tableau 9. Les techniques de biologie moléculaires appliquées à des tumeurs mammaires canines.

	Méthodes	Gènes	Auteurs	Années	
ADN	PCR et séquençage	<i>TP53</i>	Muto <i>et al.</i> [306]	2000	
			Mayr <i>et al.</i> [259]	1999	
	PCR , SSCP, séquençage		Mayr <i>et al.</i> [257]	1998	
			Mayr <i>et al.</i> [256]	1996	
	<i>TP53</i>	Mayr <i>et al.</i> [257]	1998		
		Southern blot		Wakui <i>et al.</i> [465]	2001
				Mayr <i>et al.</i> [261]	2000
				Chu <i>et al.</i> [71]	1998
				Setoguchi <i>et al.</i> [402]	2001
				Setoguchi <i>et al.</i> [401]	2001
ARN	RT-PCR, séquençage	<i>TP53</i>	Setoguchi <i>et al.</i> [402]	2001	
			Van Leeuwen <i>et al.</i> [453]	1996	
	RT-PCR, SSCP, séquençage	<i>c-myc</i>	Engström <i>et al.</i> [110]	1987	
			Rungsipipat <i>et al.</i> [366]	1999	
		<i>c-yes</i>	Miyoshi <i>et al.</i> [282]	1991	
			Veldhoen <i>et al.</i> [459]	1999	
			Matsuyama <i>et al.</i> [248]	2001	
	RT-PCR	<i>c-kit</i>	Van Leeuwen <i>et al.</i> [453]	1996	
	Dot blot	<i>erbB</i>	Kubo <i>et al.</i> [200]	1998	
	Northern blot	<i>c-myc</i>	Ahern <i>et al.</i> [2]	1996	
			Engström <i>et al.</i> [110]	1987	

Tableau 10. La technique immunohistochimique appliquée à des tumeurs mammaires canines.

Protéines détectées	Auteurs	Anticorps utilisés	Années
TP53	Haga <i>et al.</i> [147] Wakui <i>et al.</i> [465] Inoue <i>et al.</i> [175] Rungsipipat <i>et al.</i> [365] Schaffer <i>et al.</i> [386] Gamblin <i>et al.</i> [128]	Monoclonaux BP53-12 et Pab122 Polyclonal CM-1 Monoclonal Pab1801 Polyclonal CM-1 Polyclonal CM-1	2001 2001 1999 1999 1998 1997
p ^{185erbB-2}	Rungsipipat <i>et al.</i> [365] Schaffer <i>et al.</i> [386]	Polyclonal anti-p ^{185erbB-2} Monoclonal CB11	1999 1998
Myc	Inoue <i>et al.</i> [175]	Anti-Myc	1999
Produit du gène c-yes	Rungsipipat <i>et al.</i> [366]	Polyclonal anti c-yes	1999
Cadherine E	Restucci <i>et al.</i> [358]	Monoclonal anti cadherine E	1997

III.A.2.c Recherche des mutations du gène

Le séquençage du gène (la plupart du temps réalisé sans mise en œuvre préalable de techniques de criblage, comme la SSCP, seule méthode utilisée chez le Chien) est effectué après extraction de l'ADN ou de l'ARN total des échantillons de tumeurs à analyser. Les différents fragments du gène sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces correspondant au gène humain ou des amorces synthétisées à partir de la séquence connue du gène canin. Des fragments complémentaires d'ADN peuvent également être amplifiés par RT-PCR à partir de l'ARN total, à l'aide d'amorces sélectionnées selon leur homologie de séquence ou synthétisées en utilisant les séquences de nucléotides conservées entre les espèces de mammifères [200, 248]. Les produits d'amplification sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, colorés au bromure d'éthidium puis analysés. Les brins amplifiés sont séquencés à l'aide d'un séquenceur automatique utilisant la méthode des didéoxy-nucléotides. La comparaison des séquences du gène issu de la tumeur et du gène normal permet alors d'identifier la mutation responsable [256, 257, 259, 306, 459].

Le Southern blot, permettant de mettre en évidence des réarrangements du gène étudié, a également été utilisé sur des prélèvements de tumeurs mammaires [110, 282, 366, 402].

III.A.2.d Etude de l'expression du gène par l'analyse de son ARNm

Le Northern blot permet d'évaluer la taille de l'ARN messager, produit de la transcription du gène étudié, ainsi que son taux d'expression. Cette technique a été utilisée par ENGSTRÖM pour détecter l'expression du gène *c-myc* [110]. L'équipe de AHERN a utilisé la technique d'hybridation en Dot blot pour étudier l'expression de l'ARN messager du gène *c-erbB-2* [2].

La PCR sur ARN messager ou RT-PCR est également une méthode utile pour détecter et mettre en évidence l'accumulation de l'ARNm du gène étudié. Cette technique a été utilisée pour la recherche de l'expression des ARN messagers des gènes *c-kit* [200] et ceux de la famille *erb* [248].

III.A.2.e Expression du produit d'un gène

La technique utilisée pour mettre en évidence les produits des gènes dans les tumeurs mammaires est l'immunohistochimie. Son principal avantage réside dans sa simplicité et son faible coût. Le principal point qui diffère d'une étude à l'autre est l'anticorps utilisé (Tableau 10).

III.A.3 Etude de gènes inconnus

L'identification de gènes inconnus par clonage positionnel est une approche puissante mais très lourde qui permet l'isolement d'un gène à partir de sa localisation génomique, sans qu'il soit nécessaire de connaître son produit. Bien que cette approche n'ait pas été utilisée dans le cadre de la recherche de gènes responsables d'une prédisposition aux tumeurs mammaires dans l'espèce canine, il est intéressant de décrire les travaux de cartographie du génome canin afin de comprendre comment certains gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes ont été localisés sur les chromosomes du Chien.

III.A.3.a La cartographie du génome du Chien

Les premières cartes du génome canin sont apparues en 1997 [223]. Avant d'envisager de dresser une carte d'un génome, il est nécessaire de disposer d'un nombre suffisant de marqueurs qui soit adapté à la résolution de la technique de cartographie envisagée.

Les cartes du génome du Chien ne cessent de se densifier en marqueurs génomiques polymorphes utiles en analyses génétiques, mais aussi, en marqueurs géniques permettant de délimiter les groupes de gènes en conservation de synténie (segments conservés au cours de l'évolution) entre les génomes du Chien et d'autres espèces.

Il existe plusieurs méthodes pour cartographier les gènes, c'est-à-dire déterminer la position des gènes au sein de l'ADN non codant en établissant des cartes du génome.

➤ La carte génétique

La carte génétique est composée de l'ensemble des séquences d'ADN dont on connaît la position dans le génome. La cartographie génétique repose donc sur l'analyse de marqueurs

sur des ADN de familles de chien. Les marqueurs génétiques représentent les séquences uniques identifiées et localisées.

La carte génétique est établie en utilisant la fréquence de co-ségrégation des allèles de marqueurs pris deux à deux, au sein de familles de référence. Polymorphisme et liaison sont à la base de la définition de la notion de marqueur :

- Pour déterminer la position d'un gène dans le génome, il est nécessaire de mettre en évidence une liaison génétique entre ce gène et un ou plusieurs marqueurs génétiques déjà localisés. Brièvement, deux marqueurs localisés sur un même chromosome sont transmis ensemble à la génération suivante, sauf si, lors de la méiose, il s'est produit un nombre impair de *crossing-overs* dans la région qui les sépare. La probabilité que de tels événements de recombinaison se produisent est proportionnelle à la distance entre les marqueurs. Le taux de recombinaison entre deux marqueurs reflète donc la distance séparant les deux marqueurs, exprimée en centiMorgan (cM).
- Les marqueurs utilisables en cartographie génétique doivent être impérativement polymorphes dans la population étudiée, puisque seule la ségrégation des marqueurs existant sous différentes formes alléliques peut être suivie d'une génération à la suivante. Les microsatellites constituent la catégorie de marqueurs génétiques les plus employés dans l'établissement de cartes génétiques chez les mammifères [12].

Concrètement, on représente la carte génétique par les chromosomes haploïdes, avec sur chaque chromosome la position de tous les marqueurs connus, et la distance qui les sépare indiquée en centimorgans.

En 1997, la première carte génétique publiée du Chien comportait 94 marqueurs microsatellites et 16 groupes de liaison, de 2 ou 3 marqueurs en moyenne [223]. Cette carte du consortium européen DogMap dont le pedigree de référence comprend 129 chiens de race pure (Berger Allemand ou Beagle), répartis dans 8 familles à 2 générations, fut ensuite complétée en 1999 [182]. De façon concomitante, un autre projet de cartographie génétique, mené par l'équipe du Dr OSTRANDER, s'est mis en place aux Etats-Unis. Le pedigree de référence américain comprend 212 individus provenant de 17 familles à trois générations [263, 475]. Par ailleurs, un pedigree de 137 chiens de race Beagle, construit à Maisons-Alfort, a permis la cartographie de 25 marqueurs qui se répartissent dans 13 groupes de liaison [445].

➤ La cartographie par hybrides d'irradiation (RH)

La méthode de cartographie à l'aide des hybrides d'irradiation est basée sur la capacité qu'ont les cellules hybrides à retenir aléatoirement des fragments chromosomiques non directement sélectionnés appartenant à la cellule d'intérêt. Brièvement, le génome à cartographier est soumis à une fragmentation par irradiation et les différents fragments chromosomiques générés sont intégrés dans des cellules receveuses de rongeurs, qui n'en conservent aléatoirement que quelques-uns. Ces cellules hybrides diffèrent les unes des autres par à leur contenu en ADN de la lignée donneuse. La liaison entre deux marqueurs peut être mise en évidence par la fréquence de leur co-rétention au sein des hybrides, puisque l'on peut prévoir que les marqueurs proches seront souvent portés par le même fragment irradié et auront tendance à être retenus dans les mêmes hybrides [186].

La distance qui sépare deux marqueurs est exprimée en centiRay (cR). La correspondance entre les centiRays et les paires de bases peut être effectuée en cartographiant avec le panel d'hybrides, des marqueurs liés qui sont déjà positionnés sur une carte physique (corrélation directe cR/pb) ou sur une carte génétique (corrélation indirecte cR/cM puis cM/pb) [186].

L'équipe du professeur GALIBERT au CNRS de Rennes (Université de Rennes 1) [451], a développé et validé un panel d'irradiation cellulaires chien/hamster (RHDF₅₀₀₀) devenu le panel de référence et mis à disposition de l'ensemble de la communauté scientifique internationale [461, 462]. Une première carte d'irradiation a été construite par cette équipe en 1998 [346] et une version intégrée de cette carte d'irradiation avec la carte génétique a été réalisée en 2000 en collaboration avec le groupe du Dr OSTRANDER [264]. Leurs travaux de cartographie ont permis d'élaborer une carte intégrée à 1800 marqueurs répartis sur les 38 paires de chromosomes et couvrant plus de 90% du génome au total [50].

➤ La cartographie physique

La carte physique correspond à la localisation physique de régions d'ADN sur les chromosomes. Les distances sont alors exprimées en paires de bases. Pour établir la carte physique, différentes méthodes sont utilisées [12] :

- L'hybridation *in situ* sur l'ADN chromosomique

Nous avons vu que les techniques d'hybridation *in situ* permettent de visualiser l'hybridation d'une sonde d'intérêt sur des chromosomes étalés sur une lame de microscope. Les chromosomes sont identifiés par *painting-FISH*. Les sondes sont obtenues soit par hybrides somatiques monochromosomiques, soit le plus souvent à partir de fractions pures de chromosomes triés par cytométrie de flux [186].

- La constitution de banques d'ADN

Des banques génomiques représentant des fragments d'ADN ont été construites, comme par exemple une banque de BAC (*bacterial artificial chromosome*) représentant 8 fois la totalité du génome canin. Dans un avenir proche, cette banque pourra être utilisée pour dresser une carte physique intégrale du génome canin [186].

III.A.3.b L'étude de synténie entre le génome canin et les génomes des autres mammifères

L'établissement de cartes de gènes de plus en plus détaillées, comme celle de l'Homme (>30 000gènes), de la Souris (>7 000 gènes) et du Rat (>3 000 gènes) a permis d'observer que des liaisons entre gènes orthologues étaient conservées au cours de l'évolution.

Des expériences de "coloriage" réciproque ont permis de délimiter des segments conservés au cours de l'évolution entre les chromosomes humains et canins. En coloriant les chromosomes canins avec des sondes spécifiques de chromosomes humains, 67 segments homologues, répartis sur l'ensemble des 38 autosomes canins, ont été détectés en 1999 par l'équipe de BREEN [49]. Un an après, la méthode de cartographie à l'aide d'hybrides d'irradiation a permis de localiser 67 segments homologues entre le caryotype canin et le caryotype humain (66 segments répartis sur les autosomes et 1 segment sur le chromosome sexuel X) [264].

Ces données de cartographie comparée et l'établissement de cartes de liaison ou physiques du génome canin (permettant de délimiter chaque segment conservé avec une bonne précision) rendent possible la stratégie du gène candidat chez le Chien. Elles permettent également de comparer les aberrations chromosomiques observées dans les

tumeurs canines et humaines afin d'identifier d'éventuels gènes impliqués dans les processus néoplasiques en se basant sur les données accumulées dans les autres espèces.

III.B Les résultats obtenus

III.B.1 Par l'analyse caryotypique

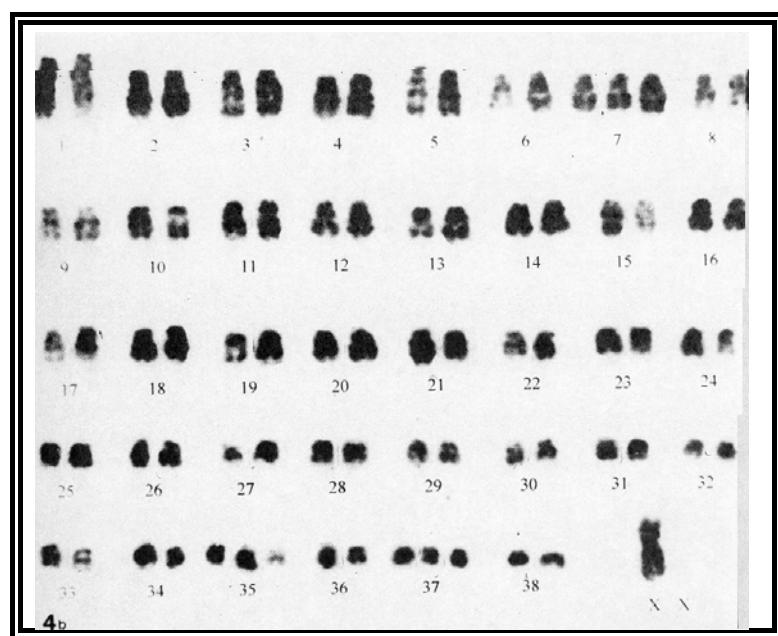
L'analyse caryotypique des tumeurs solides a principalement débuté chez le Chien au début des années 90 avec les méthodes de marquage. Les tumeurs les plus étudiées depuis cette date sont celles de la mamelle, puis celles de la cavité orale et les tumeurs cutanées [102, 357]. Selon REIMANN, 23% des tumeurs canines solides étudiées (soit 62/270) présentent des anomalies du caryotype [357]. De plus, les tumeurs d'origine mésenchymateuses montrent une incidence plus élevée d'aberrations chromosomiques que les tumeurs épithéliales [357].

Les premières études du caryotype de cellules issues de cultures de carcinomes mammaires ont été réalisées à la fin des années 70 et au début des années 80. Ces études ont permis de révéler des anomalies du nombre des chromosomes : hyperploïdie et également hypoploïdie [108, 315, 325, 327].

En 1986, WOLFE *et al.* [478] puis en 1989, l'équipe de MELLINK [265] ont remarqué une anomalie de structure dans le caryotype de cellules issues de cultures cellulaires de métastases d'un carcinome mammaire. Ainsi, il a été possible d'observer de 1 à 3 chromosomes additionnels, métacentriques, non identifiés. Ces chromosomes pourraient résulter d'une fusion centrique de chromosomes (homologues ou non) ou encore de la formation d'un isochromosome.

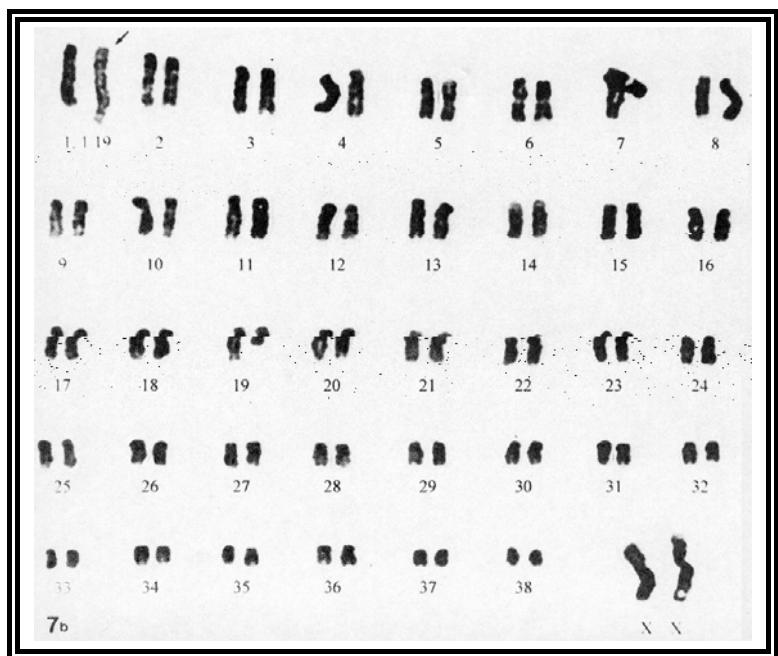
A partir des années 90, les méthodes de marquage ont permis de mettre en évidence, dans les tumeurs mammaires canines, des anomalies chromosomiques de nombre et de structure généralement complexes et hétérogènes, malgré la présence quasi systématique de fusions centriques ainsi qu'une fréquence assez importante de trisomies affectant différents chromosomes (figures 19 et 20, tableau 11) :

Figure 19. Caryotype d'une cellule d'un adénocarcinome mammaire, d'après MAYR et al. [257].



2n=80, monosomie X, trisomies 7, 35 et 37.

Figure 20. Caryotype d'une cellule d'un adénocarcinome mammaire, d'après MAYR et al. [257].



2n=78, translocation réciproque (1;19).

- La trisomie 1 est observée dans 5 tumeurs mammaires (dont 2 carcinomes, 1 adénocarcinome et 1 tumeur maligne mixte) [251, 254, 256, 257].
- Les autres chromosomes concernés sont les chromosomes 21, 25, 37 et 35, [257], le chromosome 9 [256, 265] et, avec une seule observation, les chromosomes 5 [15], 2, 3, 6 et 10 [354] et 13, 14, 16, 18 [257].

Dans certains cas les trisomies sont accompagnées de monosomie X. Cependant, dans de nombreuses tumeurs mammaires canines, les autosomes trisomiques sont présents sans monosomie X [251, 254, 256, 15].

On remarque des hyperploïdies : de 79 à 128 chromosomes identifiés concernant un carcinome [257], un adénocarcinome [257] et un ostéosarcome [252] et plus rarement des hypoploïdies de 60 [265] à 76 chromosomes (lignées cellulaires de métastases de carcinome mammaire [265], adénocarcinome [249]).

Il est intéressant de noter que les anomalies de nombre mais également de structure du chromosome X ne sont pas rares dans les tumeurs mammaires canines : monosomie X [249, 251, 257, 436], chromosome X en anneau [15, 356] ou anormal [249, 251].

Les fusions centriques sont fréquentes, impliquant souvent de petits chromosomes non identifiables [16, 249, 252, 255, 256, 257]. Ces fusions entraînent une réduction du nombre total de chromosomes [254] et la formation de larges chromosomes métacentriques : chromosomes 1 et 6 [249] ou chromosome 13 [252, 255].

Il est possible d'observer des translocations réciproques (1;19) [256] et (4;27) avec un point de cassure proche du centromère [250].

Des délétions de chromosomes ont été rapportées dans quelques cas de tumeurs mammaires canines. On retrouve la délétion du chromosome 32 dans trois tumeurs mammaires : un adénome papillaire, une tumeur bénigne mixte [253] et également un adénocarcinome canalaire [257]. De plus, les pertes de chromosomes entiers (monosomie) semblent être des altérations fréquentes dans les tumeurs mammaires canines.

Tableau 11. Les anomalies chromosomiques observées dans les tumeurs mammaires de la chienne.

Principales anomalies chromosomiques	Races et âges	Types de tumeurs mammaires	Auteurs	Années
Hypoploïdie 2n=76 Isochromosomes 1 et 6 Fusion centrique (3;38) Chromosome X anormal	Basset artésien de 9 ans	Adénocarcinome mammaire	Mayr <i>et al.</i> [249]	1990
Translocation réciproque (4;27)	Shih-tzu de 9 ans	Adénocarcinome mammaire complexe	Mayr <i>et al.</i> [250]	1990
Chromosome X anormal Trisomie 1 ; monosomie X ; Chromosomes anormaux non identifiés	Cocker de 11 ans Caniche de 11 ans	Adénocarcinome mammaire complexe Tumeur maligne mixte	Mayr <i>et al.</i> [251]	1991
Fusion centrique (1;?) Fusion centrique (1;?)	Caniche Croisé berger allemand		Barnitzke <i>et al.</i> [16]	1992
Chromosome X en anneau Trisomie 5		Tumeur bénigne mixte	Barnitzke <i>et al.</i> [15]	1992
Hyperploïdie (92 à 98 chromosomes) Chromosome 1 anormal Isochromosome 13 Isochromosome 13 Fusions centriques non identifiées Hypoploïdie (60 à 66 chromosomes) Hyperploïdie (115 à 128 chromosomes) Fusions centriques non identifiées	Berger allemand de 11 ans Berger allemand de 10 ans Caniche de 14 ans	Ostéosarcome Ostéo-chondrosarcome Chondro-ostéosarcome	Mayr <i>et al.</i> [252]	1992
Délétion du chromosome 32 Délétion du chromosome 32	Teckel de 12 ans Boxer de 10 ans	Adénome complexe papillaire Tumeur bénigne mixte	Mayr <i>et al.</i> [253]	1992
Trisomie 1	Teckel de 15 ans	Adénocarcinome tubulaire complexe	Mayr <i>et al.</i> [254]	1993

Tableau 11 (suite).

Principales anomalies chromosomiques	Races et âges	Types de tumeurs mammaires	Auteurs	Années
Fusion centrique (4;8) Isochromosome 13	Berger allemand de 9 ans	Adénocarcinome	Mayr <i>et al.</i> [255]	1994
Trisomie 1 Trisomie 9 Translocation réciproque (1;19) Fusion centrique (11;16)	Boxer Boxer Caniche		Mayr <i>et al.</i> [256]	1996
Trisomie 2 et 3 Trisomie 6 Trisomie 10			Reimann <i>et al.</i> [354]	1996
Chromosome X en anneau Inversion du chromosome X Translocation réciproque (X;5)			Reimann <i>et al.</i> [356]	1996
Délétion du chromosome 32 Monosomie X ; trisomie 35 et 37 Trisomie 9 ; fusion centrique (36;38) Trisomie 35	Race croisée de 12 ans Teckel de 10 ans Caniche de 15 ans	Adénocarcinome canalaire Adénocarcinome complexe Adénocarcinome complexe	Mayr <i>et al.</i> [257]	1998
Fusion centrique (36;38) Trisomie 21 et 25 ; hyperploïdie (2n=80) Translocation (1;19) Trisomie 21 et 25 ; fusion centrique (36;38) Hyperploïdie (79 à 86 chromosomes)	Caniche de 16 ans Caniche de 7 ans Teckel de 16 ans	Adénocarcinome tubulaire Adénocarcinome papillaire complexe Carcinome anaplasique		
Trisomie 1, 2, 13, 14, 16, 18 et 34 Monosomie X ; trisomie 7, 35, 37 Monosomie X ; trisomie 13, 35, 37 Monosomie X et 38 et trisomie 1	Race croisée de 14 ans Caniche de 3 ans	Carcinome complexe Carcinome solide		
Hypoploïdie (2n=77) Monosomie X Isochromosomes 8 ou 11 et 13 ou 15 Fusion centrique (37;38)	3 lignées cellulaires issues d'une métastase splénique d'un carcinome mammaire	Tap <i>et al.</i> [436]	1998	

A la fin des années 1990, la possibilité de disposer de sondes de "peintures" (*chromosome-specific paints*) spécifiques des chromosomes du Chien [209], permet à TAP *et al.* [436] d'analyser à nouveau, grâce à la technique FISH, une des trois cultures cellulaires (nommée SH1b) de deux métastases spléniques d'un carcinome mammaire, déjà analysées en 1989 par MELLINK *et al.* [265]. Cette nouvelle analyse permet d'identifier l'origine du chromosome métacentrique additionnel comme étant le produit d'une fusion centrique (37:38) et de détecter des altérations passées précédemment inaperçues avec la technique des bandes. Ainsi, les deux grands chromosomes métacentriques proviennent de la formation d'isochromosomes 8 ou 11 et 13 ou 15.

III.B.2 Par l'analyse quantitative de l'ADN

Les lésions hyperplasiques et les tumeurs mammaires bénignes sont pratiquement toujours diploïdes [95, 335]. Pourtant, 16% (35/225) des tumeurs mammaires bénignes étudiées sont aneuploïdes. C'est le cas de certaines tumeurs bénignes mixtes [95, 129, 384] et également d'un adénome hyperploïde [95] (tableau 12).

Selon les études, de 31 à 62 % des tumeurs malignes sont aneuploïdes, soit en moyenne 47% [95, 129, 162, 335, 373, 384]. Les tumeurs malignes mixtes, ayant un potentiel métastatique limité [153], sont pour près de la moitié d'entre elles diploïdes, leurs différents composants cellulaires ayant des contenus ADN identiques [95, 129, 162, 373].

Tous les adénocarcinomes tubulaires sont diploïdes. Le carcinome anaplasique, habituellement hautement agressif et associé à une survie réduite chez les chiens affectés, est le seul carcinome étudié à être tétraploïde [95, 162]. On remarque parfois, à l'intérieur de certaines tumeurs mammaires simples bénignes et malignes, une hétérogénéité intratumorale [95]. Dans le groupe des carcinomes solides et papillaires simples, on constate également une hétérogénéité de leur état de ploïdie [95]. Ces tumeurs appartiennent d'ailleurs à un groupe hétéroclite dans lequel les lésions sont composées à la fois de proliférations épithéliales et myoépithéliales ayant différentes propensions à métastaser.

L'index ADN de la tumeur primaire est parfois similaire à celui des métastases lymphatiques, hépatiques ou pulmonaires [335]. La ploïdie reste fixe dans les métastases de la plupart des carcinomes [162], sauf dans certains carcinomes primaires hypoploïdes associés à des métastases multiploïdes [373]. En ce qui concerne les sarcomes habituellement aneuploïdes, les métastases observées sont parfois diploïdes [162].

Tableau 12. Les anomalies de la ploïdie observées dans les tumeurs mammaires de la chienne.

Techniques	Tumeurs diploïdes	Tumeurs aneuploïdes	Types de tumeurs	Nombre de tumeurs	Auteurs	Années
Cytométrie de flux	83% 38%	7% 62%	Bénignes Malignes	23 34	Rutteman <i>et al.</i> [373]	1988
Cytométrie de flux	100% 69%	0 31%	Bénignes Malignes	14 58	Scanziani <i>et al.</i> [384]	1991
Cytométrie de flux	75% 48%	25% 52%	Bénignes Malignes	66 136	Hellmén <i>et al.</i> [162]	1993
Analyse d'image	100% 92% 63%	0 8% 37%	Hyperplasie Bénignes Malignes	5 25 60	Destrexhe <i>et al.</i> [95]	1995
Cytométrie de flux	97% 84% 51%	3% 16% 49%	Hyperplasie Bénignes Malignes	5 44 33	Pérez Alenza <i>et al.</i> [335]	1995
Analyse d'image	80% 46%	20% 54%	Bénignes mixtes Malignes mixtes	30 13	Gärtner <i>et al.</i> [129]	1999

III.B.3 Par la mise en évidence de l'hyperamplification des centrosomes

Récemment SETOGUCHI *et al.* [402] ont étudié dans 6 sarcomes canins d'origine diverse, et 3 tumeurs mammaires (1 adénome, 1 tumeur bénigne mixte et 1 adénocarcinome), l'hyperamplification des centrosomes (présence de plus de 2 centrosomes par cellule). La technique immunohistochimique permet de l'observer dans les 9 tumeurs examinées, donc dans les tumeurs mammaires bénignes et malignes.

Le pourcentage de cellules qui contiennent des centrosomes hyperamplifiés est de 9,5% pour l'adénome mammaire, 19% pour l'adénocarcinome et 48% pour la tumeur bénigne mixte. Dans les sarcomes, en moyenne 21,5% des cellules montrent un centrosome hyperamplifié. Le nombre de centrosomes détectés dans une cellule varie de 3 à 20. Les centrosomes hyperamplifiés sont anormalement larges ou petits pour certaines tumeurs et montrent parfois des formes atypiques comme de larges agrégats. Dans l'adénome mammaire, il est possible d'observer 5 centrosomes.

III.B.4 Par les études génétiques

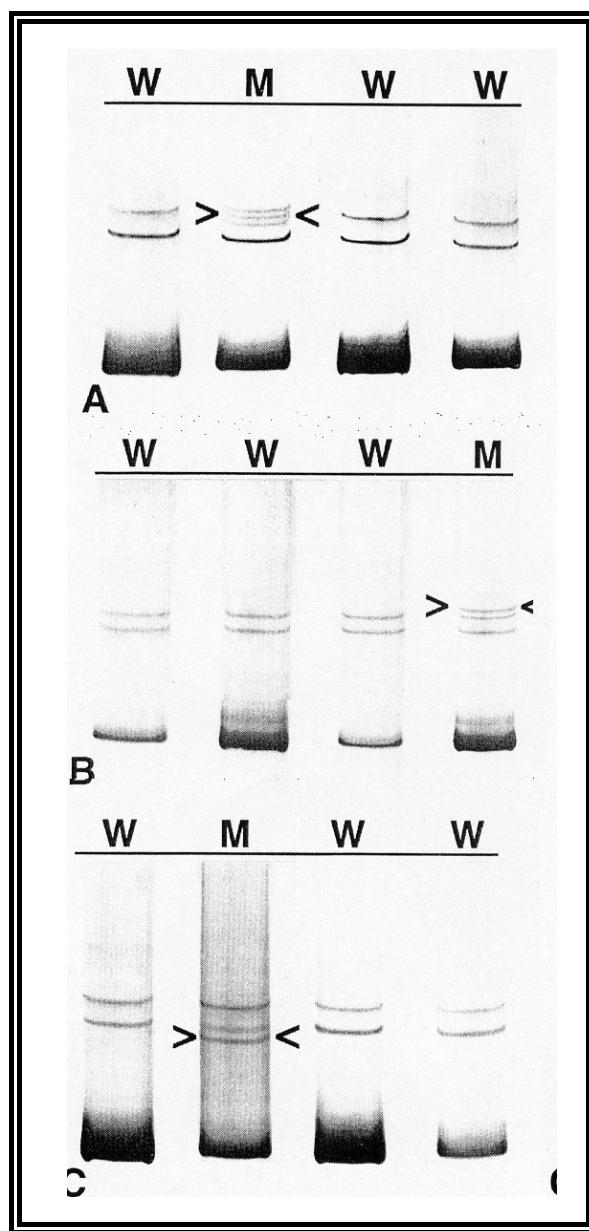
III.B.4.a Le gène *TP53*

➤ Mise en évidence et séquençage du gène *TP53* canin

Les différentes études concernant l'analyse de la séquence du gène canin *TP53* (à partir de l'ADN génomique [71] et à partir de l'ADNc [453, 457]) suggèrent que la structure exons/introns du gène est bien conservée entre les espèces humaine et canine. L'analyse de la séquence des exons 5 à 8 révèle évidemment un haut niveau d'homologie avec celle du gène *TP53* humain [308], ces exons correspondant à 4 des 5 domaines hautement conservés durant l'évolution des espèces. [71, 308]. L'existence d'un polymorphisme du gène *TP53* canin ne semble pas prouvée [183]. De plus, aucun polymorphisme lié à la race n'a été identifié [306].

Après extraction de l'ADN des échantillons, le séquençage direct des produits d'amplification (portant au minimum sur les exons 5, 6, 7 et 8 du gène) a été réalisé afin de déterminer la séquence nucléotidique du gène *TP53* de différentes tumeurs mammaires [256, 257, 259, 306, 459].

Figure 21. Analyse SCCP des exons 5 (A), 7 (B) et 8 (C) du gène *TP53* dans 4 adénocarcinomes tubulaires simples canins, d'après WAKUI *et al.* [465].



M. Tumeurs contenant une mutation du gène *TP53*

W. Tumeurs contenant le gène sauvage *TP53*

Les flèches indiquent un profil de migration électrophorétique anormal.

La recherche par SSCP a également été utilisée [71, 306, 401, 402, 453, 465]. Les fragments synthétisés par PCR ont en général une taille inférieure à 400 pb, sauf dans l'étude de SETOGUCHI *et al.* dans laquelle l'ensemble des exons 2 à 11 est étudié par le biais de 3 fragments de 437, 443 et 466 pb [401, 402].

Les méthodes utilisées pour révéler les bandes après électrophorèse sont classiques : marquage d'une des deux amores par un nucléotide portant un atome de ^{32}P puis utilisation d'un film autoradiographique [71, 401, 402] ou coloration à l'argent [453, 465] (figure 21).

Une équipe a étudié le gène *TP53* dans diverses tumeurs canines, dont deux tumeurs mammaires, par la technique de Southern blot [401]. Cette technique n'a pas permis la mise en évidence de réarrangements importants du gène *TP53* (grosses délétions ou insertions) dans les tumeurs étudiées.

➤ Fréquence des mutations

Le gène *TP53* représente le gène le plus étudié dans les tumeurs canines. Le recueil des résultats déjà obtenus montre qu'environ 115 mutations de ce gène ont déjà été identifiées dans des tumeurs canines, principalement les ostéosarcomes, les tumeurs cutanées, les hémopathies et surtout les tumeurs mammaires [197, 401]. Les mutations silencieuses, dans la mesure où elles n'altèrent pas la structure de la protéine, ne sont pas prises en compte la plupart du temps.

Un peu plus d'un quart de ces mutations a été observé dans des tumeurs mammaires canines (tableau 13) [71, 257, 259, 306, 453, 465].

Les résultats diffèrent selon les études puisque la proportion de tumeurs mammaires analysées contenant des mutations du gène *TP53* varie de 0 à 30%.

Ainsi, aucune mutation n'est remarquée dans 18 adénocarcinomes mammaires (séquençage des exons de 5 à 8) [256], ni dans l'exon 1 de 18 adénocarcinomes [261].

A l'opposé, sur 10 tumeurs mammaires (9 adénocarcinomes et un carcinome anaplasique), le séquençage des exons 5, 6, 7 et d'une partie de l'exon 8 a permis de mettre en évidence une mutation dans un adénocarcinome de type complexe [257].

Tableau 13. Les mutations du gène *TP53* dans les tumeurs mammaires canines.

Auteurs	Année	Types et nombre de tumeurs étudiées	Nombre de mutations observées	Exons analysés
Setoguchi <i>et al.</i> [402]	2001	1 adénome 1 tumeur bénigne mixte 1 adénocarcinome	0	
Wakui <i>et al.</i> [465]	2001	69 carcinomes dont 25 étudiées par [306]	12 mutations réparties dans 12 tumeurs sur 69, dont 5 observées par [306]	Exons 5 à 8
Setoguchi <i>et al.</i> [401]	2001	1 tumeur bénigne mixte 1 adénome	0	Exons 2 à 11
Mayr <i>et al.</i> [261]	2000	18 adénocarcinomes	0	Exon 1
Muto <i>et al.</i> [306]	2000	38 tumeurs bénignes 25 carcinomes	4 mutations réparties dans 4 tumeurs 6 mutations réparties dans 5 tumeurs (une tumeur ayant 2 mutations)	Exons 5 à 8
Mayr <i>et al.</i> [259]	1999	11 adénomes 15 adénocarcinomes	1 mutation silencieuse 1	Une partie des exons 4, 5 et 8, exons 6 et 7
Veldhoen <i>et al.</i> [459]	1999	4 adénomes 5 carcinomes 1 sarcome	3 tumeurs présentent des mutations : 1 dans un carcinome 4 mutations dans une même tumeur 1 mutation dans un adénome	Exons 2 à 8
Mayr <i>et al.</i> [257]	1998	10 carcinomes	1	Exons 5, 6, 7, une partie de l'exon 8
Chu <i>et al.</i> [71]	1998	11 tumeurs bénignes 40 carcinomes	0 6 mutations réparties dans 6 tumeurs	Exons 2 à 11
Mayr <i>et al.</i> [256]	1996	18 carcinomes	0	Une partie des exons 5 et 6, exons 7 et 8
Van Leeuwen <i>et al.</i> [453]	1996	9 lignées cellulaires de tumeurs mammaires	3	Exons 4 à 11

Dans une autre étude, 6 mutations ont été observées après amplification des exons 2 à 11 de 40 carcinomes mammaires, analyse par SSCP et séquençage des fragments présentant une migration anormale [71]. De même, 1 mutation a été décrite après étude des exons 2 à 8 de 5 carcinomes [459] et d'une partie des exons 4, 5 et 8 et des exons 6 et 7 de 15 adénocarcinomes [259]. Douze mutations ont été mises en évidence dans 12 tumeurs sur les 69 carcinomes analysés après séquençage de la totalité des exons 5 à 8 [306, 465].

Les études réalisées sur des tumeurs bénignes de chiennes montrent également des résultats variés. En effet, dans une étude, 4 mutations ont été observées sur les 38 tumeurs mammaires bénignes étudiées, après séquençage portant sur la totalité des exons 5 à 8 [306].

A l'opposé, une mutation a été observée après étude des exons 2 à 8 de 4 adénomes mammaires [459] et une mutation silencieuse a seulement été mise en évidence dans un adénome mammaire sur les 11 analysés [259]. Dans trois autres études, aucune mutation n'a été observée dans 13 adénomes [71, 401, 402] et 2 tumeurs bénignes mixtes [401, 402].

Les mutations du gène *TP53* ont également été recherchées dans 9 lignées cellulaires de tumeurs mammaires, dont 5 issues de tumeurs primaires, et 4 de métastases [453]. Une mutation est présente dans 3 cultures cellulaires primaires (1 tumeur bénigne mixte atypique et 2 ostéosarcomes mammaires) alors que les tissus mammaires normaux de ces patients ne présentent pas de mutations. Dans une seule des cultures (tumeur bénigne mixte atypique), la mutation n'est pas détectée dans la tumeur d'origine : la mutation aurait pu se produire durant le processus de l'établissement de la culture cellulaire.

La plupart des tumeurs mammaires étudiées ne contient qu'une seule mutation du gène *TP53*, à l'exception d'un carcinome présentant deux mutations ponctuelles sur les codons 163 et 245 [306] et d'une tumeur dont l'origine n'est pas précisée [459]. Sur celle-ci, on peut ainsi remarquer un phénomène d'hypermutation (déjà identifié chez l'Homme) qui serait du à un "bégaiement" de l'ADN polymérase pendant la réPLICATION : 3 mutations ponctuelles sont regroupées au niveau de l'exon 2 et une troisième sur l'exon 82 [459].

Tableau 14. Localisation des mutations du gène TP53 observées dans les tumeurs mammaires canines.

Exons	Codons	D	Types de tumeurs	Mutations	Acides aminés	Races	Auteur	Années
2	34		3 mutations issues de la même tumeur	GAA→GAT	Glu→Asp	? Silencieuse Asn→Lys	[459]	1999
	35		(A) de type histologique non déterminé	TTG→CTG	Silencieuse			
	37			AAC→AAG	Asn→Lys			
4	82		Tumeur (A) Adénome	CCC→CTC CCC→CTC	Pro→Leu Pro→Leu	? Boxer	[459]	1999
	116		Adénome mammaire	TCC→TCT	Silencieuse			
?			Carcinome complexe ou solide	Insertion C	<i>frameshift</i>	? Pro→Ser	[71]	1998
			Carcinome complexe ou solide	TCC→TTC	?			
138			Carcinome solide	GCG→GTG	Ala→Val	Labrador	[459]	1999
			Adénome complexe	AGC→AGA	Ser→Arg			
148			Carcinome	GCG→GTG	Ala→Val	Labrador	[306]	2000
			Adénocarcinome tubulaire simple * (1)	ATC→TTC	Ile→Phe			
163			Adénocarcinome tubulaire simple	CGG→CAG	Arg→Gln	Croisée	[306]	2000
			Adénocarcinome tubulaire complexe	CGC→TGC	His→Ala			
174	III		Adénocarcinome tubulaire simple	CGG→CAG	Arg→Gln	Teckel	[465]	2001
	III		Adénocarcinome tubulaire complexe	CGC→TGC	His→Ala			
5	175		Adénocarcinome	CGC→CAC	Arg→His	Cocker	[259]	1999
	176	III	Tumeur bénigne mixte atypique	TGC→TTC	Cys→Phe			
180	III		Carcinome solide simple	GAA→TAA	Non sens	Teckel	[465]	2001
			Adénocarcinome tubulaire simple	GAA→TAA	Non sens			
?			Carcinome complexe ou solide	Délétion G	<i>frameshift</i>	? [71]	1998	[71]

D : Domaines hautement conservés

*: Tumeurs communes aux études de [465] et [306]

(1): La même tumeur présente 2 mutations

Tableau 14 (suite).

Exons	Codon	D	Types de tumeur	Mutations	Acides aminés	Races	Auteur	Années
6	?		Carcinome complexe ou solide	CGA→TGA	Non sens	?	[71]	1998
	236	IV	Ostéosarcome	TAC→AAC	Tyr→Asn	?	[465]	1999
			Adénocarcinome tubulaire simple * (1)	GGC→GAC	Gly→Asp	Croisée	[306]	2000
			Adénocarcinome tubulaire simple	GGC→GAC	Gly→Asp	Croisée	[465]	2001
245	IV	Carcinome solide simple		GGC→GAC	Gly→Asp	Spitz	[465]	2001
		Adénome complexe		GGC→GAC	Gly→Asp	Croisée	[306]	2000
		Ostéosarcome		GGC→GCC	Gly→Ala	?	[465]	1999
7		Adénocarcinome tubulaire complexe *		CGG→TGG	Arg→Trp	Croisée	[306]	2000
	249	IV	Adénome complexe	CGG→TGG	Arg→Trp	Croisée	[306]	2000
		Adénocarcinome complexe		CGG→TGG	Arg→Trp	Berger Allemand	[257]	1998
252	IV	Adénocarcinome papillaire kystique		CTC→TTC	Leu→Phe	Caniche	[306]	2000
	?	Carcinome complexe ou solide		Délétion ACT→ACA	Délétion Tyr et Asn	?	[71]	1998
		Adénocarcinome tubulaire simple		GAG→GTG	Glu→Val	Shih-Tzu	[465]	2001
		Adénocarcinome tubulaire simple		GAG→GTG	Glu→Val	Croisée	[465]	2001
8	271	V	Adénocarcinome tubulaire simple	GAG→GTG	Glu→Val	Teckel	[306]	2000
		Tumeur bénigne mixte		GAG→GTG	Glu→Val			
	303		Carcinome solide simple	GGG→AGG	Gly→Arg	Croisée	[465]	2001

➤ Répartition des mutations

L'étude des mutations du gène canin *TP53* dans les tumeurs mammaires révèle que ces mutations sont situées sur les exons 2, 4, 5, 6, 7 et 8 (tableau 14) [71, 257, 259, 306, 453, 465]. Les différentes études se sont focalisées sur les exons 2 à 8, et en particulier 5 à 8, si bien que seuls Mayr 2000 *et al.* [261] se sont intéressés à la région promotrice et à l'exon 1, sans réussir à mettre en évidence des mutations dans cette région dans les 18 adénocarcinomes mammaires de chienne étudiés ni dans les 243 tumeurs de différentes origines de chiens, chats, chevaux et bovins.

L'analyse de la répartition des mutations fait apparaître que les mutations sont situées sur une vingtaine de codons différents, mais que 5 codons (175, 180, 245, 249 et 271) regroupent 65% des mutations. De plus, 83% des mutations sont regroupées dans 3 des 5 domaines hautement conservés au cours de l'évolution [306, 465] :

- codons 174, 175 et 180 de l'exon 5 (domaine III),
- codons 245, 249, 252 de l'exon 7 (domaine IV),
- codon 271 de l'exon 8 (domaine V)

➤ Le profil des mutations

L'étude des mutations de *TP53* détectées dans des tumeurs canines révèle la présence de nombreuses mutations ponctuelles correspondant à des substitutions. Les insertions et les délétions ne représentent que 19% de l'ensemble des mutations [197].

Comme dans les autres tumeurs canines [197], un peu plus de la moitié des mutations observées dans les tumeurs mammaires sont représentées par des transitions et parmi celles-ci, on note une très forte prédominance de mutations de type G:C→A:T. Les transversions G:C→T:A et A:T→T:A sont plus rares (observées 6 fois chacune).

Les codons 175, 245, 249 et 271, qui regroupent 60% des mutations observées dans les tumeurs mammaires de la chienne, contiennent le dinucléotide CpG. Dans l'étude de Muto *et al.* [306], les transitions observées sont très souvent localisées à des sites CpG dans les tumeurs bénignes (100%) et dans les tumeurs malignes (75%). Ce type de mutation localisée à un site CpG résulte généralement d'une altération endogène de l'ADN par désamination de la 5-méthylcytosine.

En dehors des mutations ponctuelles, d'autres types de mutations ont été observés dans 4 tumeurs mammaires (tableau 15) [71] :

- 2 mutations entraînant une modification du cadre de lecture (*frameshift*) : une délétion et une insertion d'un nucléotide induisant des arrêts précoce de la traduction (exons 4, 5 et 6) et donc une protéine TP53 tronquée,
- 1 délétion de 6 nucléotides entraînant une délétion de deux acides aminés (exon 7),
- 1 épissure (*splice-site* conduisant à un épissage incorrect de l'ARN).

Ce dernier type de mutation se trouvant dans le site d'épissage de l'intron 5 affecte probablement l'épissage du transcrit *TP53*. Pour confirmer cela, une RT-PCR concernant la région de jonction des exons 4 et 5 a été réalisée à partir de l'ARN de cette tumeur ainsi que de sa métastase. Le fragment d'ADN obtenu est plus mobile en électrophorèse que le fragment attendu après épissage normal, ce qui signifie qu'il est plus court. Cela suggère que l'épissage ne s'est effectivement pas réalisé avec le site normal de l'exon 5 mais avec un autre site accepteur, plus éloigné. Il en résulte que la protéine *TP53* produite contient une délétion de 7 ou 11 acides aminés.

Bien que la perte de l'allèle sauvage du gène *TP53* ne soit pas mise en évidence dans les différentes études, VELDHOEN *et al.* n'identifient pas l'*TP53* sauvage [459]. Lorsque celui-ci est parfois détecté, il n'est pas possible de savoir s'il coexiste avec l'allèle muté car sa présence pourrait également provenir de la contamination des échantillons par des tissus non tumoraux.

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'un chien de race Boxer atteint d'un adénome mammaire a été identifié comme étant porteur de mutations germinales du gène *TP53* [459]. En effet, l'analyse révèle des mutations du gène à la fois dans les tissus normaux

-un allèle du gène contient une large délétion de séquence d'ADN incluant les exons 3 à 7,
-le deuxième allèle contient une substitution (CCC→CTC), observée à la fois dans les tissus normaux et dans les cellules tumorales, sur le codon 82 entraînant le remplacement proline par leucine (Pro82Leu). Cependant, cette substitution pourrait également représenter un polymorphisme du gène *TP53* canin car celle-ci est retrouvée chez un autre chien atteint d'une tumeur mammaire montrant quatre mutations [459].

Tableau 15. Mutations du gène TP53 observées sur 6 des 40 carcinomes mammaires étudiés, d'après CHU et al. [71].

Cas	Exons mutés	Mutations
1	4	<p>...TGC TCC CAG... ... Ala Pro Arg ...</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>...TGC <u>TTC</u> CAG... ... Ala Ser Arg ...</p>
2	4	<p>...CCG GCC CCC TCC TGG... ...Pro Ala Pro Ser Trp ...</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>...CCG GCC CCC <u>CTC</u> CTG G... ... Pro Ala Pro Leu Leu...</p>
3	5	<p>...GTG CG<u>G</u> CGC TGC C... ... Val Arg Arg Cys ...</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>...GTG CGC GCT GCC... ... Val Arg Ala Ala...</p>
4	6	<p>...TTT <u>CGA</u> CAC... ... Phe Arg His...</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>...TTT <u>TGA</u> CAC... ... Phe ***</p>
5	7	<p>...ACC ATC <u>CAC TAC AAC</u> TAC... ... Thr Ile His Tyr Asn Tyr...</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>...ACC ATC CAC TAC... ... Thr Ile His Tyr...</p>
6	Intron 5	<p>...agTAC TCC CCT... ... Tyr Ser Pro...</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>...aaTAC TCC CCT... ... Tyr Ser Pro...</p>

Cas 1 : substitution d'un acide aminé suite à la mutation ponctuelle C→T

Cas 2 : arrêt précoce de la traduction suite à l'insertion d'un acide aminé (C)

Cas 3 : arrêt précoce de la traduction suite à la délétion d'un acide aminé (G)

Cas 4 : mutation ponctuelle C→T, non sens, entraînant un arrêt précoce de la traduction

Cas 5 : délétion de 6 nucléotides entraînant une délétion interne de deux acides aminés

Cas 6 : délétion d'acides aminés suite à l'épissure intron 5 ag→aa

Les mutations avec décalage du cadre de lecture ou *frameshift* (c'est à dire, les délétions ou insertions qui ne sont pas des multiples de trois paires de bases changeant le cadre de lecture) sont ici représentées par une petite insertion (cas 2) et une petite délétion (cas 3).

➤ La protéine canine TP53

D'après la séquence nucléotidique, la longueur de la protéine codée par le gène *TP53* canin serait de 381 acides aminés [71]. La protéine TP53 du Chien est semblable en structure, à la protéine TP53 humaine. Selon les études, le produit du gène canin *TP53* est identique à la protéine humaine à 81% [71], 83% [199, 456] ou 88% [453]. Dans les domaines hautement conservés II, III, IV et V, le degré d'homologie est supérieur à 90% [71, 199]. La protéine TP53 du Chien remplit la même fonction que la protéine humaine (activation de la transcription, liaison à l'ADN, réparation des dommages de l'ADN) [456].

➤ Expression de la protéine TP53

La protéine mutée TP53 étant plus stable que la protéine sauvage (demi-vie de plusieurs heures contre 20 minutes pour le type sauvage), elle s'accumule dans le noyau des cellules tumorales, ce qui permet sa détection en utilisant la technique immunohistochimique. Cette technique simple et de faible coût est systématiquement utilisée dans les différentes études concernant les tumeurs mammaires de la chienne [128, 147, 175, 365, 386, 465].

La protéine TP53 est fréquemment exprimée dans les tumeurs spontanées du Chien. Elle est ainsi présente, entre autres, dans les tumeurs colorectales épithéliales [477], les mastocytomes cutanés [133, 179], les tumeurs du testicule [176], les ostéosarcomes [377], les épithéliomas épidermoïdes [437] et les tumeurs mammaires [128, 147, 175, 365, 386, 465]. Selon GAMBLIN *et al.* [128] 32% des tumeurs analysées dans son étude expriment la protéine TP53, mais avec des niveaux d'expression variant fortement selon le type de tumeur (tableau 16).

Dans cette étude, le nombre d'adénocarcinomes mammaires exprimant la protéine (2 sur 16 soit 12%) est le plus faible comparativement aux adénocarcinomes des autres types ainsi qu'aux différents types de sarcomes.

Dans une autre étude, seulement 4 carcinomes mammaires solides sur les 16 étudiés montrent une expression nucléaire de la TP53 alors qu'aucun des 12 adénocarcinomes n'exprime cette protéine, si bien que seulement 14% des tumeurs malignes se révèlent positives [386].

Les valeurs obtenues dans l'étude de RUNGSIPAT *et al.* [365] sont plus élevées puisque 25% des tumeurs mammaires étudiées (15 sur 61) expriment la protéine TP53 (tableau 17) :

- 4 tumeurs bénignes sur les 25 étudiées (16%),
- 11 tumeurs malignes sur 36 (31%)

Ces valeurs sont du même ordre que celles obtenues par WAKUI *et al.* [465] qui révèlent que 29% des carcinomes analysés (20/69) montrent une expression de TP53.

Dans l'étude d'INOUE *et al.* [175], les 9 tumeurs bénignes ne montrent pas d'expression de la protéine TP53 et sur les 5 adénocarcinomes étudiés, 3 montrent une réactivité faible alors que les 5 ostéosarcomes mammaires présentent une réactivité intense à modérée (tableau 18).

L'étude de HAGA *et al.* [147] démontre également que les ostéosarcomes mammaires expriment fréquemment TP53 (tableau 19), ce que l'on retrouve dans une autre étude dans laquelle un ostéosarcome mammaire présente plus de 50% de cellules marquées [377]. Il semblerait d'ailleurs que la fréquence globale d'altération de la protéine TP53, évaluée par immunohistochimie, pour l'ensemble des ostéosarcomes (osseux et extra-osseux) soit relativement élevée (82%) [197].

Dans cette étude le pourcentage de tumeurs malignes exprimant TP53 est très élevé : 50 à 60 % des tumeurs étudiées réagissent contre l'un ou l'autre des deux anticorps anti-TP53 utilisés, 35% contre les deux et 75% contre l'un ou l'autre.

Tableau 16. Expression de la protéine TP53 dans 226 tumeurs canines, d'après GAMBLIN *et al.* [128].

Types de tumeurs	Nombre de tumeurs	Nombre de tumeurs positives	% de tumeurs positives
<i>Sarcomes</i>			
Chondrosarcome	15	7	47
Hémangiosarcome	16	7	44
Fibrosarcome	17	6	35
Hémangiopéricytome	17	0	0
<i>Carcinomes</i>	115	40	35
Epithélioma épidermoïde	16	11	69
Adénocarcinome nasal	19	11	58
Adénocarcinome des sacs anaux	16	8	50
Adénocarcinome des glandes apocrines	16	4	25
Adénocarcinome gastrique et intestinal	17	4	24
Adénocarcinome mammaire	16	2	12.5
Carcinome transitionnel	15	0	0
<i>Tumeurs à cellules rondes</i>	46	12	26
Lymphome	15	6	40
Mastocytome	16	4	25
Histiocytome	15	2	13
TOTAL	226	72	32

L'immunoréactivité est évaluée selon un système basé sur le pourcentage de noyaux marqués :

-note 0 : aucun noyau marqué

-note 2 : tumeurs ayant 10 à 50% des noyaux marqués

-note 1 : <10% de noyaux marqués

-note 3 : >50% des noyaux marqués

Les tumeurs ayant une note 2 ou 3 sont considérées comme positives.

Tableau 17. Immunomarquage de la protéine TP53 dans 61 tumeurs mammaires canines, d'après RUNGSIPIPAT *et al.* [365].

Types de tumeurs	Nombre de tumeurs étudiées	Nombre de tumeurs présentant une expression du produit de TP53
Tumeurs bénignes	25	4
Adénome simple		2
Adénome complexe		1
Tumeur bénigne mixte		1
Adénome avec inflammation		0
Tumeurs malignes	36	11
Adénocarcinome simple		5
Adénocarcinome complexe		2
Carcinome solide		2
Carcinome sclérosant		1
Tumeur maligne mixte		1
Myoépithélioma malin		0
Total	61	15

Tableau 18. Expression de la protéine TP53 dans 22 tumeurs mammaires canines, d'après INOUE *et al.* [175].

Types histologiques	Nombre total	Pourcentage de cellules colorées	Expression
Ostéosarcome	5	64% 75% 20% 35% 45%	++ ++ + + +
Adénocarcinome	5	8% 5% 3% 0 0	+/- +/- +/- - -
Myoépithélioma malin	3	6% 8% 0	+/- +/- -
Tumeur bénigne mixte	6	0	-
Myoépithélioma	3	0	-

- : aucune réactivité

+/- : réactivité faible

+ : réactivité modérée

++ : réactivité intense

Tableau 19. Expression du produit de TP53 dans 20 tumeurs mammaires canines, d'après HAGA *et al.* [147].

Types histologiques	Anticorps BP53-12	Anticorps Pab122	
Ostéosarcomes	+	+ (cart)a	
	-	+ (cart)a	
	-	+ (cart)a	
	-	+ (cart)a	
Carcinosarcomes	+	+ (cart)a	Total BP53-12 10 tumeurs (50%)
	+	-	Total Pab 122 12 tumeurs (60%)
	-	-	
Carcinomes solides	+	-	BP53-12 et Pab 122 7 tumeurs (35%)
	+	-	
	-	+ (cart)a	BP53-12 ou Pab 122 15 tumeurs (75%)
	-	-	
Carcinomes complexes	+(cyt)b	+ (cart)a	
	-	+(nucleus)c	
	-	-	
Carcinome tubulo-papillaire	-	-	

(a) dans le cytoplasme des cellules de cartilage

(b) dans le cytoplasme des cellules de l'adénocarcinome

(c) dans le noyau des cellules de l'adénocarcinome

III.B.4.b Les gènes *BRCA1*, *BRCA2* et *Rad51*

En 1996, SZABO *et al.*, [434] ont étudié la séquence du gène *BRCA1* canin. La majorité de l'exon 11, qui contient environ 60% du gène, a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique canin, en utilisant des amorces correspondant au gène humain. Pour le reste du gène, des fragments complémentaires d'ADN ont été amplifiés à l'aide d'amorces dérivées du gène humain ou une combinaison d'amorces humaines et d'amorces dérivées de la séquence canine.

Cette étude révèle que la séquence de nucléotides des gènes humain et canin est identique à 84% alors que le gène murin n'est identique qu'à 72 % au gène humain. De plus, la protéine correspondante comprend 1878 acides aminés et est similaire à 89,6% à la protéine humaine.

Les extrémités carboxy- et amino- terminales sont hautement conservées (plus de 80%) alors que la portion centrale du gène, correspondant pour une grande part à l'exon 11, est assez différente, conservant seulement 70% d'homologie entre les protéines de l'Homme et du Chien.

Nous avons vu que les polymorphismes du gène *BRCA1* identifiés dans les cancers du sein sont situés dans les régions de moindre conservation entre les espèces alors que les mutations faux-sens, localisées dans les domaines hautement conservés, ont des significations cliniques.

Deux analyses récentes portent sur la mise en évidence de polymorphismes sur le gène canin *BRCA1* n'entraînant pas de conséquences cliniques. L'étude de GRAY et YUSBASIYAN-GURKAN [137] a permis de montrer l'existence d'un polymorphisme intronique chez un chien de race croisé (sur les 6 étudiés). Une variation dans la séquence de l'intron 23 du gène canin est, en effet, mise en évidence par une modification des profils d'expression. L'analyse directe de la séquence de l'intron 23 de ce chien révèle une transversion (T→G) et permet donc de détecter chez ces 8 chiens 2 allèles différents du gène. Dans la seconde étude, l'amplification de l'intron 14 du gène, à partir de l'ADN génomique d'échantillons sanguins de 103 chiens de 30 races, permet d'identifier, sur l'intron 14 du gène, un polymorphisme (lié au nombre de répétition du motif CT) au niveau d'un microsatellite [448]. Cinq allèles du microsatellite (numérotés selon la longueur des fragments) sont alors mis en évidence chez 103 chiens de 30 races différentes (tableaux 20 et 21). L'allèle 2 est le

Tableau 20. Distribution, parmi 103 chiens, des génotypes du polymorphisme de microsatellite à l'intérieur de l'intron 14 du gène canin *BRCA1*, d'après TSUSHIDA et al. [448].

Génotypes	Nombre d'observation	Fréquence (%)
1/2	6	2.8
1/4	1	1
2/2	72	69.8
2/3	15	14.6
2/4	3	2.9
2/5	1	1
3/3	2	1.9
3/4	1	1
4/4	1	1
5/5	1	1

Tableau 21. Fréquence des différents allèles et séquences polymorphes du polymorphisme de microsatellite à l'intérieur de l'intron 14 du gène canin *BRCA1*, d'après TSUSHIDA et al. [448].

Allèles	Fréquence	Séquences
1	0.034	(CT) ₁₀ (GT) ₂
2	0.820	(CT) ₁₂ (GT) ₂
3	0.097	(CT) ₁₃ (GT) ₂
4	0.034	(CT) ₁₈
5	0.015	(CT) ₁₉

plus fréquemment rencontré, alors que les allèles 4 et 5 ne sont présents que chez quelques chiens. Il est intéressant de remarquer 2 génotypes rares 4/4 et 5/5, respectivement observés chez un Basset Hound et un Colley.

Une équipe japonaise a, depuis peu, cloné et séquencé l'ADN complémentaire des gènes canins *BRCA2* et *Rad51* [318]. La séquence de la protéine BRCA2 du Chien montre seulement 68% d'homologie avec la protéine humaine, mais la région C-terminale comprenant le domaine d'interaction avec Rad51 (domaine BRC) est très conservée entre ces deux espèces. Il en est de même de la région N-terminale (motif "ring finger"). La comparaison de la séquence obtenue par cette équipe avec la séquence de l'exon 11 du gène révélée par les travaux de BIGNELL *et al.* [31] suggère l'existence de polymorphismes représentés par plusieurs substitutions de nucléotides contribuant parfois à une substitution d'acides aminés. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'un de ces polymorphismes altère le domaine d'interaction avec Rad51, ce qui aboutit très certainement à une altération du rôle de suppresseur de tumeur de ce gène puisque l'interaction de la protéine BRCA2 avec la protéine Rad51 est indispensable pour les mécanismes de réparation de l'ADN. La protéine canine Rad51, quant à elle, est identique à 99% à la protéine humaine. De plus, l'expression de ces 2 gènes a été détectée dans la glande mammaire (également les ovaires, les testicules et le cerveau), suggérant une interaction de ces 2 gènes dans la glande mammaire de chienne.

Le clonage et le séquençage de ces deux gènes pourra permettre d'envisager leurs relations dans l'espèce canine ainsi que l'étude de leurs mutations dans les tumeurs mammaires de la chienne afin de savoir si ces deux gènes sont responsables d'une éventuelle prédisposition à ce type de cancer.

III.B.4.c Le gène *CDH1*

L'expression de la cadherine E dans les tumeurs mammaires a été étudiée en 1997. L'analyse immunohistochimique de cette molécule révèle un marquage situé sur les limites intercellulaires des cellules épithéliales dans la glande mammaire normale. L'immunoréactivité est réduite et hétérogène dans les adénocarcinomes mammaires tubulaires et papillaires, et absente des carcinomes solides [358].

III.B.4.d L'oncogène *c-erbB-2*

Chez le Chien, la surexpression du gène *c-erbB-2* a été mise en évidence dans des cultures cellulaires de mélanomes canins principalement dans celles à haut potentiel métastatique [1].

L'expression (ARNm et protéine) des récepteurs proto-oncogènes à activité kinase a principalement été étudiée dans des prélèvements de tissus mammaires normaux et tumoraux, ainsi que dans des lignées cellulaires de tumeurs mammaires d'origine épithéliale et myoépithéliale [2, 248, 365, 386].

Ainsi, l'expression des ARN messagers des gènes de la famille *erbB* a été étudiée dans 12 tumeurs mammaires de chiennes et dans 2 échantillons de tissus mammaires normaux (tableau 22) [248]. Après extraction de l'ARN total des tissus normaux et tumoraux, et action *in vitro* de la transcriptase inverse, les fragments d'ADNc sont amplifiés par RT-PCR, à l'aide d'amorces réalisées à partir de la séquence de la région très conservée entre les espèces correspondant aux gènes humains de la famille *erb*. Selon les données humaines, la longueur de chaque produit d'amplification est de 380 bp pour *c-erbB-1*, 500 bp pour *c-erbB-2*, 644 bp pour *c-erbB-3* et 416 pour *c-erbB-4*. De telles bandes ne sont pas observées dans les deux échantillons mammaires normaux alors qu'au moins un membre de cette famille est exprimé dans chaque échantillon de tumeurs mammaires (figures 22 et 23). Les produits amplifiés sont ensuite purifiés à partir du gel d'agarose et leur séquence nucléotidique est déterminée.

Comme le montre le tableau 23, chaque produit d'amplification est fortement homologue à celui d'autres espèces.

L'expression des ARN messagers des gènes *c-erbB-1*, *c-erbB-2*, *c-erbB-3* et *c-erbB-4* est visible respectivement dans 12, 10, 7 et 9 échantillons, cependant avec des niveaux d'expression très variables. Il est intéressant de noter que les 4 membres de la famille *erbB* sont fortement exprimés dans la tumeur bénigne mixte [248]. Cependant, aucune corrélation n'est observée entre les types de tumeurs malignes et les niveaux d'expression des ARNm des gènes de la famille *erbB*.

Tableau 22. Expression des gènes de la famille *erbB* dans 12 tumeurs mammaires d'après MATSUYAMA et al. [248].

N°	Types histologiques	<i>erbB-1</i>	<i>erbB-2</i>	<i>erbB-3</i>	<i>erbB-4</i>
1	Adénocarcinome	+	+	-	-
2	Tumeur bénigne mixte	+	+	+	+
3	Tumeur maligne mixte	+	+	-	+
4	Tumeur maligne mixte	+	+	+	+
5	Tumeur maligne mixte	+	+	+	+
6	Tumeur maligne mixte	+	+	-	+
7	Tumeur maligne mixte	+	-	+	+
8	Adénocarcinome	+	+	+	+
9	Tumeur maligne mixte	+	+	-	-
10	Adénocarcinome	+	-	+	+
11	Tumeur maligne mixte	+	+	-	-
12	Tumeur maligne mixte	+	+	+	+

Figure 22. Expression des ARNm des gènes de la famille *erbB* dans les 12 échantillons de tumeurs mammaires du tableau 22, d'après MATSUYAMA et al. [248].

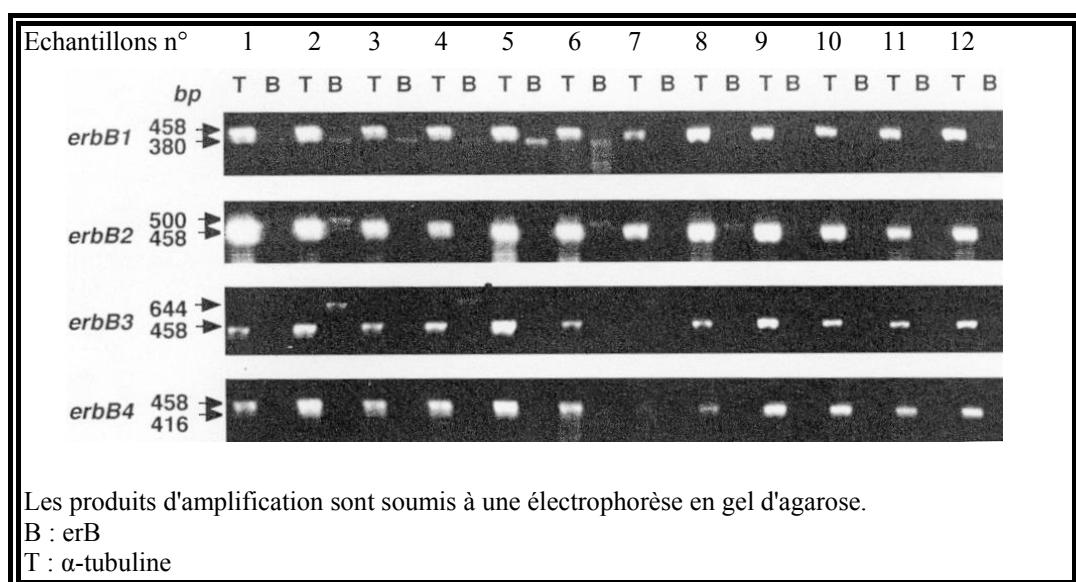


Figure 23. Niveaux relatifs des produits d'amplification des ARNm des gènes de la famille *erbB* dans les tumeurs du tableau 22, d'après MATSUYAMA *et al.* [248].

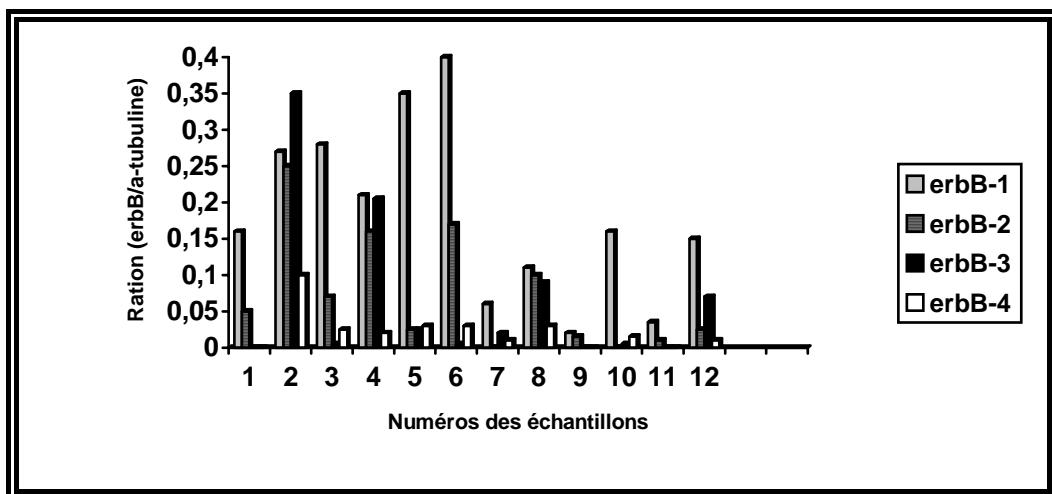


Tableau 23. Comparaison des produits d'amplification des ARNm des gènes canins de la famille *erbB* avec d'autres espèces d'après MATSUYAMA *et al.* [248].

Espèces	Homologie (%)			
	<i>erbB-1</i> (380bp/126aa)*	<i>erbB-2</i> (500bp/166aa)*	<i>erbB-3</i> (644bp/214aa)*	<i>erbB-4</i> (416bp/138aa)*
	85.5%/95.2%	91.8%/91.0%	92.1%/92.5%	93.3%/98.6%
	84.2%/90.5%	-	-	-
	82.6%/90.5%	84.1%/96.8%	84.5%/85.5%	86.1%/92.0%
	-	85.0%/86.1%	-	-
	74.5%/77.8%	-	-	-

vers des ADNc et le nombre d'aci 1

Auparavant, l'expression de l'ARN messager du gène *c-erbB-2* avait été évaluée, par AHERN *et al.* [2], par hybridation (Dot blot) dans 5 tumeurs mammaires bénignes et 23 tumeurs malignes (tableau 24) ainsi que dans une lignée cellulaire de tumeur mammaire canine. La surexpression de l'ARNm dans l'échantillon est définie par une intensité de la tache radioactive supérieure ou égale à deux fois la densité obtenue dans un échantillon de référence (tissu mammaire d'une chienne saine en lactation). Aucune des 5 tumeurs mammaires bénignes analysées ne montre de surexpression de l'ARNm du gène *c-erbB-2* (0,4 à 1,7 fois le niveau de référence) à la différence de 74% des tumeurs malignes (17/23). L'expression dans les 17 tumeurs malignes est 2 à 9,2 fois supérieure à celle du témoin. Une association significative entre le caractère malin et la surexpression de l'ARNm de *c-erbB-2* est ainsi observée ($P=0,005$). L'analyse des lignées cellulaires de 7 tumeurs mammaires révèle des niveaux d'expression supérieurs ou égaux à 2 fois le niveau de référence (fibroblastes canins normaux) dans 2 lignées et à 1,5 fois dans 3 lignées.

L'évaluation immunohistochimique de la protéine $p^{185\text{erbB-2}}$ réalisée dans deux études, révèle une expression de la protéine, plus faible que ce que laisserait supposer l'étude précédente. Selon SCHAFER *et al.* [386], seulement 39% des tumeurs malignes analysées expriment la protéine $p^{185\text{erbB-2}}$: 43% des carcinomes solides et 33% des adénocarcinomes (tableau 25). L'analyse immunohistochimique de 79 tumeurs mammaires réalisée par RUNGSIPAT *et al.* [365], révèle une surexpression de $p^{185\text{erbB-2}}$ dans 32% des tumeurs analysées (dans 50% des tumeurs bénignes et dans seulement 19% des tumeurs malignes). De plus, parmi ces 9 tumeurs malignes qui montrent un marquage positif de $p^{185\text{erbB-2}}$, 8 sont représentées par des adénocarcinomes (soit 24% des adénocarcinomes). Aucun des 5 carcinomes solides ne se révèle positif (tableau 26).

III.B.4.e L'oncogène *c-kit*

Différentes études ont montré que le proto-oncogène *c-kit*, exprimé dans les mastocytes normaux du Chien, joue un rôle important dans la formation et la fonction de ces cellules [228, 291, 353]. Des mutations de ce gène sont mises en évidence dans certains mastocytomes canins. Elles sont représentées, non pas par des mutations ponctuelles, mais par des duplications en tandem impliquant les exons 11 et 12 [228], ou par des délétions [231]. Ces données suggèrent que les mutations de ce gène pourraient contribuer au développement ou à la progression des mastocytomes canins [353].

Tableau 24. Expression de l'oncogène *c-erbB-2* dans 28 tumeurs mammaires canines, d'après AHERN *et al.* [2].

Tumeurs mammaires	Nombre	Sur-expression de <i>c-erbB-2</i>
Bénignes	5	pas de sur-expression
Malignes	23	sur-expression dans 17 tumeurs

Tableau 25. Expression de la protéine p^{185erbB-2} dans 28 tumeurs mammaires canines, d'après SCHAFER *et al.* [386].

Types histologiques	Nombre de tumeurs	Tumeurs exprimant p ^{185erbB-2}
Carcinome solide	16	7 (43%)
Adénocarcinome	12	4 (33%)
TOTAL	28	11 (39%)

Tableau 26. Expression de la protéine p^{185erbB-2}, dans 79 tumeurs mammaires canines, d'après RUNGSIPIPAT *et al.* [365].

Types de tumeurs mammaires	Nombre de tumeurs étudiées	Nombre de tumeurs présentant une expression de p ^{185erbB-2}	%
Tumeurs bénignes			
Adénome simple	7	7	
Adénome complexe	14	7	
Tumeur bénigne mixte	9	2	
Adénome avec inflammation	2	0	
Tumeurs malignes			
Adénocarcinome simple	26	6	
Adénocarcinome complexe	7	2	
Carcinome solide	5	0	
Carcinome sclérosant	2	1	
Tumeur maligne mixte	6	0	
Myoépithélioma malin	1	0	
TOTAL	79	25	32

Une seule étude concernant le gène *c-kit* dans les tumeurs mammaires du Chien a été publiée [200]. Dans cette étude, l'ARN total est extrait des échantillons tumoraux et d'un prélèvement de rate non pathologique. Les fragments d'ADNc sont amplifiés par RT-PCR à l'aide d'amorces synthétisées en utilisant les séquences de nucléotides conservées entre les espèces de mammifères (souris, rats, chats, humains). La séquence amplifiée est présumée contenir le domaine juxtamembranaire de la protéine (acides aminés 300-554). Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, colorés au bromure d'éthidium puis analysés (tableau 27 et figure 24).

La taille de la bande des produits d'amplification provenant de l'échantillon de rate est approximativement de 800bp, correspondant à celle attendue d'après les séquences décrites de l'ADN complémentaire *c-kit* des mammifères [200]. La séquence de nucléotides est déterminée après clonage du fragment amplifié. Il existe une étroite homologie entre les séquences des gènes *c-kit* canin et félin (90,4%), humain (87,2%) ou de la Souris (80,3%) et du Rat (79,6%). La séquence codant la portion juxtamembranaire du récepteur KIT est d'ailleurs conservée à 100% chez le Chien, la Souris et l'Homme [228].

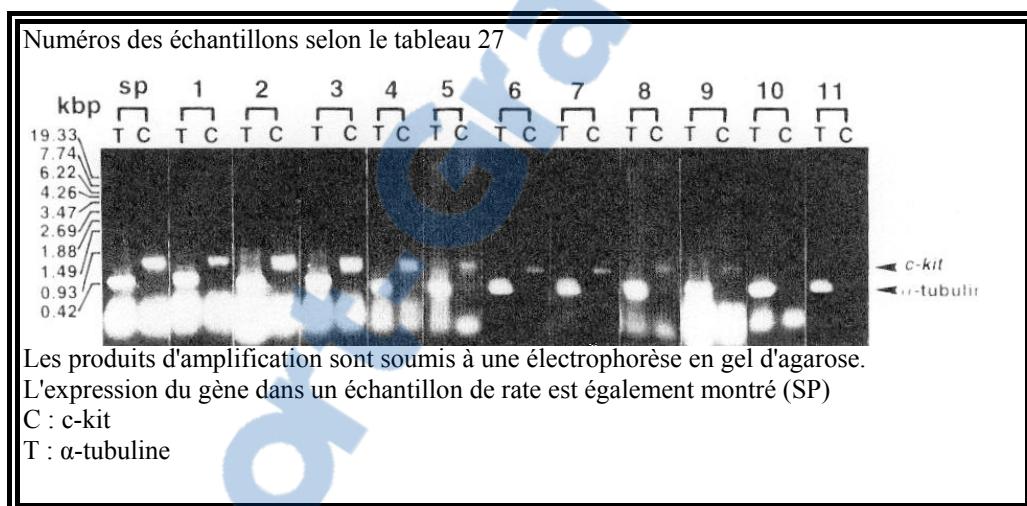
Dans les échantillons de tissus mammaires issus de chiennes cliniquement saines, seuls des faibles niveaux de produits d'amplification sont détectés [200]. A l'inverse, le fragment d'ADNc est amplifié dans tous les échantillons de tumeurs mammaires de chienne étudiés, incluant 1 tumeur bénigne mixte, 2 adénocarcinomes et 8 tumeurs malignes mixtes. L'expression du gène est plus faible dans les échantillons de tumeurs malignes mixtes, alors qu'elle est élevée dans les deux échantillons d'adénocarcinomes mammaires et de la tumeur bénigne mixte, à un niveau aussi élevé que celui du tissu splénique normal.

Dans cette étude, l'expression de *c-kit* a également été étudiée dans d'autres tumeurs canines. Une expression importante, aussi élevée que celle obtenue dans le tissu splénique est observée dans les 3 mastocytomes alors que les autres tumeurs ne montrent qu'un niveau faible d'expression (lymphome malin, liposarcome par exemple) ou nul (hémangiosarcome, et mélanome malin entre autres). Dans ces tumeurs, l'accroissement de la malignité est accompagnée d'une expression diminuée du récepteur [200].

Tableau 27. Amplification du gène *c-kit* dans 11 tumeurs mammaires canines, d'après KUBO *et al.* [200].

Types histologiques	Nombre de tumeurs mammaires canines	Amplification de <i>c-kit</i>
Tumeur bénigne mixte (n°1)	1	+
Adénocarcinome (n°2 et 3)	2	+
Tumeur maligne mixte (n°4 à 11)	8	+

Figure 24. Expression de *c-kit* dans 11 tumeurs mammaires canines, d'après KUBO *et al.* [200].



III.B.4.f L'oncogène c-yes

En 1991, l'équipe de MIYOSHI *et al.* [281] a étudié la structure d'un gène canin apparenté à l'oncogène humain c-yes. Le transfert de Southern, appliqué à des échantillons prélevés sur des chiens cliniquement sains, a permis de mettre en évidence une certaine homologie avec l'oncogène humain, avec cependant des variations inter-espèces appréciables par le nombre et la taille des bandes correspondant aux fragments d'ADN reconnus par la sonde.

La même méthode a été appliquée pour l'analyse (après digestion par plusieurs enzymes de restriction, électrophorèse sur gel d'agarose, transfert sur une membrane de nitrocellulose et hybridation avec une sonde dérivée d'un clone d'ADNc du gène c-yes humain) de l'ADN génomique de 6 tumeurs mammaires de chienne [282]. La comparaison des profils de coupure par les enzymes de restriction utilisées, a mis en évidence une bande particulière pour une seule tumeur (un carcinome solide) sur les 6 analysées. Un oncogène canin semblable à l'oncogène humain c-yes, mais avec une structure anormale, fut ainsi mis en évidence dans l'ADN génomique de toutes les cellules somatiques normales et tumorales de ce chien atteint d'un carcinome solide. Cependant, le gène canin n'ayant pas encore été isolé, il n'a pas été possible de déterminer les séquences altérées, ni la nature (mutation ponctuelle ou délétion) de l'anomalie observée.

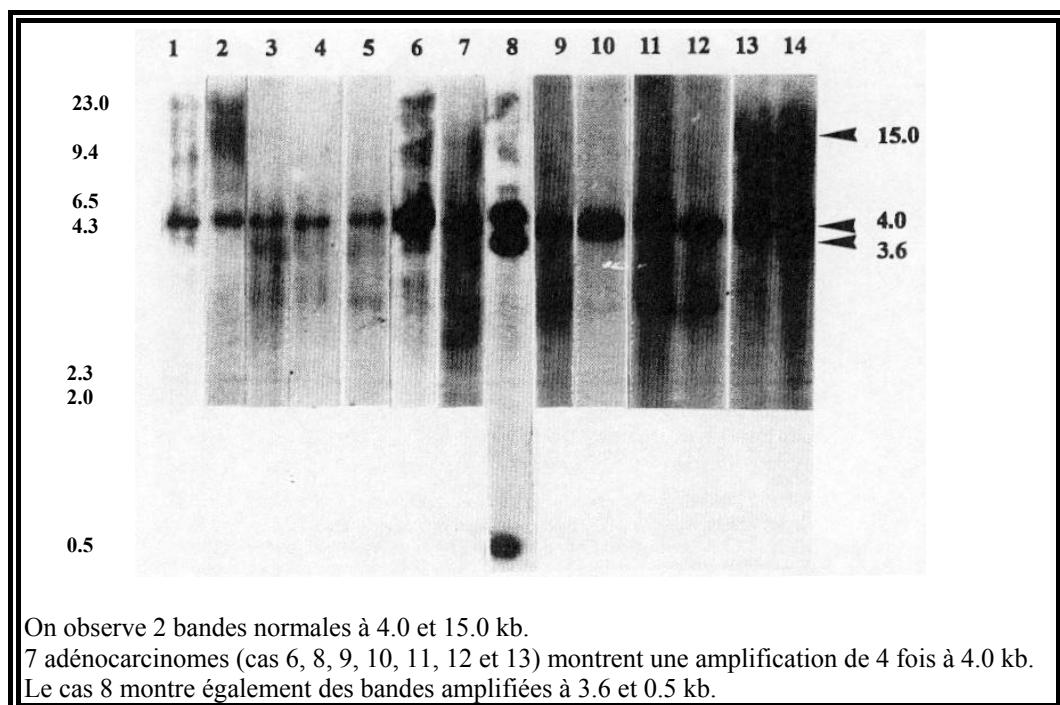
Trois ans plus tard, la même équipe [491] met à nouveau en évidence, une modification de la structure du gène c-yes dans trois échantillons tissulaires issus de chiens cliniquement sains sur les 21 analysés, ces derniers contenant tous le proto-oncogène c-yes.

L'analyse de la séquence du gène canin est réalisée en 1995 [492]. La séquence de 1742 nucléotides contient un cadre ouvert de lecture de 1617 nucléotides codant pour un peptide de 539 acides aminés et montre 92% d'homologie avec la séquence du gène humain y58000,445sgpoidsD 8>>BDC BT/TT0 1Tf90006 Tc 0 1394 Tw 12 0 0 312 237 6618 201,25836 Tm(pepti)Tj159pepti2la
c-yes-1. La protéine montre 95,9% d'homologie avec la protéine humaine p61.

Tableau 28. Expression du produit de l'oncogène *c-yes* par analyse immunohistochimique dans 79 tumeurs mammaires de chiennes, d'après RUNGSIPAT *et al.* [366, 367].

Types de tumeurs mammaires	Nombre de tumeurs étudiées	Nombre de tumeurs présentant une expression du produit de <i>c-yes</i>
Tumeurs bénignes	32	13
Adénome simple	7	6
Adénome complexe	14	6
Tumeur bénigne mixte	9	1
Adénome avec inflammation	2	0
Tumeurs malignes	47	10
Adénocarcinome simple	26	4
Adénocarcinome complexe	7	3
Carcinome solide	5	0
Carcinome sclérosant	2	1
Tumeur maligne mixte	6	2
Myoépithéliome malin	1	0

Figure 25. Analyse Southern blot des ADN génomiques issus de 14 tumeurs mammaires, digérés avec l'enzyme de restriction *BamHI*, d'après RUNGSIPAT *et al.* [366].



A droite, taille des bandes

A gauche taille des fragments λ-ADN digérés par HindIII

En haut, numéros des échantillons selon le tableau 30

Le produit du gène canin *c-yes* est détecté par analyse immunohistochimique dans des tissus normaux de chiens comme le myocarde, les cellules épithéliales des tubules rénaux proximaux et distaux, les hépatocytes, les cellules pariétales de l'estomac et les cellules de l'épithélium des glandes salivaires, alors qu'il ne semble pas présent dans la glande mammaire normale [366].

La surexpression de cette protéine s'avère être fréquente dans différentes tumeurs du chien [366]. Le degré de surexpression varie considérablement selon le type de tumeur. Ainsi, 32% (soit 59/185) des diverses tumeurs canines spontanées étudiées montrent une immunoréactivité pour le produit du gène *c-yes*, à la fois dans le noyau et le cytoplasme. La surexpression est retrouvée dans 44% des tumeurs cutanées, 35% des tumeurs des tissus mous et dans 29% des tumeurs mammaires. Par contre, à la différence de l'espèce humaine, aucune réaction positive n'est détectée dans les tissus hématopoïétiques (moelle osseuse, rate ou nœuds lymphatiques).

Dans cette étude, 41% (13/32) des tumeurs mammaires bénignes et 21% des tumeurs malignes (10/47) montrent une surexpression (dans le cytoplasme) du produit du gène *c-yes* (tableau 28) [366, 367]. De plus, deux adénocarcinomes mammaires présentant des métastases pulmonaires et cérébrales expriment cette protéine dans leur cytoplasme.

L'amplification génique du proto-oncogène canin (Southern blot) est mis en évidence chez un chien atteint de leucémie lymphoïde [273].

Les études concernant l'amplification de l'oncogène *c-yes* dans les tumeurs mammaires du chien montrent que cette amplification est présente à un niveau relativement faible, dans 7 des 8 adénocarcinomes mammaires étudiés par RUNGSIPAT et *al.* [366] alors que les tumeurs mammaires bénignes ne montrent pas d'amplification du gène (figure 25 et tableaux 29 et 30). Par contre, l'expression du produit du gène n'est mise en évidence que dans seulement 2 de ces 7 tumeurs, alors que dans un adénome complexe et 2 tumeurs bénignes mixtes, on note une surexpression du produit sans amplification du gène.

Tableau 29. Poids moléculaires (kb) des bandes obtenues à partir de tumeurs mammaires en utilisant 4 enzymes de restriction, d'après RUNGSIPIPAT *et al.* [366].

Enzyme	Bandes normale (kb)	6	8	9	10	11	12	13
<i>Eco</i> RI	8.0							
	3.2			3.2* amp 4			3.2* amp 4	
	3.0							
<i>Hind</i> III	8.7			8.7				6.2
	5.0	5.0* amp 4	5.0* amp 2 amp 4	6.2* 3.7*		3.7* amp 8		5.0* 3.7*
	3.7							
<i>Bam</i> HI	15.0							
	4.0	4.0* amp 4	4.0* 3.6* amp 4	4.0* amp 4	4.0* amp 4	5.0* 4.0* amp 4	4.0* amp 4	4.0* amp 4
<i>Pst</i> I	4.2							
	3.8	3.8* amp 2					3.8* amp 2	
	2.2							

* : bandes amplifiées

amp : nombre de copies de l'oncogène c-yes amplifiées

Les numéros des échantillons correspondent au tableau 30.

Tableau 30. Amplification du gène c-yes observée dans 14 tumeurs mammaires canines chiennes, d'après RUNGSIPIPAT *et al.* [366].

Types de tumeurs mammaires	Cas n°	Amplification	Analyse immunohistochimique
Tumeur bénigne mixte	1	-	-
Tumeur bénigne mixte	2	-	-
Tumeur bénigne mixte	3	-	+
Tumeur bénigne mixte	4	-	+
Adénome complexe	5	-	+
Adénocarcinome	6	+	+
Adénocarcinome	7	-	-
Adénocarcinome	8	+	-
Adénocarcinome	9	+	+
Adénocarcinome	10	+	-
Adénocarcinome	11	+	-
Adénocarcinome	12	+	-
Adénocarcinome	13	+	-
Tumeur maligne mixte	14	-	-

III.B.4.g L'oncogène *c-myc*

L'oncogène canin *c-myc* présente une forte homologie avec le gène humain [282]. Chez le Chien, l'amplification de *c-myc* est visible de façon significative dans les ostéosarcomes [195] et les rhabdomyosarcomes [109] ainsi que dans 3 lignées cellulaires issues de mélanomes [1].

Dans une étude datant de 1987, une analyse par Northern blot de 12 tumeurs mammaires, à l'aide d'une sonde constituée de l'exon 3 du gène *c-myc* humain, n'a révélé une expression de l'oncogène que dans une seule tumeur (un carcinome mammaire peu différencié) [110]. Afin d'examiner le niveau d'ARN plus en détail, la tumeur a été soumise à une analyse des longueurs des fragments de restriction. L'ADN de cette tumeur est digéré par deux enzymes de restriction (EcoRI et HindII), puis les fragments de restriction sont hybridés avec la sonde marquée d'ADNc. La comparaison des résultats avec ceux obtenus à partir de tissu mammaire normal ne permet pas de voir de différences entre les 2 prélèvements, ce qui permet de conclure que dans cette tumeur, l'expression du gène est élevée, mais apparemment sans amplification ou réarrangement génétique.

Dans une étude portant sur 22 tumeurs mammaires, l'expression de la protéine Myc est étudiée par immunohistochimie (tableau 31) [175]. Le marquage est intense dans 4 adénocarcinomes mammaires sur les 5 analysés, le cinquième montrant une réactivité modérée. Dans le groupe des tumeurs bénignes mixtes, la composante épithéliale montre une réactivité intense à modérée et la composante myoépithéliale faible ou modérée. Les ostéosarcomes, myoépithéliomes et myoépithéliomes malins montrent une réactivité intense. Les cellules mammaires normales, ainsi que les cellules du stroma ne présentent pas de marquage.

III.B.4.h Les oncogènes *ras*

La région 5' du gène canin N-*ras*, correspondant aux codons 1 à 71, a été clonée et séquencée en 1992 par SAUNDERS *et al.* [382]. Il existe une différence de six nucléotides entre les gènes canin, murin et humain mais ces modifications n'aboutissent pas à des

Tableau 31. Immunomarquage de la protéine Myc dans 22 tumeurs mammaires canines, d'après INOUE et al. [175].

Types histologiques	Numéros	Marquage de Myc
Ostéosarcomes	1	++
	2	++
	3	++
	4	++
	5	++
Adénocarcinomes	6	++
	7	++
	8	++
	9	+
	10	++
Myoépithéliomes malins	11	++
	12	++
	13	++
Tumeurs bénignes mixtes	14	++ * +§
	15	++ * +§
	16	++ * +§
	17	+* +§
	18	+ * +§
	19	+* +/-§
Myoépithéliomes	20	++
	21	++
	22	++

* composant épithelial

§ composant myoépithelial

+- marquage nucléaire faible (1 à 10% des cellules)

+ marquage nucléaire modéré (10 à 50% des cellules)

++ marquage nucléaire intense (50 à 100% des cellules)

Tableau 32. Expression de la cycline A et D1 dans 73 tumeurs et 2 dysplasies mammaires canines, d'après MURAKAMI et al. [300].

Types histologiques	Cas positifs (par rapport au nombre total)	
	Cycline A	Cycline D1
Dysplasies mammaires	0/2	0/2
Tumeurs mammaires bénignes :	0/35	0/35
Adénomes	0	0
Tumeurs bénignes mixtes	0	0
Tumeurs mammaires malignes :	19/38	2/38
Adénocarcinomes	17	2
Tumeurs malignes mixtes	1	0
Myoépithéliome malin	1	0

L'immunoréactivité des cyclines A et D1 est évaluée selon un système basé sur le pourcentage de noyaux positifs, les tumeurs ayant une note 2 ou 3 sont considérées comme positives :

-note 0 : aucun noyau marqué

-note 2 : tumeurs ayant 10 à 50% des noyaux marqués

-note 1 : <10% de noyaux marqués

-note 3 : >50% des noyaux marqués

changements d'acides aminés. Il en est de même pour la séquence des gènes H- et K-*ras* [281] avec une différence de quatre nucléotides entre les gènes K-*ras* humain et canin [198].

L'analyse récente de WATZINGER *et al.* [472] de différentes tumeurs canines (PCR-SSCP et séquençage) ne permet pas de mettre en évidence de mutations des trois gènes *ras* dans les régions "hot spots" définies chez l'Homme (codons 12, 13 et 61), à l'exception d'un mélanome. La même technique appliquée à 20 tumeurs mammaires ne permet pas non plus d'observer de mutations dans ces régions [65]. Ce résultat est d'ailleurs confirmé par une autre étude, dans laquelle aucune mutation n'est observée après extraction de l'ADN de 10 adénocarcinomes mammaires de chiennes, puis amplification avec des amorces correspondant aux exons 1 et 2 des gènes K, N et H-*ras* humains et enfin séquençage [257].

Des résultats similaires sont retrouvés dans des études portant sur d'autres types de tumeurs : hémangiopéricytomes, mastocytomes, histiocytomes [258]. A l'opposé, il semblerait que les mutations ponctuelles de ces gènes puissent être associées chez le Chien, au cancer du poumon "non à petites cellules" (mutations du gène K-*ras* au niveau du codon 12 [198] et 61 [139]) ou au lymphome (mutations du gène N-*ras* au niveau du codon 13 [104]).

III.B.4.i L'oncogène MDM2

Dans une étude récente, l'équipe de SETOGUCHI [402] met en évidence l'expression de la protéine MDM2 (avec la technique immunohistochimique) dans 7 des 9 tumeurs canines spontanées étudiées : 5 sarcomes (3 ostéosarcomes, 1 chondrosarcome, 1 myxosarcome) et 2 tumeurs mammaires (1 tumeur bénigne mixte et 1 adénocarcinome). L'adénome mammaire étudié n'exprime pas la protéine. De 0 à 10% des cellules des tissus normaux (reins, rate, nœuds lymphatiques, foie, poumons, intestin grêle) montrent une expression de MDM2 mais celle-ci reste faible. L'expression de la protéine MDM2 est forte dans l'adénocarcinome mammaire ; elle est mise en évidence dans plus de la moitié des cellules examinées. Elle est modérée dans la tumeur bénigne mixte puisque seules 10 à 25% des cellules observées expriment MDM2.

III.B.4.j Les gènes des cyclines A et D1

Dans l'espèce canine, l'expression des cyclines A et D1 a été étudiée dans les tumeurs cutanées [300], les tumeurs des testicules [302] et les tumeurs mammaires [300, 301].

Tableau 33. Amplification du gène de la cycline A et expression de la cycline A (analyse immunohistochimique) dans 33 tumeurs mammaires canines, d'après MURAKAMI *et al.* [301].

	Types histologiques	Amplification	Surexpression
1	Adénome	-	-
2	Adénome	-	-
3	Adénome	-	ND
4	Adénome	-	-
5	Adénome	-	-
6	Tumeur bénigne mixte	+	-
7	Tumeur bénigne mixte	+	-
8	Tumeur bénigne mixte	+	ND
9	Tumeur bénigne mixte	-	ND
10	Tumeur bénigne mixte	+	-
11	Tumeur bénigne mixte	-	-
12	Tumeur bénigne mixte	-	-
13	Tumeur bénigne mixte	-	ND
14	Tumeur bénigne mixte	-	-
15	Adénocarcinome	-	-
16	Adénocarcinome	-	+
17	Adénocarcinome	-	+
18	Adénocarcinome	-	-
19	Adénocarcinome	+	-
20	Adénocarcinome	-	ND
21	Adénocarcinome	-	-
22	Adénocarcinome	-	+
23	Adénocarcinome	+	+
24	Adénocarcinome	-	ND
25	Adénocarcinome	-	ND
26	Adénocarcinome	-	-
27	Adénocarcinome	-	+
28	Adénocarcinome	-	-
29	Adénocarcinome	-	-
30	Adénocarcinome	+	+
31	Tumeur maligne mixte	-	-
32	Tumeur maligne mixte	+	-
33	Tumeur maligne mixte	+	+

ND : résultat non disponible

Dans une étude, on remarque que la moitié des tumeurs mammaires malignes étudiées (soit 19 sur 38) présentent un immunomarquage de la cycline A (tableau 32) [300]. À l'opposé, les 2 dysplasies et les 35 tumeurs bénignes n'expriment pas la cycline A. De même, le marquage de la cycline D1 n'est visible que dans 2 adénocarcinomes mammaires sur les 75 tumeurs mammaires analysées. De plus, ce marquage est faible et "éparpillé".

La même équipe s'est intéressée à l'amplification du gène de la cycline A et à l'expression de la protéine (immunohistochimie) dans 33 tumeurs mammaires de l'étude précédente. Après extraction de l'ADN, digestion par 4 enzymes de restriction et électrophorèse, les fragments d'amplification ont été hybridés avec une sonde marquée correspondant au gène humain. Il a été possible de remarquer une amplification du gène dans 9 tumeurs (27%) : 4 tumeurs bénignes mixtes, 3 adénocarcinomes et 2 tumeurs malignes mixtes (tableau 33). Pourtant, cette amplification n'est pas corrélée à la surexpression de la cycline A. Ainsi, certaines tumeurs, comme par exemple 3 tumeurs bénignes mixtes, ont montré une amplification, sans surexpression du produit du gène. De plus, il n'a pas été mis en évidence de différences significatives entre l'amplification du gène dans les tumeurs malignes et les tumeurs bénignes. Aucune des 33 tumeurs analysées ne montre une amplification du gène de la cycline D1.

III.B.4.k Le gène S100A4

Le séquençage de deux segments amplifiés du gène S100A4, correspondant aux codons humains 1 à 47 et 48 à 101, a révélé d'importantes similitudes dans la séquence des nucléotides, et également des acides aminés correspondants, entre les gènes S100A4 (*mts1*) canin et humain [260].

L'analyse de la séquence du gène dans 90 tumeurs canines, dont 36 tumeurs mammaires, a permis de conclure à l'absence de mutations associées à ces tumeurs.

III.B.5 Par l'étude de la télomérase

Dans l'espèce canine, la méthode TRAP (*telomere repeat amplification protocol*) a été utilisée pour détecter l'activité de la télomérase dans les échantillons de tissus normaux et tumoraux. Cette technique, développée en 1994 par KIM *et al.* [189] comporte deux étapes.

Tableau 34. Activité de la télomérase dans des tissus normaux de chiens, d'après YAZAWA et al. [487, 488].

	Télomérase positifs	Télomérase négatifs
4 échantillons de tissus mammaires normaux	0	4
12 échantillons de tissus mammaires normaux	4	8
5 échantillons de peau normale	0	5
4 échantillons de testicules normaux	4	0

Tableau 35. Activité de la télomérase dans des tumeurs malignes et bénignes de différentes origines et dans des tissus normaux, d'après BILLER et al. [32].

	Télomérase positifs	Télomérase négatifs
26 tumeurs malignes	24	2
4 tumeurs bénignes	1	3
3 tissus normaux	0	3

Tableau 36. Activité de la télomérase dans 21 tumeurs mammaires canines et dans 4 tissus mammaires normaux, d'après YAZAWA et al. [487].

	Télomérase positifs	Télomérase négatifs
4 adénocarcinomes	4	0
3 tumeurs malignes mixtes	2	1
5 adénomes	5	0
9 tumeurs bénignes mixtes	9	0
4 tissus mammaires normaux	0	4

Tableau 37. Activité de la télomérase dans des tissus mammaires normaux, hyperplasiques et tumoraux, d'après FUNAKOSHI et al. [124].

	Télomérase positifs	Télomérase négatifs
5 adénocarcinomes	5	0
2 tumeurs malignes mixtes	0	2
7 adénomes	7	0
15 tumeurs bénignes mixtes	15	0
1 hyperplasie mammaire	0	1
3 tissus mammaires normaux	0	3

Les cellules obtenues chez un patient sont en premier lieu lysées et incubées avec une amorce oligonucléotidique qui sert de substrat à la télomérase. Si une activité télomérase est présente, on assistera à l'addition de motifs TTAGGG répétés sur l'amorce. La seconde partie du dosage consiste à amplifier le produit obtenu par PCR.

Les produits de la PCR sont détectés par électrophorèse sur gel d'agarose. Comme l'enzyme est capable d'ajouter des séquences répétées consécutives, les produits de la réaction sont d'une taille croissante ce qui crée une échelle de bandes. L'activité télomérase est examinée avant et après l'inactivation par la chaleur car la télomérase est une enzyme sensible à la chaleur, donc détectée uniquement sur les échantillons non traités par la chaleur. Cette procédure est hautement sensible et requiert un nombre faible de cellules (échantillons tissulaires prélevés par aspiration ou par excision-biopsie) mais il est nécessaire que les cellules soient fraîches ou qu'elles aient été congelées immédiatement.

L'activité de la télomérase peut être quantifiée (TPG pour *Total Product Generated* [487] ou RTA pour *Relative Telomerase Activity* [124], en U/2 μ g de protéines) en comparant les intensités densitométriques du signal.

Les études menées par NASIR *et al.* [310], BILLER *et al.* [32] et par YAZAWA *et al.* [487, 488] ont uniformément démontré qu'une réactivation de la télomérase a lieu dans les cellules cancéreuses du Chien. A l'opposé, une activité télomérase est rarement détectée dans les tissus canins normaux alors qu'elle est mise en évidence dans les cellules germinales (tableau 34). De même, dans la plupart des échantillons de tissus mammaires normaux, aucune activité de la télomérase n'est mise en évidence, ni dans l'unique prélèvement d'hyperplasie mammaire étudié (tableaux 34, 35, 36 et 37) [32, 124, 487]. Pourtant, l'étude de YAZAWA *et al.* [487] met en évidence une activité télomérase dans 4 échantillons de tissus mammaires normaux sur les 12 étudiés.

Curieusement, dans les tumeurs mammaires canines étudiées, il semblerait que la télomérase ne soit pas spécifique des cellules malignes, puisqu'elle est active dans presque tous les échantillons de tumeurs bénignes (tableaux 36 à 38) [32, 124, 487, 488]. Par contre, 3 tumeurs malignes mixtes en semblent dépourvues (tableaux 36 et 37) [124, 487].

Une analyse quantitative paraît indispensable afin d'interpréter les résultats précédents car certains résultats positifs pourraient finalement être associés à une activité faible de la télomérase. Les analyses quantitatives de l'activité de la télomérase effectuées en 1999 et en

**Tableau 38. Activité de la télomérase dans 28 tumeurs mammaires canines,
d'après YAZAWA *et al.* [487, 488].**

Types histologiques	Activité de la télomérase (U/2µg protéine)	Age des chiens (années)	Longueur des télomères (kbp)	Auteurs
Tumeur mammaire bénigne mixte	225	8	13,4	[487] [488]
Tumeur mammaire bénigne mixte	37	14	11,3	[487] [488]
Tumeur mammaire bénigne mixte	66			[487] [488]
Tumeur mammaire bénigne mixte	28	12	15,2	[487] [488]
Tumeur mammaire bénigne mixte	91	11	14,1	[487] [488]
Tumeur mammaire bénigne mixte	72	12	12,7	[487] [488]
Tumeur mammaire bénigne mixte	28	7	17,6	[487] [488]
Tumeur mammaire bénigne mixte	196	8	17,7	[487] [488]
Tumeur mammaire bénigne mixte	61	9	14,7	[487] [488]
Adénome mammaire	145	9	12,9	[487] [488]
Adénome mammaire §	57	12	12,4	[487] [488]
Adénome mammaire	3			[487] [488]
Adénome mammaire	6	11	15,6	[487] [488]
Adénome mammaire	238	11	13,6	[487] [488]
Adénome mammaire *	546	3	15,6	[488]
Adénome mammaire	430	11	12,4	[488]
Adénome mammaire	461	8	11,4	[488]
Tumeur mammaire maligne mixte	38	7	16,8	[487] [488]
Tumeur mammaire maligne mixte	<1	14	14,8	[487] [488]
Tumeur mammaire maligne mixte	146	9	20,0	[487] [488]
Tumeur mammaire maligne mixte	95	12	10,9	[488]
Tumeur mammaire maligne mixte	45	9	13,1	[488]
Tumeur mammaire maligne mixte	250	7	12,7	[488]
Adénocarcinome mammaire	390	13	11,3	[487] [488]
Adénocarcinome mammaire	148	12	21,6	[487] [488]
Adénocarcinome mammaire §	9	12	15,5	[487] [488]
Adénocarcinome mammaire §	38	14	16,1	[487] [488]
Adénocarcinome mammaire §	204	10	14,2	[488]
Myoépithéliome	481	14	12,7	[488]
Tissu mammaire normal	6	1	16,8	[488]
Tissu mammaire normal	30	1	19,8	[488]
Tissu mammaire normal	-	2	19,8	[488]
Tissu mammaire normal	-	2	19,9	[488]
Tissu mammaire normal	-	3	20,6	[488]
Tissu mammaire normal	-	3	19,2	[488]
Tissu mammaire normal	-	4	19,3	[488]
Tissu mammaire normal	-	4	16,9	[488]
Tissu mammaire normal	556	5	16,4	[488]
Tissu mammaire normal	-	6	15,5	[488]
Tissu mammaire normal	-	7	15,4	[488]
Tissu mammaire normal	2	7	16,9	[488]

* adénome provenant d'un mâle

§ tumeurs provenant de chiennes stérilisées

(-) : activité de la télomérase non détectée (<1 U/2µg de protéine)

kbp : kilobase paires

2001 par YAZAWA *et al.* [487] ont révélé des différences d'activité dans les différents échantillons (tableau 38) :

- L'activité de la télomérase varie de 3 à 546U/2 μ g dans les 27 tumeurs mammaires, et de 2 à 556U/2 μ g dans les 4 tissus mammaires normaux.
- Les adénomes mammaires montrent parfois une activité importante (546U/2 μ g).
- Certains adénocarcinomes mammaires n'ont qu'une faible activité (par exemple 9U/2 μ g).

Il est intéressant de noter que les variations d'activité dans les différents types histologiques ne sont pas significatives, même si la moyenne de l'activité télomérase dans les adénocarcinomes est plus élevée que celle des adénomes et des tumeurs bénignes mixtes. De plus, certaines tumeurs mammaires bénignes peuvent montrer une activité télomérase importante [487]. Ainsi, sur les 14 tumeurs bénignes du tableau 36, seuls 2 adénomes présentent une activité inférieure à 10U/2 μ g.

On remarque également que parmi les 4 échantillons de tissus mammaires normaux du tableau 38 montrant une activité télomérase, 3 ont une activité faible (de 2 à 30U/2 μ g) alors que l'activité télomérase est très importante dans un échantillon (556U/2 μ g). Selon Yazawa *et al.*, ce dernier cas prélevé sur une chienne en gestation s'expliquerait par une augmentation de l'activité de la télomérase entraînée par la prolifération du tissu épithéial durant la gestation [488]. La faible activité de la télomérase détectée dans les 3 échantillons normaux pourrait résulter d'une activité présente dans des cellules mononucléées à l'intérieur de ces spécimens [488].

L'étude quantitative de l'activité de la télomérase réalisée en 2000 par FUNAKOSHI *et al.* [124] permet de comparer les moyennes de l'activité relative de la télomérase selon les différents groupes histologiques (tableau 39). Les valeurs obtenues sont plus faibles que celles obtenues par l'équipe de YAZAWA *et al.* [487]. Dans cette étude, la valeur moyenne de l'activité de la télomérase dans les adénocarcinomes mammaires est significativement plus élevée que celle obtenue dans les adénomes et tumeurs bénignes mixtes.

Récemment, une étude s'est intéressée à la longueur des télomères dans les tumeurs mammaires [488]. La longueur des télomères a été mesurée en appliquant la méthode décrite par HARLEY *et al.* [155] (isolement de l'ADN, digestion par des enzymes spécifiques et hybridation par la technique du Southern Blot à partir d'une sonde télomérique) à 39 échantillons congelés (27 tumeurs mammaires et 12 tissus mammaires normaux provenant de chiennes cliniquement saines de différents âges).

Tableau 39. Activités télomérase relatives moyennes dans 27 tumeurs mammaires canines, d'après FUNAKOSHI *et al.* [124].

Types histologiques	Nombre d'échantillons	Activités télomérase relatives (RTA)
Adénome mammaire	7	27,8
Tumeur bénigne mixte	15	33,9
Adénocarcinome mammaire	5	56,5 (§)

(§) : significatif par rapport aux adénomes et tumeurs bénignes mixtes ($P<0,05$)

La longueur moyenne des télomères dans les 27 tumeurs mammaires étudiées est de 14,6 kbp (variation de 11,0 à 21,6 kbp) (tableau 38) alors qu'elle est de 18 kbp (de 15,4 à 20,6 kbp) dans les 12 échantillons de mamelle normale (ne provenant pas des mêmes chiennes). La longueur moyenne des télomères est ainsi moindre dans les tissus tumoraux mais il faut tenir compte de l'âge moyen qui est significativement différent ($P<0.001$) dans les deux groupes de chiennes : 10,3 +/- 0,5 pour les chiennes atteintes de tumeurs mammaires et seulement 3,8 +/- 0,62 pour les chiennes cliniquement saines.

Dans les échantillons de glande mammaire normale, l'âge est négativement corrélé avec la longueur des télomères : une augmentation d'une année correspond à une diminution de 0,6 kbp. A l'opposé, l'âge des chiennes atteintes de tumeurs mammaires n'est pas significativement corrélé avec la longueur des télomères des cellules tumorales, ce qui confirme que la longueur des télomères est maintenue dans les tumeurs mammaires [488]. De plus, il n'y a pas de corrélation entre la longueur des télomères et le type histologique des tumeurs mammaires, même si les longueurs moyennes sont légèrement plus élevées dans les tumeurs malignes et les adénocarcinomes mammaires.

III.C Bilan et analyse des résultats exposés

La synthèse des différents résultats obtenus permet d'établir un bilan des anomalies génétiques observées dans les tumeurs mammaires de la chienne (tableau 40) et de les comparer avec les résultats obtenus dans l'espèce humaine.

➤ L'analyse du caryotype des cellules des tumeurs mammaires de la chienne permet de mettre en évidence des anomalies chromosomiques de structure généralement complexes et hétérogènes. Les fusions de chromosomes et les modifications du nombre et de la structure du chromosome X représentent les événements les plus fréquents, comme c'est le cas pour d'autres tumeurs canines solides [357] :

- Les fusions centriques impliquent préférentiellement les chromosomes 1, 19 et 25 dans les diverses tumeurs canines étudiées, alors que dans les tumeurs mammaires de chiennes, ce sont les chromosomes 38 et 36 qui sont concernés par les fusions centriques et le chromosome 32 par les délétions.
- La présence de monosomie X ou de chromosome X anormal n'est pas rare dans les tumeurs mammaires étudiées.

Tableau 40. Bilan des anomalies génétiques observées dans les tumeurs mammaires de la chienne.

Anomalies génétiques	Tumeurs bénignes	Tumeurs malignes
Trisomie 1		6
Fusion centrique (36;38)		3
Fusion centrique (37;38)		1
Fusion centrique (3;38)		1
Délétion du chromosome 32	1	2
Chromosome X anormal	1	3
Monosomie X		3
Aneuploïdie	16%	47%
Mutations du gène <i>TP53</i>	7%	12%
Expression de la protéine TP53	12%	34%
Expression réduite et distribution anormale de la caderine-E		oui
Surexpression du gène <i>c-erbB-2</i>	1/6	76%
Expression de la protéine p ^{185erbB-2}	50%	27%
Amplification du gène <i>c-kit</i>	1/1	10/10
Amplification du gène <i>c-yes</i>	0	7/8
Surexpression du produit du gène	42%	21%
Surexpression du gène <i>c-myc</i>	0/5	1/12
Expression de la protéine Myc	6/6	16/16
Mutations du gène <i>ras</i>		0/30
Expression de la protéine MDM2	1/2	1/1
Expression de la cycline D1	0	0
Amplification du gène de la cycline D1	0	0
Expression de la cycline A	5%	50%
Amplification du gène de la cycline A	29%	14%

Dans l'espèce humaine, les aberrations chromosomiques sont remarquées à la fois dans les tumeurs malignes et dans les tumeurs bénignes. De plus, elles montrent une incidence plus élevée dans les tumeurs mésenchymateuses que dans les tumeurs épithéliales. Selon REIMAN [357], il semblerait que ce soit également le cas chez le Chien. Cependant, le faible nombre d'études concernant les tumeurs mammaires (et en particulier les tumeurs bénignes et les tumeurs mésenchymateuses) ne permet pas de se prononcer sur cette observation. Alors que les translocations réciproques représentent, à la différence des fusions centriques, une anomalie du caryotype fréquemment retrouvée dans les tumeurs humaines, c'est plutôt l'inverse qui est observé dans les tumeurs mammaires de la chienne et également dans les autres tumeurs canines. Cette observation peut s'expliquer par la morphologie différente des chromosomes humains et canins et par la plus forte stabilité des fusions de chromosomes acrocentriques.

Des anomalies de nombre (hypo et hyperploïdie) sont également fréquentes et un nombre assez élevé de trisomies affectant différents chromosomes est observé. Alors que dans la plupart des tumeurs du Chien les changements numériques affectent le plus souvent le chromosome 2, dans les tumeurs mammaires il semblerait que ce soit le chromosome 1 le plus souvent affecté de trisomie (observé dans 6 tumeurs). L'analyse cytométrique des tumeurs mammaires de la chienne révèle d'ailleurs qu'environ 47% des tumeurs mammaires malignes sont aneuploïdes. Il est intéressant de noter que l'hypoploïdie n'est pas un phénomène fréquent dans les carcinomes du sein [122], alors que l'on note une fréquence élevée d'hypoploïdie dans les tumeurs mammaires de la chienne. De même, chez la femme, les lésions mammaires non cancéreuses sont très rarement aneuploïdes, tandis que 16% des tumeurs mammaires bénignes sont aneuploïdes dans l'espèce canine.

Il est possible d'envisager les différentes étapes de la Cancérogenèse mammaire selon la ploïdie de l'ADN des cellules des différents types de tumeurs mammaires. En effet, les lésions hyperplasiques et bénignes, sont pratiquement toujours diploïdes. Pourtant, certaines d'entre elles sont parfois aneuploïdes. Comme l'aneuploïdie reflète l'instabilité génétique, à la base de la transformation maligne, l'aneuploïdie observée dans les dysplasies mammaires pourrait indiquer un état pré-néoplasique et dans ce cas, le potentiel malin de la tumeur ne peut être exclu [161, 373]. Ces observations permettraient de comprendre la transformation maligne à plus ou moins long terme de certaines tumeurs bénignes non opérées, comme par

exemple l'évolution d'un fibro-adénome en sarcome, ou d'une tumeur bénigne mixte en carcinome [274].

La plupart des carcinomes anaplasiques (habituellement hautement agressifs) sont hyperploïdes. Pourtant, certains sont diploïdes, ce qui pourrait impliquer des chemins pathogéniques différents [162]. L'index ADN du carcinome primaire est habituellement identique à celui des métastases lymphatiques, hépatiques ou pulmonaires [335]. A l'inverse, l'index ADN des sarcomes est différent de celui des métastases. Or on sait qu'il n'existe, dans ce cas, qu'une faible association entre les tumeurs primaires et leurs métastases [335].

Nous avons vu que l'hypoploïdie n'est pas un phénomène fréquent dans les carcinomes du sein [122] alors que l'on note une fréquence élevée d'hypoploïdie dans les tumeurs mammaires de la chienne [373]. De même, chez la femme, les lésions mammaires non cancéreuses sont très rarement aneuploïdes [19], ce qui suggère qu'il existe des différences inter-espèces concernant l'évolution de la ploïdie dans des tumeurs d'un même organe [373].

Le but ultime des travaux de cytogénétique est d'identifier d'éventuels gènes impliqués dans les processus néoplasiques. Alors que certaines de ces altérations peuvent être dues au hasard, reflétant l'instabilité génétique des tumeurs, d'autres peuvent être spécifiques, concernant des régions du génome impliquées dans les mécanismes de la cancérogenèse. Il est donc probable que les aberrations chromosomiques observées dans ces tumeurs mammaires aboutissent à des altérations des gènes qu'ils portent.

Jusqu'à maintenant, seuls quelques gènes, dont on sait qu'ils présentent des anomalies (mutations, surexpression, amplification) dans les tumeurs du sein chez la femme, ont été localisés chez le Chien. La cartographie par hybrides d'irradiation a ainsi permis de localiser les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sur les chromosomes 9 (CFA09) et 25 (CFA25) et le gène *RBI* sur le chromosome 22 (CFA22) [50, 346]. Le gène *TP53* a été localisé en 1996 sur le chromosome 5 par une technique de cytogénétique en FISH [144]. Cette position a ensuite été confirmée, par la cartographie d'hybrides d'irradiation en 2001 par THOMAS *et al.* [438]. L'oncogène c-erbB-2 a été localisé, en FISH, sur le chromosome 1 (position 1q13.1) en 2001 [303] mais cette position n'a pas encore été confirmée par la cartographie en hybride d'irradiation.

Il est intéressant de remarquer que l'analyse du caryotype des cellules de 4 tumeurs mammaires met en évidence une trisomie 1 [251, 254, 256, 257] et que dans 2 tumeurs mammaires différentes, il est possible de noter une trisomie 9 [256, 257]. Ces anomalies pourraient ainsi entraîner un gain de matériel génétique, c'est-à-dire une sur-représentation de segments chromosomiques. Par contre, les autres chromosomes altérés ne contiennent pas de gènes encore positionnés. Ces données pourraient laisser penser que d'autres gènes (en dehors de *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *c-erbB-2*) pourraient avoir contribué à la formation de ces tumeurs. Ainsi, il est possible que la délétion concernant le chromosome 32 (retrouvée sur 3 tumeurs) implique des gènes suppresseurs de tumeurs et que les translocations réciproques concernent des segments de chromosomes contenant des oncogènes ou des gènes codant pour des facteurs de croissance.

- Les cellules tumorales humaines contiennent fréquemment un nombre anormal de centrosomes. Une analyse immunohistochimique a permis de mettre en évidence une hyperamplification des centrosomes dans 10 à 50% des cellules des trois tumeurs mammaires canines étudiées (2 tumeurs bénignes et 1 adénocarcinome).
- Les techniques de biologie moléculaire (amplification par PCR, SSCP, séquençage, Southern et Northern blot) ont permis d'observer des anomalies de gènes déjà fortement incriminés pour leurs rôles dans la pathogénie des tumeurs chez l'Homme et en particulier des tumeurs du sein.
 - ◆ L'analyse des différentes études concernant les mutations du gène *TP53* dans les tumeurs mammaires de la chienne révèle que 11% des tumeurs mammaires analysées contiennent des mutations du gène TP53 : 12% des tumeurs mammaires malignes (21/176) et 7% des tumeurs mammaires bénignes (5/68).

Les mutations du gène *TP53* dans les tumeurs mammaires canines sont principalement représentées par des mutations ponctuelles conduisant à des substitutions d'acides aminés dans la région centrale de la protéine *TP53*, au niveau des domaines hautement conservés, c'est-à-dire des régions fonctionnellement importantes de la protéine. Une mutation ponctuelle (située sur les exons 2, 4, 5, 6, 7 et 8) est le plus souvent observée et environ deux tiers des mutations sont situés sur 5 codons (175, 180, 245, 249 et 271).

Les codons 175, 245 et 249 font partie des points chauds des mutations du gène *TP53* observées dans les tumeurs humaines [150] et également dans les tumeurs canines de diverses origines [197]. De plus, ces codons sont répartis sur 3 des 5 domaines hautement conservés au cours de l'évolution [306, 465].

On remarque que la proportion de tumeurs mammaires présentant des mutations du gène *TP53* est pratiquement deux fois plus faible dans l'espèce canine par rapport à l'espèce humaine. Par contre, on trouve dans les deux espèces une majorité de transitions G:C→A:T (dont la cause est en général endogène et spontanée) alors que les transversions G:C→T:A, (généralement associées chez l'Homme à une exposition à des agents carcinogènes [138]) sont moins fréquentes.

Il s'agit de véritables mutations acquises car pour la plupart, elles ne sont présentes que dans le tissu tumoral, et absentes du tissu sain d'un même patient [306]. De plus, l'analyse de la séquence du gène *TP53* canin de tissus sains montre qu'il n'existerait pas de polymorphisme.

Les résultats concernant la protéine TP53 sont très hétérogènes et de ce fait, difficiles à comparer. En effet, l'immunomarquage de TP53 dans les tumeurs bénignes n'est pas constant et les résultats obtenus dans les tumeurs malignes varient du simple au double. Globalement, 12% (4/34) des tumeurs mammaires bénignes et 34% (62/182) des tumeurs malignes expriment la protéine TP53. Ces valeurs sont du même ordre que celles obtenues pour les carcinomes du sein [87].

♦ Il est difficile de réaliser une synthèse globale des études concernant les gènes de la famille *erb* tant les protocoles utilisés et les résultats obtenus diffèrent d'une publication à l'autre. Globalement, il a été constaté une surexpression de l'ARNm du gène c-erbB-2 dans 68% des tumeurs analysées (27/40) : dans 1 seule des 6 tumeurs bénignes étudiées, et dans 76% des tumeurs malignes (26/34).

La protéine p^{185erbB-2} est détectée dans seulement 34% des tumeurs mammaires analysées (36/107). Elle est par contre plus fréquemment présente dans les tumeurs bénignes que les tumeurs malignes : 50% des tumeurs bénignes (16/32) et seulement 27% des tumeurs malignes (20/75). Ce dernier chiffre est d'ailleurs équivalent au pourcentage de cancers du sein surexprimant la protéine p^{185erbB-2} (surexpression habituellement suite à une amplification génique chez l'Homme).

- ◆ Le gène c-kit est fortement exprimé dans les 11 tumeurs mammaires étudiées (1 tumeur bénigne mixte et 10 tumeurs malignes). Cependant, la recherche de mutations ponctuelles du gène (responsables de l'activation du proto-oncogène dans les tumeurs humaines) n'a pas été réalisée dans les tumeurs mammaires de la chienne.
 - ◆ Alors que le produit du gène canin c-yes ne semble pas présent dans la glande mammaire normale, il est surexprimé dans 29% des tumeurs mammaires : 42 % (13/32) des tumeurs mammaires bénignes et 21 % (10/47) des tumeurs malignes. Cependant, l'amplification du gène c-yes n'est visible que dans les tumeurs malignes (7/8). Ces résultats correspondent à ce qui est observé dans les cancers du sein chez la femme.
 - ◆ Sachant que différents mécanismes moléculaires aboutissent à une dérégulation de l'expression de l'oncogène c-myc dans les tumeurs humaines, son expression a été recherchée
-

alors que la cycline D1 en est quasiment absente. Cependant, seules 14% des tumeurs malignes mais également un peu moins d'un tiers des tumeurs bénignes montrent une amplification du gène de la cycline A. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus pour les tumeurs du sein, leur progression étant principalement corrélée aux altérations de la cycline D1 et de la cycline E [82].

♦ Aucune mutation du gène S100A4 n'a été observée dans les tumeurs canines étudiées. Ces résultats vont dans le sens de ceux obtenus dans l'espèce humaine. En effet, diverses publications font état de la fréquente surexpression du gène et de la protéine dans les carcinomes du sein présentant une atteinte des nœuds lymphatiques, mais sans la présence de mutations du gène [3].

L'analyse du profil des mutations des principaux gènes observées dans les tumeurs mammaires de la chienne pourrait permettre de comprendre les processus moléculaires endogènes et environnementaux qui contribuent au développement de ce type de tumeur.

Chez l'Homme, les mutations du gène *TP53* sont présentes dès les premiers stades tumoraux des tumeurs du poumon, de l'estomac, de la peau, de l'utérus et du sein. Des mutations du gène *TP53* ont ainsi été mises en évidence dans les tumeurs pré-néoplasiques du sein et les tumeurs bénignes [138, 272]. Par contre, dans les cancers de l'endomètre, des ovaires, du foie, de la prostate, de la vessie, de la thyroïde, du colon ainsi que dans les leucémies, la perte de *TP53* est considérée comme tardive [138]. Chez les chiennes, il apparaît que les mutations du gène *TP53* et la surexpression de la *TP53* se produisent à tous les stades de tumeurs mammaires même si les tumeurs malignes sont le plus touchées.

L'étude de SETOGUCHI *et al.* [402] essaye d'entrevoir la relation entre les mutations du gène *TP53* (PCR/SSCP), l'expression de la protéine MDM2 (immunohistochimie) et l'hyperamplification des centrosomes. Dans cette étude, il est étonnant de retrouver le type sauvage du gène *TP53* dans les trois tumeurs mammaires étudiées, ces dernières montrant une hyperamplification des centrosomes. L'hyperamplification des centrosomes observée dans ces trois tumeurs (à une fréquence élevée pour la tumeur bénigne mixte), pourrait alors être due pour deux d'entre elles à la surexpression de MDM2 entraînant une perte de fonction de la protéine TP53. Par contre, l'hyperamplification des centrosomes observée dans l'adénome mammaire reste difficile à expliquer puisqu'il n'y a ni mutation de *TP53*, ni surexpression de MDM2 (tableau 41).

Tableau 41. Hyperamplification des centrosomes, mutations du gène TP53 et expression de la protéine MDM2 dans 9 tumeurs canines spontanées, d'après SETOGUCHI *et al.* [402].

Types de tumeurs	Pourcentage de cellules avec hyperamplification du centrosome	Statut du gène TP53	Expression de MDM2
Rhabdomyosarcome	20.2	muté	aucune
Ostéosarcome 1	21.7	muté	modérée
2	31.0	muté	forte
3	17.0	muté	modérée
Chondrosarcome	12.6	muté	forte
Myxosarcome	27.0	muté	modérée
<u>Tumeurs mammaires</u>			
Tumeur bénigne mixte	48.1	type sauvage	faible
Adénocarcinome	18.8	type sauvage	forte
Adénome	9.5	type sauvage	aucune

Aucune : 0 à 10% des cellules

Faible : 10 à 25% des cellules

Modérée : 25 à 50%

Forte : >50% des cellules

Il semblerait ainsi que les altérations du gène suppresseur de tumeur *TP53* soient initiées à un stade précoce de la carcinogenèse des tumeurs mammaires canines. Cet événement pourrait procurer un avantage sélectif pour l'expansion clonale des cellules pré-néoplasiques et néoplasiques, à partir duquel il résulterait une instabilité génétique (aneuploïdie, mutations successives) due à l'inactivité de la *TP53* sur les systèmes de réparation de l'ADN et à l'hyperamplification des centrosomes, permettant l'émergence de clones cellulaires de malignité accrue. L'étude de VAN LEEUWEN *et al.* [453] confirme l'absence d'altérations de *TP53* dans les cultures de cellules de tumeurs mammaires diploïdes alors que des mutations ponctuelles sont présentes dans des cultures hypoploïde (ostéosarcome mammaire), hyperploïde (tumeur bénigne mixte atypique) et polyplioïde (ostéosarcome).

La mise en évidence d'anomalies (surexpression ou amplification) des principaux oncogènes dans les tumeurs mammaires de la chienne implique leurs participations dans la stimulation de la prolifération cellulaire.

L'ARNm de l'oncogène *c-erbB-2* est surexprimé dans la majorité des tumeurs malignes étudiées mais plus rarement dans les tumeurs bénignes, alors que l'expression de la protéine est élevée dans la moitié des tumeurs bénignes et dans seulement un tiers des tumeurs malignes. Cependant, les valeurs correspondant à la surexpression du gène ou de la protéine varient énormément dans ces 4 études. De plus, aucune ne s'est intéressée à l'expression du gène et de la protéine dans les mêmes tumeurs. Néanmoins, les résultats obtenus étant assez semblables à ceux concernant les tumeurs du sein, la participation des gènes de la famille *erbB* et en particulier du gène *c-erbB-2* dans la transformation tumorale de la glande mammaire, par une surexpression du gène et/ou une surexpression de son produit, ne peut être exclue. Cependant, la surexpression n'étant pas retrouvée dans certaines tumeurs malignes dont une avec des métastases, la transformation tumorale de certaines tumeurs mammaires pourrait se produire indépendamment de *c-erbB-2* [2]. Il est intéressant de rappeler que ce gène serait situé sur le chromosome 1 et que la trisomie 1 a été observée dans des tumeurs mammaires canines. L'état des gènes de la famille *erb* dans la mamelle normale durant la gestation et la lactation ainsi que la corrélation entre leurs expressions et la présence des récepteurs œstrogènes devraient être étudiés puisque ces derniers réguleraient l'expression des gènes *erbB* [390].

L'expression du gène *c-kit* dans les adénocarcinomes mammaires étudiés est aussi importante que celle retrouvée dans les mastocytomes. Les adénocarcinomes mammaires pourraient, par conséquent, être placés dans la catégorie des tumeurs montrant un niveau d'expression persistant de *c-kit* après la transformation maligne comme c'est le cas pour les mastocytomes [200]. Le rôle exact de cette oncoprotéine dans la Cancérogenèse mammaire est compliqué et doit être clarifié. La recherche de mutations dans la région transmembranaire de ce gène devrait être réalisée pour les tumeurs mammaires.

L'amplification du gène *c-yes* est associée à une surexpression du produit du gène dans 2 adénocarcinomes alors que 5 adénocarcinomes montrent une amplification sans surexpression. De plus, 3 tumeurs bénignes surexpriment la protéine sans amplification du gène. Des erreurs de transcription ou des mutations dans les séquences de régulation ou de promotion pourraient conduire à une expression augmentée de la protéine sans amplification du gène. La tyrosine kinase codée par le gène *c-yes* jouant un rôle important dans la régulation de la croissance cellulaire, son activation pourrait constituer une étape importante dans la Cancérogenèse des tumeurs mammaires de la chienne, même si son rôle exact reste à être élucidé.

La protéine Myc est exprimée dans les 22 tumeurs mammaires étudiées (dont 6 tumeurs bénignes) alors que dans une autre étude l'expression de l'oncogène n'est visible que dans une seule tumeur mammaire sur les 12 étudiées [110, 175]. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour expliquer les mécanismes moléculaires aboutissant à une dérégulation de l'expression de ce gène dans les tumeurs mammaires de la chienne (amplification du gène comme dans les carcinomes du sein, mutation ou réarrangement avec augmentation de la transcription). La localisation du gène *c-myc* sur les chromosomes canins et une approche cytogénétique pourraient permettre de rechercher l'existence éventuelle d'altérations caryotypiques de nombre ou de forme du chromosome concerné.

Alors que les mutations ponctuelles des oncogènes *N*-, *K*- et *H-ras* sont retrouvées dans de nombreux cancers humains [471], mais dans un faible pourcentage de tumeurs du sein [73], aucune mutation de ces gènes n'a été mise en évidence dans les tumeurs mammaires étudiées [65, 471]. Ces observations contrastent avec les résultats concernant les rongeurs, puisque chez ces derniers, les tumeurs mammaires induites par un carcinogène sont associées à une mutation (codon 12 et 13) de *H*- ou *K-ras* [167, 243]. Les mutations à l'intérieur des

régions hot-spot sont d'ailleurs très rares dans les tumeurs canines, en dehors des mélanomes et des cancers du poumon "non à petites cellules" [139, 198, 472]. Selon WATZINGER *et al.* [472] les mutations des gènes *ras* au niveau des régions hot-spot ne joueraient pas de rôle majeur dans la pathogénie des tumeurs spontanées du Chien. Cependant il est prématué de conclure sur la base de ces études concernant principalement les régions hot-spot. Il ne faut pas exclure la présence d'altérations de ces gènes sur des sites différents ou suivant d'autres mécanismes d'activation, comme cela est envisagé pour les tumeurs du sein [65].

Chez la chienne, les cyclines D1 et A sont absentes du tissu mammaire normal et des tumeurs bénignes. Alors que la cycline A est présente dans la moitié des tumeurs mammaires malignes étudiées, seulement 1 tumeur maligne sur 7 présente une amplification du gène de la cycline A. De tels résultats impliquent que des mécanismes autres que l'amplification du gène doivent être pris en compte pour expliquer l'augmentation de l'expression de la cycline A dans ce type de tumeur (mutation dans la région promotrice du gène ou altération de l'expression d'un facteur de régulation de la transcription). Bien que la surexpression de la cycline D1 ne soit pas fréquente dans les tumeurs mammaires canines, il ne faut pas exclure sa participation dans le développement de ces tumeurs [300]. Des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier le rôle de ces deux cyclines et expliquer leurs participations différentes dans l'espèce canine et humaine, la progression des tumeurs du sein étant principalement corrélée aux altérations des cyclines D1 et E.

L'absence de mutations du gène S100A4 dans les tumeurs canines étudiées ne permet pas d'exclure le rôle de ce gène dans la progression des tumeurs et la formation des métastases chez les chiens [260]. Dans l'espèce humaine, les diverses publications font état de la fréquente surexpression du gène et de la protéine dans les carcinomes du sein présentant une atteinte des nœuds lymphatiques, mais pas des mutations du gène [3]. L'étude de l'amplification et de la méthylation du gène pourrait permettre d'appréhender d'éventuelles modifications de la fonction du gène. D'autres études semblent donc nécessaires afin d'évaluer le rôle de ce gène dans la pathogénie des tumeurs mammaires de la chienne (amplification du gène et immunomarquage de la protéine dans différents échantillons de tumeurs mammaires primaires et de métastases).

La disparition de l'expression de la cadhérine E (produit du gène CDH1) dans les carcinomes solides observée par RESTUCCI *et al.* [358], expliquerait une perte de l'adhésion

intercellulaire favorisant l'invasion tumorale. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'évaluer, chez les chiens, l'association entre les cadhérines E et les caténines ainsi que la coopération de ces protéines avec d'autres molécules d'adhésion dans le but de comprendre les mécanismes complexes conduisant à la formation des métastases [358].

De même, la relation entre les différents génotypes associés aux microsatellites polymorphes du gène *BRCA1* canin et la pathogénie des tumeurs mammaires reste à établir. Il serait ainsi intéressant de vérifier si les polymorphismes retrouvés peuvent être associés à une plus grande susceptibilité à développer des cancers.

Tandis que dans la plupart des échantillons de tissus mammaires normaux ou hyperplasiques, aucune activité de la télomérase n'est mise en évidence, différentes études ont uniformément montré que, chez la chienne, une réactivation de la télomérase a lieu dans les cellules des tumeurs mammaires malignes et bénignes (certains adénomes montrant une forte activité télomérase). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus pour les tumeurs humaines (et en particulier pour les tumeurs du sein), les tumeurs malignes étant habituellement télomérase-positives et les tumeurs bénignes, télomérase-négatives comme les tissus normaux.

Ainsi, la réactivation de la télomérase pourrait être associée à la formation des tumeurs mammaires bénignes autant que celle des tumeurs malignes. A l'opposé, certaines tumeurs malignes mixtes et un adénocarcinome mammaire en semblent dépourvues. Il est cependant possible que des niveaux très faibles soient suffisants pour maintenir la longueur des télomères [487]. Selon FUNAKOSHI et *al.* [124] les tumeurs malignes mixtes n'exprimant pas de télomérase s'expliqueraient par la présence de métaplasie osseuse ou cartilagineuse et par la faible quantité de cellules épithéliales malignes. D'autres éléments pourraient permettre d'interpréter le défaut d'activité de la télomérase dans les quelques tumeurs malignes de différentes origines :

- La télomérase aurait pu être inactivée durant la procédure (lors de l'échantillonnage ou de la technique TRAP) [32, 61].
- Il est également possible qu'il existe des mécanismes télomérase-indépendants permettant de maintenir la longueur des télomères (ALT) comme cela est montré dans certaines tumeurs humaines télomérase-négatives [55].
- Une dilution des cellules tumorales avec des cellules somatiques voisines télomérase-négatives pourrait expliquer les faibles niveaux d'activité télomérase [487].

- Lorsque la télomérase est activée tardivement, seule une petite proportion des cellules à l'intérieur de la tumeur pourraient être télomérase-positives [292]. Ceci illustre ainsi l'importance du moment de l'activation de la télomérase lors du processus du développement tumoral.

Ces différentes études confortent l'idée que la télomérase puisse avoir un rôle important dans le développement des tumeurs mammaires du Chien en permettant la maintenance de la longueur des télomères, bien que d'autres mécanismes doivent être également considérés [32, 488]. Toutefois, afin d'examiner l'association des télomères avec le développement des tumeurs mammaires, leur longueur devrait être comparée entre des tissus mammaires sains et tumoraux de la même chienne. Seuls les résultats quantitatifs peuvent permettre une interprétation fiable et une comparaison avec d'autres types de tumeurs.

Ainsi, différentes publications font état d'anomalies chromosomiques de structure généralement complexes et hétérogènes (fusions centriques, délétions). Des anomalies de nombre (hypo et hyperploïdie) sont également fréquentes (environ 47% des tumeurs mammaires malignes sont aneuploïdes). De même, des études récentes et encore incomplètes montrent l'existence de mutations somatiques du génome des cellules des tumeurs mammaires de la chienne. Les techniques de biologie moléculaire ont ainsi permis d'observer des anomalies de gènes déjà fortement incriminés pour leurs rôles dans la pathogénie des tumeurs du sein chez la femme (mutations ponctuelles du gène TP53, surexpression de l'oncogène c-erbB-2 et/ou surexpression de l'oncoprotéine, amplification de l'oncogène c-yes...). De plus, différentes études ont uniformément montré que chez la chienne, une réactivation de la télomérase a lieu, non seulement dans les cellules des tumeurs mammaires malignes mais également des tumeurs bénignes alors que dans la plupart des échantillons de tissus mammaires normaux ou hyperplasiques aucune activité de la télomérase n'est mise en évidence. Il est cependant possible de noter des différences entre les résultats observés chez l'Homme et le Chien puisque les lésions mammaires bénignes dans l'espèce humaine sont très rarement aneuploïdes et dépourvues d'activité télomérase. De même, alors que la progression des tumeurs mammaires est principalement corrélée aux altérations de la cycline D1 et de la cycline E chez la femme, il semblerait que, chez la chienne, ce soit la cycline A qui participe au développement des tumeurs mammaires. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour confirmer ou infirmer ces résultats ainsi que pour évaluer la participation éventuelle d'autres gènes.

En conclusion, actuellement, aucun facteur étiologique (virus, agents chimiques...) n'a été reconnu comme responsable de l'apparition des tumeurs mammaires chez la chienne. Seuls des facteurs favorisants, notamment hormonaux semblent mis en cause avec plus ou moins de certitude, leurs rôles dans la pathogénie des tumeurs mammaires de la chienne n'ayant pas été encore clairement définis. De plus, jusqu'à maintenant, aucun gène de prédisposition aux tumeurs mammaires n'a été mis en évidence chez la chienne.

Des mutations ponctuelles du gène suppresseur de tumeur *TP53* ont été observées dans les tumeurs mammaires bénignes et malignes de la chienne. Un petit nombre d'études a également permis de constater la surexpression (*c-erbB-2*, *c-kit*) ou l'amplification (*c-yes*, gène de la cycline A) de certains oncogènes dans des tumeurs mammaires bénignes et malignes alors que d'autres publications font état de la surexpression du produit de gènes ayant un rôle important dans les phénomènes cellulaires fondamentaux (les protéines *TP53*, *p185^{erbB-2}*, *Myc*, *MDM2*, la tyrosine kinase du gène *c-yes*, la cadherine E et la cycline A). Il est intéressant de remarquer que chez la femme atteinte de cancers du sein, des anomalies de ces mêmes gènes (dont la plupart présentent une forte homologie entre les espèces humaines et canines) ont été constatées dans un pourcentage à peu près comparable pour certains, mais avec incidence deux fois plus faible pour le gène *TP53*. A l'inverse, les observations concernant la ploïdie des cellules et la réactivation de la télomérase dans les tumeurs bénignes, ainsi que les altérations de la cycline A permettent d'envisager des différences inter-espèces du processus cancéreux.

L'utilisation des nouveaux outils de génétique moléculaire développés ces 5 dernières années ainsi que les avancées dans les travaux de cartographie (génétique, cytogénétique et physique) chez le Chien et de cartographie comparée (exploitation de la carte génétique humaine) devraient permettre, dans un proche avenir, de reconnaître la spécificité de certains remaniements chromosomiques non aléatoires et ainsi d'identifier des régions du génome canin méritant une analyse moléculaire approfondie afin de faire la jonction entre approche cytogénétique et approche moléculaire. De même, une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires à la base de la transformation tumorale hormono-dépendante du tissu mammaire dans l'espèce canine (rôle initiateur et/ou promoteur des hormones stéroïdiennes et en particulier des progestagènes) est indispensable.

Troisième partie

**DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES**

I. VALIDITE DU MODELE CANIN EN ONCOLOGIE COMPAREE

Différentes études cliniques et lésionnelles de cancérologie comparée ont permis de démontrer qu'à côté de la pathologie expérimentale et des ressources qu'offrent les animaux de laboratoire, la médecine vétérinaire, notamment celle de l'animal de compagnie, peut contribuer à d'incontestables acquisitions en recherche médicale [201, 233, 330, 392, 452] :

- Une élévation spectaculaire du niveau de médicalisation des animaux familiers (le second derrière l'espèce humaine), avec en parallèle une élévation de la qualité du diagnostic et des soins vétérinaires, ont été observées ces dernières années [322].
- Les tume

De plus, l'espérance de vie des chiens est suffisamment longue pour surveiller les effets secondaires tardifs d'un traitement.

- Les essais cliniques chez les animaux sont généralement moins onéreux que chez l'Homme.

Il est clair que des modèles canins de cancers sporadiques représentent une ressource importante pour étudier l'action des carcinogènes potentiels, ainsi que pour évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques [193, 340]. C'est le cas des tumeurs mammaires de la chienne qui offrent un intérêt certain pour l'étude des cancers du sein de la femme, de part leurs nombreuses similitudes épidémiologiques, cliniques et histologiques. Depuis 30 ans environ, de nombreux auteurs ont d'ailleurs argumenté pour confirmer la validité du modèle canin pour l'étude des cancers du sein [193, 246, 326, 340, 352, 388, 403, 427] :

- La glande mammaire saine présente des similitudes dans les 2 espèces, tant dans sa structure histologique que dans ses systèmes d'irrigation et d'innervation.
- Les tumeurs mammaires représentent le type tumoral le plus fréquent chez les chiennes et chez les femmes [81, 115, 298]. De plus, selon SCHNEIDER [388], l'incidence des tumeurs mammaires chez les chiennes serait trois fois plus élevée que chez la femme.
- En tenant compte des espérances de vie respectives, l'âge moyen d'apparition est similaire : 10-11 ans chez les chiennes, après la ménopause chez les femmes (moyenne d'âge 59 ans). Elles apparaissent rarement avant 25 ans chez la femme et 5 ans chez les chiennes [76, 393].
- Les tumeurs mammaires de la chienne et de la femme sont hormonodépendantes [81, 393]. De plus, les tumeurs mammaires possèdent des récepteurs à la progestérone et aux œstrogènes dans les deux espèces [234, 246, 268]. Comme chez la femme, on remarque une perte de ces récepteurs parallèlement à la perte de la différenciation de la tumeur, de même que la survie est supérieure chez les chiennes porteuses de

tumeurs possédant des récepteurs ER et/ou PR, par rapport à celle qui sont ER et PR négatives [268].

- Les carcinomes représentent la grande majorité des cancers mammaires chez la chienne et chez la femme [99, 427]. Une nouvelle classification adaptée de celle des tumeurs du sein chez la femme a d'ailleurs été adoptée chez les chiennes [320].
- Des études nécropsiques mettent en évidence des taux élevés de métastases chez les chiens comme chez les humains à la différence des taux bas typiquement retrouvés chez les rongeurs [368]. De plus, dans les deux espèces, les sites préférentiels de métastases sont représentés par les poumons et les nœuds lymphatiques régionaux [118].
- Comme chez les humains, il n'existe aucune preuve d'une participation virale dans le développement des tumeurs mammaires de la chienne [238].

Il est déjà bien établi que l'approche génétique des maladies héréditaires du Chien profite de l'expérience acquise en génétique humaine – les résultats obtenus en génétique humaine étant transférés, au fur et à mesure de leur obtention, vers l'espèce canine [444]. De même, nous avons vu que les résultats obtenus en oncologie humaine servent de schéma de base pour identifier les acteurs moléculaires de la carcinogenèse dans l'espèce canine.

A l'inverse, lorsque le gène responsable de la maladie héréditaire n'a pas encore été isolé chez l'Homme, les études conduites chez le Chien offrent une alternative au travail de génétique humaine visant à l'identification du gène responsable de cette maladie [322, 444]. Des publications scientifiques récentes prouvent que le modèle canin représente également une source d'information de qualité pour la compréhension de la génétique du cancer chez l'Homme [183, 201, 235, 330, 444] :

- A la différence du modèle murin, le Chien présente une grande diversité génétique, ce qui en fait une espèce appropriée pour étudier les prédispositions aux cancers. L'espèce canine qui regroupe quelques 350 races, présente une très grande variabilité phénotypique (variété de taille, de forme, de caractère, d'aptitude). Cette diversité

entre les races d'une même espèce est le fruit d'une sélection naturelle, mais également artificielle, par l'Homme qui n'a cessé de sélectionner des chiens selon des aptitudes ou des critères physiques.

- En 2000, 370 maladies génétiques ont été reconnues chez le Chien. Pour 66% de ces désordres, le mode de transmission est autosomique récessif. De plus, ces maladies héréditaires canines sont généralement décrites dans seulement quelques races et 50% d'entre elles sont spécifiques à une seule race. Chaque année, une douzaine de nouveaux désordres génétiques est rapportée [333]. Pour 55% des 300 maladies humaines ayant un analogue dans une espèce non-humaine, au moins un cas de chien malade est rapporté. Pour 20% d'entre elles, les affections canines constituent les seuls modèles, spontanés et naturels. Il a déjà été montré que des affections monogéniques similaires chez le Chien et chez l'Homme sont dues à l'altération de gènes orthologues [186].
- La prolifcité de l'espèce, la précocité de la maturité sexuelle et l'espérance de vie plus courte chez les chiens permettent de réunir des familles très nombreuses autorisant des analyses génétiques statistiques. De plus, la tenue de livres généalogiques permet généralement de suivre les liens parentaux depuis plusieurs décennies.
- Les cancers animaux observés sont spontanés, par opposition aux cancers induits expérimentalement par des carcinogènes.
- Il a été prouvé que certains gènes humains montrent une plus forte homologie avec le gène canin que le gène murin. C'est le cas du gène *BRCA1*, la séquence nucléotidique des gènes humains et canins est identique à 84% alors que la séquence du gène murin n'a que 72% de similitudes [434].
- La réactivation de la télomérase correspond à un des mécanismes devant être surmonté pour établir le phénotype immortel caractéristique des cellules cancéreuses. Des différences significatives ont été identifiées entre la Souris et l'Homme en ce qui concerne la biologie des télomères [481]. En premier lieu, les télomères humains sont beaucoup plus courts que les télomères murins (15kbp contre 30 à 60 kbp). Ensuite,

bien que l'expression de la télomérase fasse largement défaut dans les tissus somatiques humains, son expression est manifeste dans les tissus somatiques de la souris adulte et l'enzyme ne semble pas jouer un rôle aussi significatif dans le développement d'un cancer : 2 oncogènes coopérant *ras* et *myc* peuvent transformer les cellules de rongeurs alors que l'expression de la sous-unité catalytique (hTERT) est nécessaire en plus à ces oncogènes pour transformer les cellules humaines. Enfin, les cellules murines en culture deviennent spontanément immortelles, ce qui n'est pas le cas des cellules humaines [36].

Le Chien semble donc être un meilleur modèle car la longueur des télomères du Chien est du même ordre que dans l'espèce humaine (15- 23 kbp) et la télomérase n'est pas détectée dans les tissus canins normaux, alors qu'elle est réactivée dans les cellules cancéreuses du Chien. De plus, une étude suggère qu'un effritement télomérique à également tendance à se produire avec l'âge chez le Chien [310].

- La fréquence plus élevée de certains types de cancers dans certaines races ou familles de chiens suggère qu'une composante héréditaire puisse être importante dans le développement et la progression des tumeurs chez les chiens, et qu'il soit possible qu'il existe dans ces races, comme c'est le cas chez les humains, des facteurs prédisposants [276, 294]. D'ailleurs, des études récentes de génétique moléculaire ont permis d'établir la relation entre le caractère familial d'un type de cancer et une anomalie génétique pour deux types de tumeur :
 - Des mutations de l'oncogène *c-kit* constituerait la clef d'une véritable prédisposition familiale au mastocytome dans la race boxer [228, 231].
 - Le complexe cystadénocarcinome rénal multifocal et dermatofibrose nodulaire héréditaire du Berger Allemand a été associé à un ensemble de 13 marqueurs génétiques associés (locus *RCND*) portés par le chromosome 5 [183].
- Les travaux de cartographie chez le Chien et de cartographie comparée ont connu ces dernières années des avancées très prometteuses permettant d'envisager la cartographie de gènes morbides en s'aidant éventuellement de l'approche du gène candidat ou de l'étude d'aberrations chromosomiques afin de déterminer plus rapidement le gène recherché.

- De plus, selon REIMANN [357], du point de vue cytogénétique, les tumeurs du Chien et de l'Homme sont comparables, ce qui permet des études comparatives afin d'identifier des régions du génome fréquemment affectées par des aberrations dans les deux espèces.

Le Chien apparaît donc comme un excellent modèle animal pour l'étude, non seulement des maladies génétiques humaines, mais aussi du cancer où l'on constate, par ailleurs, la pauvreté en modèles animaux de cancers héritables, en dehors du syndrome du carcinome rénal chez le rat Eker [196]. Ainsi, selon KUSKA : "*Cancer genetics going to the dogs*", traduit par le professeur PARODI "Le Chien est l'avenir de la génétique du cancer" [201, 330].

II. VALIDITE DES ETUDES EXPOSEES

Après avoir présenté l'ensemble des résultats disponibles dans la littérature sur l'étude génétique et moléculaire des tumeurs mammaires de la chienne, il convient d'essayer de juger de la qualité et de la validité des résultats obtenus.

II.A Le processus de cancérisation est-il identique chez l'Homme et le Chien ?

D'une façon générale, la relation causale entre la survenue d'un cancer et l'existence d'altérations génétiques est désormais bien établie. Les modèles expérimentaux de transformation maligne *in vitro* ainsi que l'utilisation de souris KO (*knock-out*) ont permis d'apporter, en de nombreuses occasions, une démonstration génétique des liens entrevus entre perte de contrôle du cycle de division cellulaire et activation oncogénique, et de caractériser les principaux acteurs moléculaires du processus de cancérisation. Ces derniers, ainsi que leurs fonctions précises au sein des phénomènes cellulaires fondamentaux (cycle cellulaire, différenciation, apoptose, stabilité génique) commencent à être largement connus chez l'Homme. Néanmoins, même si l'analyse de ces différents modèles expérimentaux a permis de montrer des similitudes existant entre ces modèles, elle a également mis en évidence un certain nombre de différences, notamment en ce qui concerne la télomérase [36, 66].

La haute conservation de la plupart des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs étudiés chez l'Homme et le Chien [281, 309, 434, 492] suggère leur intervention dans des fonctions primordiales communes. Ainsi, la plupart des auteurs considèrent que ce qui est admis pour l'Homme, doit l'être chez les chiens, quitte à se laisser aller à la facilité de transposer des dogmes démontrés uniquement en cancérologie humaine. Pourtant, la grande majorité des mécanismes impliquant ces gènes dans la cancérogenèse et le développement des tumeurs reste à confirmer dans cette espèce.

Il ne faut également pas oublier que si les tumeurs mammaires de la chienne présentent de nombreux points communs avec les tumeurs du sein de la femme, il est néanmoins possible d'observer des différences entre ces deux espèces, principalement au niveau hormonal. Ainsi, les hormones sont déterminantes dans les deux espèces, mais de façon spécifique. Les variations hormonales cycliques, liées aux différents moments de la vie de reproduction de ces femelles, diffèrent. Chez la femme, la lactation est dépendante de la

gestation alors que ce n'est pas le cas chez la chienne. Dans l'espèce humaine, les œstrogènes semblent être le facteur essentiel qui influence la tumorigénèse, alors que chez la chienne, il semblerait que ce soient les progestagènes et indirectement la GH [275, 371, 426]. La participation hormonale à la tumorigénèse mammaire pourrait donc être différente dans ces deux espèces.

II.B Les méthodes utilisées et les problèmes d'interprétation

Les études génétiques et moléculaires appliquées aux tumeurs mammaires de la chienne sont peu nombreuses (environ 60 études) comparées à celles réalisées pour le cancer du sein de la femme. De plus, les techniques et les protocoles utilisés diffèrent d'une étude à une autre et rendent ainsi difficile la réalisation d'une synthèse globale.

II.B.1 L'orientation des recherches

Des études ont déjà permis de montrer l'existence dans les tumeurs mammaires de la chienne de mutations d'un petit nombre de gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes. Cependant d'autres gènes connus pour leurs rôles dans la pathogénie de certaines tumeurs humaines et/ou d'autres tumeurs canines n'ont pas encore fait l'objet d'études. C'est le cas, par exemple, du gène *WAF1*

affinité et concentration de l'anticorps, temps d'incubation, sensibilité du système de détection et conséquences de la fixation) peut être à la base des problèmes d'interprétation des résultats.

➤ Les protocoles utilisés chez le Chien, pour une même protéine, varient beaucoup en fonction des publications. Le facteur le plus marquant est l'anticorps employé pour la détection des protéines. Si on prend l'exemple de la détection de la protéine TP53 dans le noyau des cellules des tumeurs mammaires de la chienne, quatre anticorps différents, habituellement utilisés en recherche et en médecine humaine (donc dirigés contre la protéine TP53 de l'Homme), ont été employés : les anticorps monoclonaux Pab 1801 [175], BP53-12 et Pab122 [147] et l'anticorps polyclonal CM-1 [128, 365, 386, 465]. Les deux premiers anticorps reconnaissent la partie N-terminale de la protéine alors que le troisième reconnaît la partie C-terminale [147]. Selon VELDHOEN [456], l'anticorps monoclonal Pab1801 ne reconnaîtrait pas la protéine TP53 canine de type sauvage. On peut supposer que, pour les mutations affectant le domaine central de la protéine, les anticorps spécifiques d'une des extrémités de la protéine ne reconnaissant pas la protéine TP53 canine sauvage, ne reconnaîtront pas non plus le type mutant. L'utilisation systématique de plusieurs anticorps, reconnaissant différents épitopes stables de la protéine TP53, pourrait permettre d'éliminer la plupart des résultats ambigus. Une seule étude utilise deux anticorps (BP53-12 et Pab122) [147]. Dans cette étude, les incidences sont très élevées puisque 50 à 60 % des tumeurs mammaires malignes étudiées réagissent contre l'un ou l'autre des anticorps, 35% contre les deux et 75% contre l'un ou l'autre. Ainsi, plus le nombre d'anticorps utilisé est élevé, plus le ratio d'échantillons positifs est élevé.

➤ Outre ces données purement techniques, d'autres problèmes sont liés à l'intitulé des résultats. L'expression d'une protéine visualisée par immunohistochimie est recherchée sur l'ensemble des échantillons, en observant la coloration cellulaire. Selon les études, les résultats sont exprimés de plusieurs façons :

- soit en pourcentage de cellules positives présentant une coloration [128, 175, 365],
- soit en pourcentage de tumeurs positives, une tumeur étant considérée comme positive lorsque le pourcentage de cellules colorées dépasse un certain seuil (10% le plus souvent) [147, 386].

➤ L'interprétation des résultats pose également un problème. Par exemple, en ce qui concerne le gène *TP53*, l'intérêt de détecter la protéine est que l'on suppose qu'une

surexpression de la protéine TP53 est corrélée à une mutation du gène. En effet, comme seules les protéines TP53 mutées ont une demi-vie assez longue pour permettre leurs détections dans les coupes de tissus, la mise en évidence de la protéine TP53 dans les cellules tumorales humaines est habituellement associée aux mutations du gène *TP53*.

Cette corrélation a effectivement été démontrée pour certains cancers chez l'Homme mais pas pour tous [151, 236]. En ce qui concerne les tumeurs du sein, la concordance entre analyse moléculaire et immunohistochimique n'est pas totale car les exons 4, 9 et 10 contiennent un nombre non négligeable de mutations de *TP53* (de 15% à 25%) avec une forte proportion de mutations non-sens qui ne conduisent pas à l'accumulation de protéine [419]. L'immunoréactivité de TP53 serait, de ce fait, un indicateur approximatif du dysfonctionnement de *TP53* dans les tumeurs humaines [483].

La corrélation entre surexpression de TP53 et mutation de *TP53* n'a jamais été démontrée chez le Chien. Le nombre global des tumeurs mammaires exprimant la protéine TP53 (44 tumeurs) est environ deux fois plus élevé que celui des tumeurs mammaires présentant une mutation du gène (19 tumeurs). De plus, dans l'étude réalisée par WAKUI *et al.* [465], l'expression de la protéine TP53 n'est pas significativement associée à la présence de mutations du gène *TP53*.

En ce qui concerne le gène canin *MDM2*, seule l'expression de son produit a été étudiée [402]. Rien ne permet de conclure que la surexpression de la protéine observée dans 2 tumeurs mammaires est due à l'amplification ou la surexpression du gène. Il en est de même pour le gène de la cycline A puisque le gène est amplifié dans 14% des tumeurs mammaires malignes alors que la cycline A est exprimée dans 50% des tumeurs malignes [300].

Il apparaît donc nécessaire d'étudier l'expression des protéines en fonction du statut de gène afin de déterminer si la détection de la protéine par immunohistochimie peut être considérée comme un bon indicateur de la présence de mutations dans les tumeurs mammaires de la chienne. Il serait également intéressant d'étudier l'influence des autres étapes de la technique (fixation, coloration...) sur les résultats et de déterminer, dans l'espèce canine, un seuil fiable de positivité des échantillons étudiés avec cette technique.

II.B.3 Les techniques de biologie m

SSCP (la seule méthode utilisée chez le Chien) alors que ces techniques pourraient permettre d'éviter de séquencer inutilement l'ADN d'un grand nombre de tumeurs [248, 256, 257, 259, 306, 459]. Le séquençage de l'ensemble d'un gène sur les échantillons positifs après criblage semble d'ailleurs plus informatif que le séquençage direct d'une seule partie du gène, choisie en fonction de la présence de mutations chez l'Homme.

En effet, en prenant l'exemple du gène *TP53*, la zone de recherche des mutations du gène dans les tumeurs mammaires de la chienne, se limite souvent à la partie centrale [256, 257, 306, 465] siège principal des mutations chez l'Homme [463]. Toutefois, il semblerait que la répartition des mutations sur le gène *TP53* dans les tumeurs canines, soit beaucoup plus étendue (même si le nombre de mutations recensées dans cette espèce est beaucoup plus faible que chez l'Homme) et qu'elles ne soient peut-être pas situées, en aussi grande majorité que chez l'Homme, dans la zone du gène codant la partie centrale de la protéine TP53 [197]. En dehors des mutations silencieuses, 6 mutations ont ainsi été observées sur les exons 2 et 4 de 2 tumeurs mammaires [71, 459].

➤ L'utilisation d'une technique de recherche d'une anomalie génétique chez le Chien est orientée par les connaissances acquises chez l'Homme. Prenons l'exemple des oncogènes. Il est admis que, chez l'Homme, l'oncogène *c-erbB-2* est activé par amplification et qu'il n'existe jamais d'activation par translocation ou mutations ponctuelles [29, 307]. Les 2 études concernant ce gène dans les tumeurs mammaires de la chienne cherchent donc à mettre en évidence l'amplification du gène [2, 248] en étudiant l'expression de son ARN messager alors qu'il n'existe pas, à notre connaissance de séquençage et d'étude des mutations de l'oncogène *c-erbB-2* dans les tumeurs de la chienne.

De même, l'équipe de WATZINGER [472] a essayé de mettre en évidence des mutations des gènes *ras* dans les régions "hot spot" des mutations observées chez l'Homme, alors que d'autres mécanismes d'activation de ces gènes pourraient exister chez les chiens.

A l'inverse, alors que plusieurs types de mutations ponctuelles dans la région juxtamembranaire du gène *c-kit* ont été observés dans des tumeurs de la Souris et de l'Homme, et que la séquence codant la portion juxtamembranaire du récepteur KIT est conservée à 100% chez le Chien, la Souris et l'Homme [228], la seule étude concernant les tumeurs mammaires de la chienne est relative à l'expression du gène [200].

➤ Un certain nombre de techniques moléculaires qui offrent des perspectives intéressantes n'a pas été utilisé. La technique FISH et les peintures de chromosomes, offrant

pourtant la possibilité d'une cytogénétique moléculaire, n'a été utilisée que par une seule équipe qui s'est attachée à étudier et décrire des remaniements passés inaperçus avec la cytogénétique classique [436]. Des délétions ou translocations de parties de chromosomes contenant des gènes déjà localisés devraient être recherchées. Les analyses cytogénétiques ne mentionnent pas l'existence de chromosomes double minute, ni de segments HSR, entraînant une amplification des gènes qu'ils contiennent (comme par exemple *c-erbB-2*). De même l'hybridation génomique comparative pourrait permettre de mettre en évidence un déficit ou une amplification de l'ADN dans une région de chromosome. Des études complémentaires devraient essayer de mettre en évidence des mutations germinales du gène *TP53*. La perte ou la délétion du gène non muté (par l'étude de la perte d'hétérozygotie) permettraient de confirmer l'hypothèse de formes héréditaires.

➤ Il est également possible que certains résultats représentent une sous-estimation de l'expression réelle d'un gène suite à une abondance de tissus normaux (non cancéreux) à l'intérieur des échantillons de tumeurs.

II.B.4 La mise en évidence de l'activité de la télomérase

Dans la deuxième partie nous avons vu que certains éléments liés à la procédure d'étude de l'activité de la télomérase pourraient permettre d'interpréter le défaut d'activité de l'enzyme mis en évidence dans certaines tumeurs malignes :

- L'inactivation de la télomérase lors de l'échantillonnage ou de la réalisation de la technique TRAP.
- La sensibilité et la spécificité de cette technique.
- Une dilution des cellules tumorales avec des cellules somatiques voisines.

Les problèmes liés à l'interprétation des différents résultats publiés chez le Chien sont dûs au faible nombre de données disponibles pour l'instant dans la littérature ainsi qu'au manque de standardisation des résultats publiés. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus en Cancérologie humaine (exemple du gène *BRCA1*), en montrant la spécificité de l'espèce canine, condition nécessaire à l'avancée des connaissances sur les rôles joués par ces différents gènes dans les tumeurs mammaires de la chienne et à leur mise en application pratique éventuelle.

III. GENETIQUE MOLECULAIRE ET APPLICATIONS EN ONCOLOGIE HUMAINE

La connaissance de la récurrence d'altérations génétiques responsables de la cancérogenèse renouvelle les possibilités de caractérisation des tumeurs et conduit à en rechercher des applications cliniques. Ces altérations dépendent logiquement de l'ordre chronologique des événements mutationnels qui surviennent au cours de la progression tumorale. Les altérations précoces permettraient de mieux repérer une lésion pré-néoplasique à fort potentiel dégénératif alors que la mise en évidence d'une altération tardive, soit au niveau de la tumeur primaire, soit dans des sites à distance, permettrait de préciser les probabilités de survenue de métastases et aiderait ainsi à poser l'indication de traitements complémentaires.

Les techniques de biologie moléculaire ont servi et servent encore à démontrer et comprendre l'implication de certains gènes dans le processus de cancérisation. Il y a eu, très logiquement, passage de ces techniques du laboratoire de recherche à la biologie clinique appliquée. Ces techniques sont ainsi à la base des applications pratiques de ces connaissances fondamentales dans les domaines :

- De la prédiction du risque pour un individu de développer au cours de sa vie, en fonction de ses antécédents familiaux et de son mode de vie, tel ou tel type de tumeur maligne.
- Du diagnostic, en permettant de répondre dans certains cas à la question de savoir si un tissu biopsique contient ou ne contient pas du tissu cancéreux et si oui de quelle origine (parce que l'histologie traditionnelle n'est pas formelle, ou parce que l'on souhaite descendre le seuil de détection par rapport à l'examen microscopique).
- Du dépistage de lésions précancéreuses ou de petites tailles.
- Du pronostic, par l'identification de facteurs biologiques particuliers.
- De la thérapeutique, soit par adaptation des traitements conventionnels en fonction des données pronostiques, soit par de nouvelles formes de thérapie basées sur les connaissances des anomalies moléculaires associées au fonctionnement des cellules malignes, soit par choix orienté de certaines molécules anticancéreuses jugées plus efficaces pour un génotype donné (contournement de la chimiorésistance).

Les marqueurs biologiques de cancers sont des molécules détectables dans les liquides biologiques, essentiellement le sérum ou le plasma, et dont les modifications qualitatives ou quantitatives peuvent indiquer un risque de survenue de cancer, la présence d'une néoplasie ou la progression d'une tumeur. On distingue ainsi les marqueurs de nature protéique qui, pour la plupart, sont détectables dans le sang et les marqueurs génétiques qui sont des gènes dont les altérations sont détectables au niveau de l'ADN ou de l'ARN à l'échelon tissulaire ou cellulaire [20]. Cependant, seul un petit nombre d'altérations génétiques sont utiles pour l'oncologue dans sa pratique quotidienne et peuvent bénéficier de l'appellation de marqueurs [21]. Ce sont les mutations des gènes de prédisposition qui, aujourd'hui, sont les marqueurs génétiques d'utilité clinique. Pour les formes sporadiques, le typage moléculaire ne peut s'envisager qu'au prix de la mise au point de technologies nouvelles permettant une étude multi-paramétrique d'expression des oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs, afin de mieux établir le profil génétique individuel de chaque cancer.

III.A Classification des tumeurs

Le désir de plus en plus fort de prendre en charge le cancer, la préoccupation grandissante d'en prévenir certains et, dans le cas où cela n'est pas possible, au moins de réduire les risques d'en mourir, représentent un enjeu prioritaire de santé publique. Cependant, la base génétique polygénique et multifactorielle de certains cancers, comme le cancer du sein par exemple, confère à chaque tumeur un phénotype et un potentiel évolutif propres [338]. Cette hétérogénéité, mal appréhendée par les paramètres diagnostiques et pronostiques actuels de classification tumorale, est une des raisons majeures des échecs thérapeutiques. C'est pourquoi une caractérisation moléculaire plus approfondie est indispensable pour mieux cerner cette diversité et améliorer les classifications actuelles [27, 28].

Des techniques d'analyse moléculaire à grande échelle se sont développées récemment. Le saut technologique que représentent les "puces à ADN" permet d'envisager la caractérisation, non plus de quelques altérations, mais de plusieurs milliers qui vont permettre de dresser une véritable carte d'identité moléculaire de la tumeur. Ces dernières, en corrélation avec les critères histocliniques, peuvent améliorer le système actuel de classification, en identifiant de nouvelles classes diagnostiques et/ou pronostiques de la maladie dans des groupes de tumeurs apparemment sim

III.B Détermination de la susceptibilité

III.B.1 Cancers familiaux

C'est dans ce cadre que la détermination du risque par les techniques de biologie moléculaire a sa place la plus importante. Depuis le début des années 1990, des consultations d'oncogénétique se sont développées aux Etats-Unis et en Europe. Ces consultations permettent un diagnostic de présomption de prédisposition génétique au cancer, grâce à la réalisation d'une analyse moléculaire communément appelée "test génétique". L'activité qui prédomine actuellement concerne, de par leur fréquence, les formes familiales de cancers du sein et de l'ovaire et les formes familiales de cancers coliques.

L'analyse moléculaire repose sur l'étude de l'ADN à partir d'une prise de sang réalisée sur le patient à risque. Les altérations génétiques sont différentes d'une famille à l'autre. En revanche, on retrouve la même mutation chez les membres d'une même famille. Il y a donc deux types de tests génétiques : celui représenté par la première recherche de mutation familiale et le test individuel. La première analyse moléculaire dans une famille est une étape longue et difficile, du fait de l'implication possible de plusieurs gènes et de l'hétérogénéité génétique. De plus, le nombre de mutations possibles est proportionnel à la taille du gène. Dans la majorité des grands syndromes de cancers familiaux l'anomalie génétique a été caractérisée, et le gène cloné et séquencé, permettant alors, avec plus ou moins de facilité, de détecter chez un sujet, à partir d'un prélèvement de cellules somatiques (lymphocytes le plus souvent), la présence ou l'absence de la mutation dans le gène responsable du syndrome. La technique utilisée dépend pour chaque gène de ce qui est connu des mutations (localisation, nature).

Cependant, si l'on prend l'exemple du gène *BRCA1*, les techniques actuelles ne permettent pas la détection de toutes les mutations (lors de la première recherche de mutation génétique dans les familles ayant une histoire de cancers du sein et/ou de l'ovaire). Focalisées sur la recherche d'anomalies ponctuelles ou de petites tailles, les analyses génétiques habituellement pratiquées, en particulier par la technique de séquençage, ne permettent de détecter que deux tiers des mutations attendues. Les chercheurs ont donc émis l'hypothèse de l'existence de mutations de plus grandes tailles. Une équipe de l'Institut Curie a développé une méthode différente, appelée peignage d'ADN, qui permet l'analyse globale du gène, sorte de

"code-barre coloré" du gène car associé à une hybridation avec des sondes fluorescentes [126]. Cette technique a permis de montrer l'existence d'une grande délétion représentant 15% du gène *BRCA1* (conduisant à la synthèse d'une protéine anormale), dans une famille américaine présentant de nombreux cas de cancers du sein et de l'ovaire, pour laquelle, la technique habituelle de séquençage n'avait trouvé aucune altération.

La recherche d'une prédisposition génétique permet soit de rassurer les sujets non porteurs et leurs descendants, soit d'améliorer le suivi et la prise en charge des sujets porteurs.

III.B.2 Cancers sporadiques

Les carcinogènes environnementaux peuvent donner naissance, lors des réactions de métabolisation qui visent à les rendre éliminables par l'organisme, à des métabolites plus réactifs (plus carcinogènes) que le produit initial. Ces réactions sont sous la dépendance d'enzymes dont le niveau d'activité est génétiquement déterminé. On a pu associer, pour plusieurs des enzymes impliquées dans ces phénomènes, un polymorphisme génétique (par technique des RFLP) à un niveau d'activité enzymatique. On sait ainsi que pour les cancers coliques, à régime alimentaire identique, être acétyleur lent pour l'activité de la N-Acétyl transférase (qui acétyle les amines hétérocycliques les rendant alors mutagènes) augmente considérablement le risque de développer un cancer colique. Concernant le cancer bronchique, des allèles (détectés par RFLP) d'enzymes liées aux cytochromes P450 de la glutathione transférase (allèles correspondant à un niveau d'activité de ces enzymes également impliquées dans la métabolisation des carcinogènes de la fumée du tabac) confèrent, à tabagisme égal, un risque très différent de développer un cancer bronchique. On ne propose pas encore la détermination, sur une simple prise de sang, du statut de ces enzymes afin de savoir si une personne présente un risque de développer un cancer colo-rectal ou un cancer bronchique (si elle est tabagique), mais cela pourrait bientôt se produire [218].

III.C Applications diagnostiques

➤ La majorité des néoplasies pour lesquelles la biologie moléculaire est appliquée au diagnostic est hématologique. On dispose ainsi de translocations chromosomiques parfaitement identifiées sur le plan moléculaire. Les stratégies d'aide diagnostique qu'apporte la biologie moléculaire en complément de l'histologie et de la cytologie sont diverses et

dépendent des types de tumeurs. A titre d'exemple, un test diagnostique réalisé par la technologie PCR, permettant la détection de la translocation spécifique t(9;22) de la leucémie myéloïde chronique (LMC) fusionnant le gène *bcr* au gène *abl*, est disponible dans le commerce.

➤ Une étude récente a mis à jour un nouvel aspect des altérations du gène *TP53* dans le cancer du sein médullaire. Dans ce cancer, faiblement différencié, de haut grade mais paradoxalement de bon pronostic, la fréquence de mutations du gène *TP53* est de 100% [90]. De plus, ce type de tumeur est largement sur-représenté dans les populations présentant une altération du gène *BRCA1* (15 à 20 % contre 1 à 3 % pour la population normale). Selon DE CREMOUX *et al.* [90], la détermination de l'état du gène *TP53* dans la tumeur devrait être incluse dans le diagnostic de ce type de cancer.

➤ Différentes études semblent indiquer que la télomérase, réactivée dans la plupart des cancers (du sein, de la thyroïde, des poumons, de la vessie, de la prostate, du colon, de l'estomac et du pancréas), pourrait être un remarquable marqueur biochimique du cancer [189, 262]. Les tumeurs ont, en général, des niveaux d'expression différents par rapport aux tissus normaux. Ainsi, la télomérase est active dans 95% des tumeurs du sein et n'est pas retrouvée dans les tissus mammaires normaux [60]. De plus dans ce type de tumeur, l'activité de la télomérase est corrélée au caractère malin [60, 430]. La recherche des niveaux de la sous-unité protéique *hTERT*, présente uniquement dans les cellules cancéreuses, représente une alternative pour la détection de la télomérase.

La détection de la télomérase peut être réalisée dans des échantillons de tissus prélevés grâce à des techniques moins invasives (salive, urine, ponction à l'aiguille fine) ou même dans des spécimens d'épanchements ou liquides de rinçage obtenus chez des patients chez qui une tumeur est suspectée [232]. Ainsi, dans une étude, la quantification de l'activité de la télomérase dans un échantillon de tumeur du sein prélevé par à une aspiration à l'aiguille fine, permet de détecter 72 % des cancers invasifs, alors que les résultats s'avèrent négatifs lors de maladie fibrokystique ou de prélèvements sur des tissus mammaires normaux [430]. Cependant, l'inconvénient de ces techniques moins invasives est que des éléments biologiques (par exemple des cellules inflammatoires télomérase-positives) peuvent diminuer l'exactitude de ces tests [232].

III.D Applications au dépistage

L'amélioration du dépistage grâce à la détection précoce d'une tumeur (c'est à dire l'identification, par un test de réalisation facile et peu coûteuse, de sujets atteints d'une affection donnée et qui sont apparemment en bonne santé), reste un enjeu prioritaire. Quelle que soit la localisation tumorale considérée, plus une tumeur est traitée à un stade précoce, meilleurs sont les résultats.

➤ Plusieurs équipes ont recherché, dans divers milieux extracorporels, des modifications dans l'ADN de cellules provenant de tumeurs. La possibilité d'identifier des cellules cancéreuses à partir de différents échantillons a été démontrée en 1991. En effet, SIDRANSKY *et al.* [409] ont remarqué que les mutations du gène *TP53* observées dans les cellules de l'urine de patients atteints de cancers de la vessie étaient les mêmes que celles observées dans la tumeur primaire. Depuis, d'autres études ont utilisé les altérations génétiques pour identifier des cellules tumorales dans des échantillons cliniques (dans les selles de patients souffrant de cancers colorectaux ou encore dans la bile ou le suc pancréatique de malades atteints de carcinome du pancréas [339]). La sensibilité des techniques de biologie moléculaire évolue afin de permettre un diagnostic à partir d'un prélèvement ne contenant qu'un très faible contingent de lésions tumorales.

Dans le cas du diagnostic du cancer du sein, il semblerait que la mammographie rencontre des limites. De nouvelles méthodes de détection précoce sont donc étudiées, comme par exemple :

- Mise en évidence de la présence de cellules tumorales disséminées dans le sang circulant par la recherche des microsatellites modifiés ou des mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53* [10].
- Mise en évidence, par PCR, sur le produit de lavage des galactophores, de l'hyperméthylation de séquences promotrices de trois gènes (cycline D2, RAR- β et Twist) les rendant inactifs [460].
- Recherche de la protéine TP53 dans la salive de femmes atteintes du cancer du sein [428].
- Etude de l'expression des protéines erbB-2 et TP53 par immunohistochimie [443], et de l'expression du gène *TP53* par PCR suite à une aspiration à l'aiguille fine de cancer du sein [169].

Des publications récentes témoignent du potentiel de l'analyse du profil d'expression des tumeurs, grâce aux puces à ADN, dans le domaine du dépistage.

Une équipe a comparé les profils d'expression de près de 5400 gènes dans les tumeurs du sein sporadiques et les tumeurs familiales avec mutations soit de *BRCA1*, soit de *BRCA2*, dans le but d'évaluer la capacité de ces profils à identifier de nouveaux cas de cancer du sein héréditaires indépendamment de la recherche de mutations [160]. Cette étude a permis de mettre en évidence des profils différents selon les deux types de tumeurs. Les auteurs ont identifié 51 gènes discriminatifs dont les niveaux d'expression peuvent être utilisés pour prédire l'appartenance des tumeurs à tel ou tel type.

L'approche des puces à ADN a également été utilisée par MARTIN et al. [245] pour comparer les profils d'expression d'environ 200 gènes sélectionnés dans des échantillons sanguins provenant de patientes atteintes de cancer du sein et de sujets volontaires sains. La classification des échantillons en fonction des niveaux d'expression des 12 gènes dont l'expression était plus élevée dans les cellules du sang circulant, était en accord avec le statut, malade ou sain, des donneurs de sang.

➤ La détection de l'instabilité génétique, qui est une des propriétés intrinsèques des cellules cancéreuses, est une analyse plus directe que l'analyse des mutations des gènes. Il a été suggéré que les altérations des microsatellites (présentes dans la plupart des tumeurs humaines) puissent être très utiles pour détecter les cellules cancéreuses [242]. En effet, il semblerait que l'instabilité des microsatellites représente un événement précoce dans la genèse de certains cancers sporadiques du sein [467].

III.E Applications pour le suivi clinique et le pronostic

➤ Dans ce domaine également, les techniques de biologie moléculaire offrent des perspectives très intéressantes. Il est, par exemple, établi que certaines altérations moléculaires sont associées à un mauvais jugement sur l'évolution des tumeurs au sein desquelles elles apparaissent. C'est le cas de l'amplification de certains oncogènes ou de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Les exemples les mieux connus sont la valeur pronostique négative de l'amplification des oncogènes *c-erbB-2* pour les adénocarcinomes mammaires et *N-myc* pour les neuroblastomes et les cancers bronchiques à petites cellules ainsi que des mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53* pour les cancers du sein [171] et de la délétion de l'anti-oncogène *DCC* dans les cancers colo-rectaux [339].

C'est en 1987 que le premier exemple d'une valeur pronostique d'un marqueur moléculaire a été évoqué [410]. L'amplification du gène *c-erbB-2* et/ou la sur-expression du produit du gène sont fréquemment observées dans un grand nombre de tumeurs du sein ayant un pronostic sombre [410]. L'oncoprotéine *c-erbB-2* est présente dans un tiers des cancers du sein étudiés et inversement corrélée à la survie globale [410]. De plus, 75% des cancers du sein avec envahissement ganglionnaire montrent une surexpression de *c-erbB-2* [40]. Actuellement, la valeur pronostique de l'amplification *c-erbB-2* semble bien établie pour les patientes avec envahissement ganglionnaire [40], alors qu'une controverse persiste pour celles sans adénopathie. Si la détection de la protéine *c-erbB-2* est possible dans des lésions bénignes du sein, elle n'apparaît pas, au contraire de la *TP53*, être associée à une augmentation du risque d'évolution vers le cancer du sein [360]. Récemment STARK *et al.* [425] ont démontré une augmentation du risque de cancer du sein chez les patientes présentant des lésions prolifératives avec ou sans atypie, chez qui l'oncogène *c-erbB-2* était amplifié.

L'existence d'une anomalie de *TP53* est toujours un facteur de mauvais pronostic [23, 112, 171, 400]. Les mutations de *TP53* sont corrélées à l'agressivité des tumeurs dans les cancers de l'encéphale, du sein, de la tête et du cou, des ovaires, de l'estomac et les cancers invasifs de la vessie.

Elles sont également corrélées avec une moins bonne durée de survie chez les patients atteints de divers types de cancers. Il est ainsi établi que les mutations du gène *TP53* dans les carcinomes du sein représentent un marqueur indépendant de la rechute précoce et du décès [112, 171, 400]. Ces études ont montré un risque 2 à 3 fois plus élevé de mort due au cancer du sein chez les patients ayant une mutation du gène *TP53* [171, 400]. Le pronostic sombre associé aux mutations de *TP53* dans le cancer du sein concerne les tumeurs avec ou sans atteinte des nœuds lymphatiques [324]. De plus, des études récentes révèlent qu'il existe des différences de pronostic selon la localisation de la mutation. Ainsi, les mutations situées à l'intérieur de l'exon 4 sont d'un sombre pronostic, alors que les mutations à l'intérieur des exons 6, 7 ou des codons « hotspot » 175, 245, 248 et 273 sont associées à une faible réduction de la survie. Les patients ayant des mutations du gène situées sur le domaine de liaison à l'ADN, ont le même pronostic que les patientes ayant le gène sauvage [345]. Il existerait ainsi une hétérogénéité au niveau des propriétés des *TP53* mutantes qui pourrait être liée à une variabilité dans le pronostic associé à ces mutations dans un cancer donné [421].

De nombreuses études ont également mis en évidence la valeur pronostique de la cadhérine E dans les tumeurs du sein. Ainsi, une analyse multifactorielle a montré que la perte de la fonction de la molécule d'adhésion cellulaire est de façon significative un facteur indépendant de sombre pronostic, en particulier chez les sujets avec envahissement ganglionnaire [11].

On a remarqué, chez des patients atteints de cancers coliques, des ganglions mésentériques normaux histologiquement mais dans lesquels il était possible de détecter par PCR la présence de mutations des gènes *K-ras* ou *APC* identiques à celles de la tumeur colique, démontrant ainsi l'existence de façon sub-microscopique de cellules tumorales. Ces cancers ont, à autres facteurs pronostics identiques, un bien moins bon pronostic que ceux dont l'examen moléculaire des ganglions est négatif. Cela suggère que les patients chez qui est faite cette constatation pourraient bénéficier, comme ceux à ganglions histologiquement envahis, d'une chimiothérapie adjuvante [218].

L'utilisation des puces à ADN pourrait également fournir un outil appréciable dans le domaine du pronostic. Un exemple est fourni par une étude française qui a permis d'identifier, dans un groupe apparemment homogène de tumeurs de mauvais pronostic et ayant subi un traitement similaire, deux sous-groupes présentant une évolution significativement différente en terme de survie sans métastase et de survie globale, en mesurant le niveau d'expression de 200 gènes dans une série de 34 cancers du sein [26]. Parmi les gènes discriminants figuraient des acteurs connus de la cancérogenèse mammaire comme *c-erbB-2* et *myc*, surexprimés dans le groupe de mauvais pronostic ou *CDH1* surexprimé dans le groupe de bon pronostic. La diffusion de cette technologie dans les laboratoires de recherche ou de diagnostic est actuellement limitée par le coût de l'équipement nécessaire.

➤ Le rôle de la télomérase en tant que marqueur pronostique n'est pas complètement défini. Normalement l'activation de la télomérase est précoce dans de nombreux cancers (vessie, cerveau, sein et prostate parmi d'autres). Cette enzyme pourrait, par conséquent, émerger comme un marqueur utile pour distinguer les lésions pré-cancéreuses susceptibles d'évoluer vers une malignité, de celles qui ne seront pas le siège d'une transformation maligne [232].

De plus, la télomérase pourrait avoir un rôle dans le suivi de l'évolution de la maladie une fois le diagnostic réalisé. Il est toutefois établi que l'identification de la télomérase est, à elle seule, insuffisante pour prévoir l'évolution de l'affection maligne, les résultats des différentes études concernant la corrélation entre le niveau de l'activité de la télomérase et l'évolution clinique d'un certain nombre de tumeurs étant souvent contradictoires [232].

III.F Applications thérapeutiques

III.F.1 Facteurs prédictifs de réponse thérapeutique

La chimiorésistance constitue un obstacle majeur à la thérapie anti-cancéreuse. L'amélioration du traitement passe donc obligatoirement par la compréhension des bases moléculaires des phénomènes de résistance afin de limiter l'échappement thérapeutique aux médicaments anti-cancéreux. L'analyse de l'état transcriptionnel de cellules sous l'influence de médicaments anti-tumoraux devrait conduire à l'identification de gènes associés à un phénotype résistant ou sensible. A terme, les applications cliniques seront la détermination de facteurs prédictifs de réponse au traitement (mise en œuvre d'un diagnostic des résistances) et l'orientation vers des stratégies thérapeutiques plus efficaces (contournement et/ou blocage des résistances par ciblage des produits des gènes responsables de la résistance).

Par exemple, le statut de *TP53* pourrait jouer un rôle important dans l'efficacité de la thérapie anti-cancéreuse. Il a été rapporté que 50% des patients atteints de cancer du sein n'ayant pas bénéficié de chimiothérapie, et qui ont un gène *TP53* muté, sont décédés dans les 5 ans après la chirurgie alors que seulement 9% des patients porteurs du gène sauvage sont décédés [112]. Ces résultats suggèrent que les patients ayant des tumeurs du sein qui montrent des mutations de *TP53* doivent bénéficier d'un traitement plus intensif. Globalement il semblerait que les mutations *TP53* sont globalement associées à une moins bonne chimio et radio-sensibilité. Il a d'ailleurs été démontré que des cellules en culture dépourvues de *TP53* étaient résistantes à la radiothérapie et à la chimiothérapie, alors que les mêmes cellules homozygotes pour l'allèle *TP53* sauvage entrent en apoptose suite à ces traitements. Toutefois, certaines études montrent que l'inactivation ou la mutation de *TP53* peuvent rendre les cellules plus sensibles aux agents cytotoxiques dont le mécanisme d'action est basé sur l'altération de l'ADN [455].

Les études concernant l'influence des mutations de *TP53* sur la réponse au traitement donnent donc des résultats contradictoires. Ainsi, les mutations de *TP53* semblent liées à de nombreuses résistances aux traitements [106], en particulier à la résistance à la doxorubicine. De même, le traitement adjuvant utilisant le Tamoxifen (anti-œstrogène non stéroïdien qui agit en concurrençant la liaison de l'œstrogène avec son récepteur au niveau des cellules tumorales) associé à la radiothérapie serait de valeur moindre pour les tumeurs ayant des mutations *TP53* [23]. A l'opposé, la radiothérapie locale ou régionale, pour des patientes atteintes de tumeurs qui n'impliquent pas les nœuds lymphatiques, améliore la survie seulement chez les patientes qui ont des tumeurs avec des mutations du gène *TP53* [180].

De même, la connaissance d'une altération du gène *TP53* dans une tumeur donnée, peut servir de "sonde" pouvant renseigner sur la totale disparition de la tumeur après traitement, et son éventuelle réapparition lors d'une rechute. Les anticorps sériques anti-*TP53* peuvent ainsi être un bon indicateur lors du suivi d'un patient suite à une thérapie anticancéreuse. Il existe en effet une bonne corrélation entre l'évolution du titre d'anticorps et la réponse à la thérapeutique dans les cancers du poumon, des ovaires et les cancers colo-rectaux [417]. La détection d'anticorps sériques peut même être un indicateur précoce de récidive, comme cela a été montré pour le cancer du sein. On a montré qu'il était possible de détecter la réapparition des anticorps deux ans après le traitement initial et que cette réapparition précédait de 3 mois la détection clinique de la récidive [417].

Il est également prouvé que l'analyse de l'expression de c-*erbB-2* pourrait être un élément utile pour l'estimation de la réponse au traitement. Ainsi, l'expression de cette oncoprotéine semble corrélée à une réponse positive aux anthracyclines à hautes doses chez les patientes présentant des adénopathies métastatiques. De plus, lorsque cette oncoprotéine est exprimée, des résultats thérapeutiques encourageants ont été obtenus en terme de survie grâce au trastuzumab (anticorps monoclonal se liant sélectivement à l'oncoprotéine c-*erbB-2*) [411].

III.F.2 Nouvelles formes de thérapies

Les travaux réalisés au cours des dernières décennies, qui ont abouti à une meilleure compréhension de la génétique du cancer et de la description des événements moléculaires

associés à la progression tumorale, ont ouvert la voie à de nouvelles approches thérapeutiques très prometteuses pour le traitement des cancers humains [178, 206, 215, 219, 489].

III.F.2.a La thérapie génique

La thérapie génique consiste en l'introduction dans une cellule d'une séquence d'information génétique (ADN ou ARN) permettant au sein de cette cellule, soit la synthèse d'une protéine, soit une modification spécifique de l'expression du programme génétique de cette cellule.

- Correction d'une fonction aberrante d'un gène.

La correction d'une altération génique spécifique d'une tumeur constitue à priori l'abord le plus logique. Il s'agit là de la forme la plus pure de traitement du cancer compris comme une maladie du génome puisqu'on agit sur les éléments responsables des caractéristiques transformées de la cellule.

De nombreuses stratégies visent à restaurer, dans les cellules cancéreuses, l'activité d'un gène suppresseur de tumeur muté, grâce à l'introduction d'une version normale de ce gène à l'aide d'un vecteur viral (adéno ou rétrovirus). Parce qu'il est celui dont la fonction est la plus fréquemment perdue dans les cancers humains, le gène suppresseur *TP53* a fait l'objet des premiers travaux. Plusieurs essais de thérapie génique anti-*TP53* ont été publiés au cours des trois dernières années, tant dans le cancer bronchique que dans le cancer ORL [489]. L'introduction de la protéine sauvage *TP53* par ce type de méthode n'a pas d'effet délétère sur les cellules normales mais induit une apoptose des cellules n'ayant plus de protéine sauvage. Des essais cliniques de thérapie génique, avec le gène *TP53*, sont actuellement conduits sur des cancers aussi variés que le cancer du poumon, du sein, de l'ovaire, de la prostate, du cerveau, mais ils en sont encore à des phases précoces. La fonction de tous les gènes suppresseurs (*RB1*, *PTEN*, *DCC*, *APC* etc.) peut aussi être théoriquement restaurée [178].

Le transfert génique peut également s'opposer à l'action d'un oncogène muté. On utilise la stratégie anti-sens : de courtes séquences oligonucléotidiques bloquant spécifiquement l'expression de l'oncogène activé (soit au niveau transcriptionnel, soit au niveau traductionnel), sont exprimées dans la cellule cible transfectée par un vecteur rétroviral

contenant la séquence anti-sens. L'oncogène *ras* très fréquemment muté dans les cancers humains et particulièrement dans les cancers bronchiques, a été choisi comme cible pour les premiers essais thérapeutiques. Plusieurs essais se développent actuellement dans le monde et concernent les cancers du sein, du poumon, du colon et certaines leucémies.

- Stimulation de la réponse immunitaire anti-cancer

Le but est d'augmenter la réponse immunitaire naturelle contre les cellules tumorales, soit en augmentant l'action des effecteurs immunitaires (principalement les lymphocytes T cytotoxiques), soit en modifiant les cellules tumorales de manière à les rendre plus immunogènes. Plusieurs approches utilisant la thérapie génique sont testées actuellement pour restaurer ou augmenter une réponse immunitaire anti-tumorale ("vaccins" anti-tumeur), comme par exemple :

- Expression dans les cellules tumorales de gènes codant pour des cytokines immunorégulatrices. On a déjà pu démontrer dans des modèles animaux, que la transfection des cellules tumorales par les gènes des interleukines diminuait le potentiel de croissance voire entraînait l'élimination de ces cellules transfectées, et que cet effet était effectivement médié par un mécanisme immunologique [362].
- Transfert dans les cellules tumorales de nouveaux déterminants antigéniques permettant leur reconnaissance et leur destruction par le système immunitaire.
- Augmentation de l'efficacité cytotoxique des lymphocytes anti-tumoraux.

- Introduction dans les cellules cancéreuses d'un "gène suicide"

La méthode consiste à introduire, au niveau de la cellule tumorale, un gène suicide dont l'expression, mise en présence de certains médicaments, devient fatale à toute cellule. Une des possibilités offerte par la thérapie génique est l'activation spécifique d'une pro-drogue non-toxique en drogue cytotoxique exclusivement à l'intérieur des cellules tumorales. Pour cela le principe est de transférer *in vivo* dans les cellules tumorales, un gène codant pour une enzyme qui est normalement absente du patrimoine des cellules humaines. Cette enzyme a la capacité de transformer un produit non toxique en un métabolite toxique pour la cellule dans laquelle il sera produit. Le système le plus au point est celui utilisant comme enzyme la thymidine kinase du virus herpès simplex (TK) et comme pro-drogue le ganciclovir. Celui-ci sera transformé en ganciclovir tri-phosphate, actif seulement dans les cellules ayant été

transfектée par le gène de la TK, aboutissant ainsi à leur mort. D'autres couples enzymes- prodrogues activables sont développés (cytosine deaminase bactérienne et 5-fluorocytosine).

- Protection des tissus sains

Rendre les cellules normales insensibles à la chimiothérapie permettrait d'utiliser au maximum cette dernière (doses ou rythmes d'administration). La cible de la thérapie génique est alors le tissu que l'on souhaite protéger (pour l'instant seul le tissu hématopoïétique est concerné). La technique consiste à extraire de l'organisme des cellules souche de la moelle osseuse ou du sang circulant, à les cultiver *in vitro*, à les traiter pour y introduire un gène de résistance (par exemple le gène *MDR1* codant pour la P-glycoprotéine) aux agents utilisés en chimiothérapie, puis à les réinjecter au patient. On peut ainsi augmenter les doses de chimiothérapie sans aboutir à une toxicité hématologique.

- Lutte contre l'angiogenèse

La capacité pour une tumeur cancéreuse de grossir et de métastaser est étroitement liée à la prolifération des nouveaux vaisseaux sanguins qu'elle induit. Ce phénomène, appelé angiogenèse, permet la transformation d'un petit amas de cellules anormales en une grosse masse pouvant se disséminer dans tout l'organisme. L'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans les processus d'angiogenèse a permis l'émergence de nouveaux 12 0 0 12 310

III.F.2.b Inhibition des voies de signalisation intracellulaire

Une dissection de plus en plus précise des voies de signalisation dérégulées dans le processus de carcinogenèse a permis la découverte de médicaments ayant une action véritablement moléculaire sur les tumeurs. De nombreuses molécules ciblées pour inhiber spécifiquement telle ou telle signalisation voient le jour [206, 215, 489] :

- Inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase des récepteurs de facteurs de croissance oncogéniques

Le trastuzamab (Herceptine®) est un anticorps monoclonal qui se lie sélectivement à l'oncoprotéine erbB-2. Ce produit a été validé dans des essais, dans le cancer métastatique du sein, seul ou en association avec la chimiothérapie, chez des patientes surexprimant *c-erbB-2* [404, 411]. D'autres inhibiteurs de tyrosines kinases membranaires sont aussi en développement, comme par exemple un inhibiteur du récepteur à l'EGF (l'Iressa) dans les cancers du poumon "non à petites cellules", ou de la tyrosine kinase Abl (Le Glivec® ou STI571) dans la leucémie myéloïde chronique et les tumeurs gastro-intestinales.

- Inhibiteurs de farnésylation des protéines Ras

Des inhibiteurs de la farnésyl-transferase (FTI) ont été recherchés pour inhiber la farnésylation de la protéine K-ras (nécessaire pour son activation), empêcher sa localisation membranaire et, par voie de conséquence, bloquer la transmission des signaux mitogènes et la croissance tumorale.

- Inhibiteurs des enzymes répresseurs de la machinerie transcriptionnelle

Le mécanisme général de la transcription génique dépend en partie de l'état d'acétylation des protéines histones. Les histone acétylases permettent l'accès à l'ADN de la machinerie transcriptionnelle en participant à l'ouverture de la chromatine, tandis que les histones déacétylases (HDAC) sont des répresseurs. Les inhibiteurs de HDAC ont été récemment décrits comme induisant la disparition de plusieurs molécules oncogéniques. Début 2001, le depsipeptide, composé cyclique retrouvé dans les cyanobactéries ou les

éponges marines, a laissé entrevoir des capacités cytotoxiques sur les cellules tumorales (il éliminerait la forme mutée de TP53 et non la forme native).

III.F.2.c Inhibition de la télomérase

La télomérase représente une cible logique pour le développement d'agents thérapeutiques nouveaux, puisque son activité est élevée dans la majorité des cancers et absente dans les tissus normaux. La logique d'une inhibition de la télomérase est fondée sur le fait que les cellules cancéreuses ne pourront pas empêcher l'érosion des télomères à chaque division cellulaire si l'enzyme qui les protège est inhibée, et qu'elles atteindront à la longue un stade de sénescence et mourront [149].

Dans plusieurs études effectuées chez l'Homme, les tentatives ont porté sur l'inhibition du composant ARN ou du composant transcriptase inverse du complexe enzymatique. La séquence des nucléotides du composant ARN est très riche en motifs GC et est donc vulnérable à des composés qui peuvent produire une alkylation de la guanine, comme par exemple le cisplatine. On a d'ailleurs démontré que ce composé inhibe la télomérase dans des lignées cancéreuses testiculaires [58]. Cependant le cisplatine entraîne de nombreux effets toxiques. Une approche plus prometteuse (tout au moins sur des cellules en culture) est l'inhibition du composant ARN au moyen des technologies anti-sens [342]. L'utilisation d'un antisens, dirigé contre l'ARN de l'enzyme (oligonucléotide qui, en raison de sa séquence, se lie au composant ARN de la télomérase et provoque ainsi son inhibition), a en effet permis de montrer que dans des lignées de tumeurs humaines, il est possible de bloquer l'

trans-rétinoïque, prostaglandine A1) induiraient, selon les conditions, différents types de réponse : apoptose, sénescence ou différenciation [178].

L'inhibition de la télomérase représente une approche du traitement des cancers entièrement nouvelle. Néanmoins, le succès de ce type de stratégie dépend essentiellement de l'abolition complète de l'activité télomérase dans les cellules cancéreuses, sans effets indésirables dans les tissus normaux. De plus, quelques rares tumeurs sont dépourvues d'une activité télomérasique mais sont immortelles. On ne sait pas si les inhibiteurs de la télomérase auraient un effet sur les cellules cancéreuses qui stabilisent leurs télomères sans réactivation de la télomérase (grâce au mécanisme ALT pour *Alternative Lengthening of Telomeres*). Un autre problème relève du niveau d'expression de la télomérase dans certaines tissus normaux, par exemple dans les cellules souches.

Ces exemples d'application des techniques de biologie moléculaire aux différents domaines de la cancérologie clinique chez l'Homme, même s'ils ne sont pas encore de pratique routinière, vont avoir une importance médicale et économique dans les années à venir.

Si la thérapie génique a déjà ses applications cliniques (maladies héréditaires), le traitement des cancers utilisant le transfert de séquences nucléotidiques en est encore au stade de l'évaluation et loin de toute application clinique courante. Les données actuelles ne permettent pour l'instant de concevoir cette approche que comme un traitement complémentaire aux traitements classiques (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie). Les biothérapies qui agissent par des mécanismes d'action assez spécifiques de cibles thérapeutiques clairement identifiées, représentent70..23861nir8.1ren

IV. PERSPECTIVES D'APPLICATIONS PRATIQUES DE LA GENETIQUE MOLECULAIRE AUX TUMEURS MAMMAIRES DE LA CHIENNE

Nous avons vu que des études relativement récentes tentent de comprendre les événements moléculaires associés au développement des tumeurs mammaires de la chienne. Ces connaissances devraient idéalement déboucher sur des applications pratiques.

IV.A Vers une utilisation de nouvelles techniques diagnostiques des tumeurs mammaires de la chienne ...

Les tumeurs mammaires, directement visibles et palpables, sont de suspicion facile [77]. La présence d'un nodule à l'intérieur du tissu mammaire est le plus souvent détectée lors de l'examen clinique de l'animal. Cette première étape est indispensable pour le diagnostic de ce type de tumeur et permet de déterminer l'aspect macroscopique de la tumeur (taille, nombre de nodules, présence d'ulcération et d'adhérence) et sa localisation (mamelles antérieures ou postérieures, tumeurs uni- ou bilatérales). La région ganglionnaire qui draine la ou les mamelles tumorales est étudiée lors du bilan d'extension régional. Le bilan d'extension général avec radiographie pulmonaire est un élément incontournable du diagnostic clinique [202].

Dans la plupart des cas, des examens complémentaires sont indispensables afin de préciser l'origine tissulaire de la tumeur (certaines tumeurs cutanées peuvent évoluer en région mammaire et prêter confusion avec une véritable tumeur de la mamelle), le type et le grade histologique, la nature bénigne ou maligne du processus ainsi que son comportement local. Actuellement, l'examen histopathologique conventionnel de sections tissulaires de tumeurs, après fixation au formol, inclusion en paraffine et coloration, reste la méthode diagnostique des tumeurs mammaires de la chienne la plus fiable, à condition que toutes les lésions enlevées lors de la chirurgie soient soumises à analyse [279].

Cependant, cet examen microscopique seul est parfois insuffisant pour permettre la classification de ces tumeurs et la détermination de leur comportement biologique [277, 279]. On estime, en effet, que le diagnostic des tumeurs malignes et bénignes pose un problème pour environ 10% des tumeurs mammaires chez le Chien [153, 279]. Ainsi, certaines tumeurs bénignes peuvent montrer un comportement biologique de tumeurs malignes et l'analyse

histologique de certains sarcomes ou carcinomes ne permet pas toujours de les différencier des tumeurs bénignes [153, 278]. Par exemple les adénocarcinomes papillaires kystiques, qui ont un aspect microscopique bénin, envahissent habituellement après un certain temps, les nœuds lymphatiques régionaux [153, 277]. Il en est de même pour un petit nombre de tumeurs composées de structures apparemment bénignes ou mixtes qui métastasent de façon inattendue [153, 278]. De plus, de nombreuses tumeurs mammaires ne sont pas à un stade avancé de leur développement lors du premier examen et les petites tumeurs ont parfois des caractéristiques cliniques difficiles à interpréter.

En 1993, dans un article de MAYR *et al.* [254], on pouvait lire que les techniques cytogénétiques pourraient contribuer à une future classification des tumeurs mammaires de la chienne. Néanmoins, les différentes études cytogénétiques des tumeurs mammaires de la chienne montrent que ces anomalies sont trop variées dans leur localisation et leur nature pour pouvoir être systématisées. De plus, ces anomalies ne sont pas constantes et ne permettent pas de différencier les tumeurs bénignes des tumeurs malignes, ni les différents types histologiques.

De même, les mutations des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes observées jusqu'à maintenant dans des tumeurs mammaires canines, sont hétérogènes et ne permettent pas de distinguer les tumeurs bénignes et malignes. Aussi, l'utilisation à des fins diagnostiques de l'analyse des mutations génomiques ne semble pas appropriée [306].

Il est également peu probable que la détection de l'activité de la télomérase seule puisse avoir une fonction diagnostique importante étant donné que des niveaux élevés d'activité télomérase sont parfois détectés dans des tumeurs bénignes alors que des niveaux très faibles sont retrouvés dans certains adénocarcinomes [487].

La détection précoce d'une maladie est également indispensable en médecine vétérinaire. Dans le domaine des maladies génétiques, des tests basés sur l'utilisation de la PCR ont été développés par une dizaine de laboratoires dans le monde [9]. Ces tests sont directement fondés sur la détection de l'altération d'un gène, précédemment identifiée dans l'entité pathologique recherchée.

Dans l'espèce humaine, un des buts ultimes des recherches concernant la prédisposition familiale aux tumeurs est de déterminer la validité de tests génétiques spécifiques permettant un diagnostic de présomption de prédisposition génétique au cancer.

Nous avons vu que la notion de "familles à risque" pour les tumeurs mammaires de la chienne reste à établir. Le dépistage de tumeurs mammaires qui ne sont pas encore palpables, par un examen radiographique est difficilement envisageable en médecine vétérinaire (coût et aspects techniques). Néanmoins, s'il apparaît qu'une chienne appartient à une famille ou une race présentant de nombreux cas de tumeurs mammaires, l'intérêt de la détection par test moléculaire d'une anomalie génétique spécifique semble limité, la stérilisation précoce des chiennes et/ou la mammectomie bilatérale (décidées après consentement éclairé du propriétaire) pouvant représenter des mesures de prévention efficaces.

La mise en place de consultations génétiques permettant un diagnostic de présomption de prédisposition génétique aux tumeurs mammaires de la chienne ne semble donc pas une priorité.

IV.B ... ou de nouveaux facteurs pronostiques des tumeurs mammaires de la chienne ?

De nombreuses études ont évalué chez la chienne atteinte de tumeurs mammaires, la valeur pronostique de différents paramètres clinico-pathologiques (tableau 42). Les facteurs cliniques tiennent compte de la taille de la tumeur et de l'extension de la maladie cancéreuse (envahissement ganglionnaire) mais aussi du mode et de la rapidité de la croissance tumorale. La classification des tumeurs mammaires de la chienne proposée par le Groupe d'Etude des Tumeurs Animales réuni sous l'égide de l'OMS en 1974, fut à la base d'un grand nombre d'études de survie qui ont permis de classer les différents types histologiques par ordre de malignité croissante. La dernière version de la classification de l'OMS s'inspire des études de pronostic en reclassant les différentes catégories de tumeurs selon un potentiel malin accru [279]. Cependant, peu d'analyses multifactorielles ont été réalisées afin de déterminer si les paramètres corrélés au pronostic lors d'analyses unifactorielles, ont une valeur pronostique indépendante. En se basant sur ces différentes analyses, il est possible de dresser un tableau de ces paramètres selon leur valeur pronostique (tableau 43).

Malgré tout, le comportement biologique des tumeurs mammaires reste difficile à prévoir. La recherche de facteurs de pronostic objectifs complémentaires doit être explorée dans des études multifactorielles afin d'identifier les patients à haut risque de récidive [279, 295].

Tableau 42. Eléments du pronostic des tumeurs mammaires malignes de la chienne selon différentes études statistiques.

Eléments de pronostic	Auteurs et types d'études										
	41	107	162	162	279	279	329	389	407	407	486
	X	X	X	XX	X	XX	X	X	X	XX	X
Age			+	+	-			+			
Localisation de la tumeur		-	-	-	-	-	+				
Taille	+	-	-	-	+	+	+				+
Type histologique	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+	+/-
Infiltration des tissus mous, de la peau	+	+	+	-	+	+	+		+	-	+
Invasion vasculaire				-	-	+	+				
Grade histologique de malignité					+	+/-	+		+	+	
Atteinte des nœuds lymphatiques			+	-	-	-	+	-			+
Récidive locale									+	+	
Métastases à distance											+

X : étude unifactorielle

XX : étude multifactorielle

Valeur pronostique notée + (bon pronostic) ou - (pronostic sombre).

- Une taille importante de la tumeur maligne, une croissance rapide et infiltrante, ainsi que la présence de métastases ganglionnaires régionales sont des paramètres cliniques associés à un pronostic sombre dans de nombreuses études.
- L'inflammation associée au développement tumoral, l'ulcération du revêtement cutané (carcinose cutanée) et l'adhérence aux tissus voisins sont des éléments également considérés comme d'un mauvais pronostic.
- L'examen histologique d'une tumeur maligne fournit des indications pronostiques fiables et reproductibles, la nature histologique d'un cancer étant un élément important d'appreciation de son pouvoir évolutif (histopronostic).

Tableau 43. Résumé des facteurs classiques du pronostic des tumeurs mammaires de la chienne.

Bon	Sombre	Pas de valeur pronostique
<3 cm Bien délimitée Nœuds lymphatiques (-) Carcinomes bien différenciés tubulaires/papillaires Réaction cellulaire lymphoïde (+)	>3cm Invasive Nœuds lymphatiques (+) Carcinomes faiblement différenciés solides/anaplasiques Sarcomes Réaction cellulaire lymphoïde (-)	Age Race Poids Type de chirurgie Nombre de tumeurs Mamelle concernée

- Les tumeurs mammaires malignes les plus agressives sont représentées par les sarcomes puis par les carcinomes solides et enfin par les adénocarcinomes.
- Parmi les carcinomes, il existe un degré de malignité croissant de l'adénocarcinome papillaire au carcinome anaplasique en passant par l'adénocarcinome tubulaire et trabéculaire.
- Les carcinomes *in situ* sont associés à un meilleur pronostic alors que les carcinomes inflammatoires sont d'un très mauvais pronostic car une récidive est fréquemment observée quelques semaines après la chirurgie.
- La présence d'embols tumoraux vasculaires en situation péri-tumorale aggrave considérablement le pronostic des cancers de grades II et III de la classification de Scarff et Bloom (qui tente de quantifier le degré de malignité de la tumeur en prenant en compte des données liées à l'extension de la tumeur et des critères liés au degré de différenciation nucléaire), puisqu'elle implique le décès de l'animal dans un délai inférieur à 24 mois après la mastectomie [203].
- La réaction cellulaire lymphoïde pourrait représenter une preuve de la réponse immune anti-tumorale. Le taux de récidive dans les deux ans après la chirurgie est de 45% pour les chiens dont les tumeurs présentent une réaction cellulaire lymphoïde, alors qu'il est de 83% pour les chiens dont les tumeurs ne présentent pas de réaction cellulaire lymphoïde [132].

D'autres critères de pronostic des tumeurs mammaires sont à l'étude chez les carnivores domestiques. La plupart des nouveaux facteurs pronostiques est directement liée à la prolifération des cellules tumorales (tableau 44). Globalement les tumeurs aneuploïdes ou celles ayant un Ki-67 élevé, une fraction S-phase élevée ou un nombre de NORs élevé, sont de moins bon pronostic. La présence de récepteurs hormonaux est, par contre, corrélée à des tumeurs mammaires de meilleur pronostic [98].

Il n'existe, pour le moment, aucune étude concernant la valeur pronostique de la télomérase pour les tumeurs dans l'espèce canine. De plus, jusqu'à maintenant, une seule étude a permis d'établir une corrélation entre les mutations génomiques observées chez la chienne et l'évolution clinique des cancers mammaires. Il ressort ainsi d'une analyse statistique (tableau 45), que la présence de mutations du gène *TP53* est significativement associée à une taille de tumeur supérieure à 30 mm mais pas à l'âge, la stérilisation, le stade de la tumeur ou l'analyse histologique (adénocarcinome ou non) [465]. Dans cette étude, 50% des chiens ayant une altération de *TP53* et 14% de ceux qui ont le type sauvage sont décédés dans les 30 mois après la chirurgie, aucun chien n'ayant subi de chimiothérapie, ce qui pourrait correspondre aux résultats obtenus dans l'étude des tumeurs du sein si on considère l'espérance de vie plus courte chez les chiens. Après une période de 30 mois, l'analyse multifactorielle révèle que les mutations du gène *TP53* sont significativement associées à l'augmentation du risque de récidive et de décès des suites du carcinome mammaire. Ainsi, les altérations du gène *TP53* identifient une sous-population de tumeurs plus agressives parmi les carcinomes mammaires du Chien et pourraient contribuer à l'établissement du pronostic des carcinomes mammaires canins, comme c'est le cas pour les tumeurs humaines.

Par contre, la mise en évidence de la sur-expression de la protéine *TP53* (immunohistochimie) dans les tumeurs cancéreuses de chienne n'est associée à aucun des paramètres de pronostic étudiés par WAKUI *et al.* [465] (tableau 46). C'est d'ailleurs également le cas pour les mastocytomes cutanés du Chien [133, 179] et les tumeurs épithéliales colorectales [477].

Selon AHERN *et al.* [2], le niveau d'expression de *c-erbB-2* pourrait être un indicateur de pronostic utile chez les chiennes ayant des tumeurs mammaires puisqu'il existe une association significative entre la surexpression *c-erbB-2* et le caractère malin. Cependant ces

Tableau 44. Les nouveaux facteurs de pronostic.

Bon	Sombre
Ki-67 faible	Ki-67 élevé
Fraction S-phase basse	Fraction S-phase élevée
Diploïdie	Aneuploïdie
AgNOR bas	AgNOR élevé
Présence de récepteurs aux œstrogènes ou aux progestagènes	Absence de récepteurs aux œstrogènes Angiogénèse importante

- La détection par la technique immunohistochimique des protéines présentes dans le noyau des cellules en prolifération (Ki-67 et PCNA), permet d'apprécier le nombre des cellules engagées dans le cycle mitotique et ainsi de quantifier la prolifération cellulaire [334].
- L'antigène nucléaire PCNA (*proliferative cell nuclear antigen*) est une protéine non histone de 36kD, co-facteur de l'ADN polymérase-δ, prenant part à la réplication et à la réparation de l'ADN [46]. Il est synthétisé de la phase G₁ à la phase S de la division cellulaire et sa concentration décroît ensuite lors des phases G₂/M. Il n'est pas exprimé lors de la mitose [222].
- L'antigène Ki-67 est un antigène nucléaire exclusivement exprimé dans les cellules qui sont engagées dans le cycle cellulaire [383]. Les tumeurs ayant un index Ki-67 bas ont un taux significativement plus élevé de survie totale et de rémission sans maladie [334].
- L'activité proliférative des cellules cancéreuses peut également être appréciée par la fraction des cellules en phase de synthèse d'ADN (phase S), à l'aide de la cytométrie de flux ou par analyse d'image et par le décompte des régions organisatrices nucléolaires, les NORs (*nucleolar organizer regions*). Les régions organisatrices nucléolaires occupent des positions bien définies sur les bras courts des chromosomes acrocentriques et contiennent un groupe de protéines colorables par les sels d'argent [344]. Après coloration par les sels d'argent, les AgNORs (*argentophilic NORs*) apparaissent comme de discrets points noirs. Pour leur évaluation, on utilise l'analyse d'image et le décompte direct. Un nombre élevé de NORs est corrélé aux décès liés à la tumeur durant la première année qui suit la chirurgie [43, 94].
- L'aneuploïdie est corrélée au caractère agressif des tumeurs malignes [95]. Les tumeurs aneuploïdes sont de moins bon pronostic que les tumeurs diploïdes [162, 335, 373].
- La valeur pronostique de l'ADN ploïdie, utilisée seule, est limitée. En revanche, l'association de l'ADN ploïdie et du pourcentage de cellules en phase S, parce qu'elle fournit des informations sur la cinétique de croissance tumorale, apporte des éléments objectifs pour l'évaluation de pronostic de certaines tumeurs. Les tumeurs aneuploïdes sont d'autant plus agressives que le pourcentage de cellules en phase S est élevé.
- La densité de néo-vaisseaux présents dans les tumeurs mammaires malignes est corrélée à la présence de métastases (comptage direct après marquage du nombre de micro-vaisseaux de la néovascularisation tumorale) [136].
- A l'opposé, la présence de récepteurs hormonaux est corrélée à un meilleur pronostic [98].

Tableau 45. Mutations du gène TP53 dans les carcinomes mammaires de chiennes et état clinique, d'après WAKUI *et al.* [465].

Etat		Mutations de TP53			χ^2	<i>p</i>
		Négatives	Positives	%		
Age	< 10 >10	21 36	3 9	13 20	0.613	0.434
Stérilisation	Oui Non	48 9	9 3	16 25	0.585	0.444
Taille de la tumeur (mm)	<30 >30	49 8	7 5	13 38	4.950	0.026
Stade de la tumeur	<2 >2	43 14	8 4	16 22	0.396	0.529
Analyse histologique	Adc Non-Adc	51 6	9 3	15 30	1.831	0.176
Expression de TP53 *	<10 >10	40 17	9 3	18 15	0.112	0.738

Adc : Adénocarcinome

Non-Adc : Non adénocarcinome

* : en % de cellules tumorales colorées positivement

Tableau 46. Expression de la protéine TP53 dans les carcinomes mammaires de chiennes et état clinique, d'après WAKUI *et al.* [465].

Etats		Expression de TP53*			χ^2	<i>p</i>
		Négatives	Positives	%		
Age	< 10 >10	15 33	11 10	42 23	2.778	0.956
Stérilisation	Oui Non	41 7	16 5	28 42	0.866	0.352
Taille de la tumeur (mm)	<30 >30	37 11	19 2	34 15	1.714	0.191
Stade de la tumeur	<2 >2	36 12	15 6	29 33	0.097	0.756
Analyse histologique	Adc Non-Adc	41 7	19 2	32 22	0.330	0.566

Adc : Adénocarcinome

Non-Adc : Non adénocarcinome

* : les tumeurs ayant plus de 10% de noyaux colorés sont considérées comme positives

résultats ne sont pas confirmés par l'étude de RUNGSIPIPAT *et al.* [365]. De plus, il n'existe pas d'association entre la surexpression de *c-erbB-2* et la présence d'une invasion locale ou de métastases [2].

Une étude semble indiquer que le degré de malignité des adénocarcinomes mammaires de la chienne serait corrélé à des mutations des gènes des relations intercellulaires, avec la disparition des molécules d'adhésion membranaires correspondantes, les cadhérines [358]. Dans l'espèce humaine, ce type de mutations est d'ailleurs généralement observé dans des cancers en phase évoluée, infiltrants, récidivants et/ou présentant des métastases.

Ces études ouvrent des perspectives intéressantes mais d'autres sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ces résultats, en distinguant, par exemple, l'état clinique du patient (avec ou sans atteinte des nœuds lymphatiques, avec ou sans traitement radio- ou chimiothérapeutique) comme c'est le cas pour les tumeurs du sein. La valeur de nouveaux facteurs de pronostic ne pourra être reconnue que par l'établissement d'observations cliniques nombreuses et rigoureusement conduites. Seules des études multifactorielles permettront de démontrer l'apport des techniques nouvelles dans l'appréciation du pronostic des tumeurs mammaires de la chienne, ainsi que dans l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il n'est pas raisonnable d'adopter pour les tumeurs mammaires de la chienne des facteurs de pronostic établis pour le cancer du sein chez la femme, sans connaître leurs réelles influences dans l'espèce canine.

IV.C Essais de thérapie génique appliquée aux tumeurs chez le Chien

L'exérèse chirurgicale demeure le traitement de choix des tumeurs mammaires, excepté pour les carcinomes anaplasiques à métastases cutanées et les tumeurs mammaires présentant des métastases à distance. Lors d'une intervention précoce et en l'absence de métastases, la chirurgie seule guérit entre 40 et 50% des tumeurs mammaires malignes (absence de récidive et de métastases après un délai de 3 ans) [41, 42, 331]. Cependant, 25% des chiennes opérées de tumeurs mammaires risquent de mourir des suites de leur cancer, le plus souvent dans l'année qui suit la chirurgie [442]. D'après les éléments du pronostic, un grand nombre de cas ne pourra être guéri par la seule chirurgie : la chirurgie précède alors le traitement adjuvant et des thérapies ultérieures devront être mises en place.

La chimiothérapie a pour but, à l'aide d'agents cytotoxiques, de détruire les cellules cancéreuses, en agissant de façon élective sur la multiplication. Elle intervient, dans le cas des tumeurs mammaires, après la chirurgie afin de limiter le risque d'extension métastatique. La chimiothérapie adjuvante est ainsi conseillée lors de tumeur ayant un potentiel métastatique important, prouvé par la présence d'embolisations généralement lymphatiques ou la colonisation du ganglion satellite (carcinomes canalaires infiltrants, carcinomes de grades II avec embols, tous les carcinomes de grade III, tumeurs mixtes et conjonctives [442]).

L'adriamycine (AdriblastineND) est l'agent cytotoxique reconnu actuellement le plus efficace dans le traitement des tumeurs mammaires de la chienne [295, 442]. C'est une anthracycline de la classe des antibiotiques produite par Streptomyces peucetus. Elle est active sur toutes les phases du cycle, en inhibant la synthèse d'ARN et d'ADN. Le protocole consiste en 5 à 6 injections en intra-veineuse stricte d'adriamycine à 3 semaines d'intervalle, à la dose de 30 mg/m² chez le Chien. Elle est le plus souvent utilisée en mono chimiothérapie. Dans le cas de tumeurs conjonctives, l'adriamycine peut être alternée avec le cisplatine (CisplatinND) [202, 442].

Les agents antimitotiques exercent leur cytotoxicité sur toutes les cellules en division, que ce soient les cellules cancéreuses ou les cellules saines des tissus tels que la moelle osseuse, l'épiderme et l'épithélium de la muqueuse intestinale. La toxicité des agents anticancéreux constitue une des limites importantes du traitement (hypoplasie médullaire, cardiotoxicité, néphrotoxicité, etc). De plus, l'influence de la chimiothérapie sur la survie des animaux traités n'est pas encore évaluée avec certitude [202, 295].

Chez les carnivores domestiques, la radiothérapie est rarement utilisée en thérapeutique adjuvante de la chirurgie des tumeurs mammaires. Elle peut cependant avoir un intérêt thérapeutique en post-opératoire, si l'exérèse d'une tumeur mammaire infiltrante et développée n'a pu être complète. En pré-opératoire, elle peut permettre de diminuer la taille d'une tumeur inopérable initialement [442].

L'hormonothérapie anticancéreuse ne peut être envisagée que si l'hormonodépendance de la tumeur est prouvée par l'intermédiaire du dosage des récepteurs œstrogéniques, peu accessible en médecine vétérinaire. L'hormonodépendance des tumeurs mammaires de la chienne a été vérifiée par la mise en évidence, dans environ 50% des tumeurs, de récepteurs à œstrogènes et à progestagènes au sein de celles-ci [234, 268]. Des réponses sous Tamoxifène ont été observées pour 5 chiennes sur 7 présentant une tumeur mammaire inopérable ou

métastatique [191], alors que dans une autre étude, le Tamoxifène n'a pas montré d'activité antitumorale chez 18 chiennes traitées par une mastectomie associée à une stérilisation, suivie de l'hormonothérapie [293]. De plus, dans les deux études, de nombreux effets secondaires étaient associés (œdème vulvaire, écoulement vaginal, incontinence et infection urinaire, pyomètre et signes d'œstrus). C'est pourquoi, même en réservant l'emploi du Tamoxifène aux femelles stérilisées, la fréquence des effets secondaires liés à un effet œstrogénique sur certains sites, risque de limiter son utilisation chez la chienne atteinte de tumeur mammaire, contrairement à la médecine humaine.

La stimulation des défenses naturelles de la chienne atteinte de cancer mammaire a fait l'objet de travaux expérimentaux et d'essais cliniques nombreux (levamisole, BCG, L-MTP-PE (*liposome-encapsulated muramyl tripeptide-phosphatidylethanolamine*)). Pourtant, aucune de ces approches n'a apporté la preuve d'un effet thérapeutique.

Vu l'intérêt en pathologie comparée des tumeurs des carnivores domestiques, différentes voies de recherche du cancer sont expérimentées en vue de leur application dans le traitement des cancers de l'Homme. La thérapie génique a pris un essor important récemment, et des essais cliniques chez les animaux sont en cours.

Le premier exemple de thérapie génique réussie chez le Chien concerne l'hémophilie B. En effet, une équipe a réussi à corriger le phénotype de chiens hémophiles, par thérapie génique. Durant 17 mois, les chiens ont exprimé le facteur de coagulation IX sans effets secondaires gênants [163].

L'immunothérapie génique représente l'approche de thérapie génique la plus étudiée chez les chiens atteints de cancers. A notre connaissance, aucun article concernant un essai de thérapie génique appliquée aux tumeurs mammaires de la chienne, n'a été publié actuellement, mais citons à titre d'exemple quelques résultats déjà obtenus pour d'autres types tumoraux.

Depuis 1996, date de la première étude, cette approche a été appliquée aux mélanomes du Chien, selon différents procédés. Les cellules tumorales transfectées qui expriment l'IL-2 (interleukine 2) facilitent une réponse immunitaire responsable de l'élimination de ces cellules [350]. Dans une étude, un vaccin anti-cancer, préparé à partir de cellules tumorales irradiées transfectée avec une cytokine (hr-GM-CSF pour *human recombinant granulocyte-macrophage*), est administré à des chiens atteints de mélanome [165, 166]. Une autre

approche consiste à transfacter les cellules tumorales avec le gène d'un superantigène en combinaison avec des cytokines (GM-SCF ou IL-2) [101].

L'approche du gène suicide a également été appliquée chez des chiens. Le gène de la thymidine kinase a ainsi été transféré *in vivo*, avec succès, dans les cellules tumorales de l'estomac et des nœuds lymphatiques régionaux de chiens atteints de cancer gastrique traités avec du ganciclovir [247].

L'inhibition de l'angiogenèse par transfection du gène de l'angiostatine intégré dans un adénovirus, dans l'œil de 3 chiens, récemment réalisée par une équipe française, semble fournir une base essentielle de thérapie génique des patients atteints de mélanome de l'uvée (mélanome choroïdien, tumeur de l'œil la plus fréquente et la plus grave chez l'Homme adulte, particulièrement incontrôlable à cause des métastases qu'il induit) [8].

En conclusion, peu de choses sont aujourd'hui connues sur les implications des gènes qui ont fait l'objet d'études concernant les tumeurs mammaires de la chienne et différents facteurs cliniques, comme le diagnostic et le pronostic (délais de rémission, survie). Ces études ouvrent des perspectives intéressantes mais sont trop peu nombreuses pour trouver une application pratique véritable dans le domaine du diagnostic, du pronostic et du traitement même s'il est évident que l'analyse de l'expression génétique des tumeurs mammaires de la chienne permettrait de mieux définir le profil génétique individuel de chaque tumeur et donc d'améliorer le système de classification actuel.

De plus, les analyses génétiques chez le Chien requièrent l'existence de laboratoires chargés de développer et d'utiliser les outils moléculaires déjà élaborés en génétique moléculaire humaine. Elles font appel à des techniques lourdes et entraînent donc un problème de coût et de réalisation en pratique vétérinaire courante. De ce fait, elles sont encore, et peut-être pour un certain nombre d'années, réservées à des études prospectives. Les applications thérapeutiques qui ne semblent pas envisageables à court ou moyen terme chez les animaux domestiques, demeurent cependant très importantes, le Chien représentant un modèle animal de choix pour évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des cancers de l'Homme.

L'approche génétique du cancer du Chien doit profiter de l'expérience acquise en oncologie humaine. Cependant, le manque de standardisation des techniques utilisées et le petit nombre d'études réalisées à ce jour en génétique du cancer chez le Chien, sont à l'origine des difficultés pour interpréter les premiers résultats publiés.

Alors qu'en médecine humaine les premières applications pratiques commencent à voir le jour afin d'améliorer la prise en charge des patients, les répercussions pratiques des connaissances acquises sur la génétique du cancer sont, par contre, encore difficiles à entrevoir pour le vétérinaire et l'animal.

CONCLUSION

Le cancer est une maladie du fonctionnement des cellules qui perdent le contrôle de leur prolifération, échappent à l'apoptose et deviennent immortelles. L'étude des tumeurs spontanées et des prédispositions héréditaires au cancer chez l'Homme, ainsi que de multiples données expérimentales, ont permis de comprendre le cancer comme un mécanisme en plusieurs étapes dont chacune reflète des altérations génétiques aboutissant à la transformation progressive d'une cellule normale en une cellule maligne. La caractérisation d'altérations cytogénétiques récurrentes et spécifiques observées au niveau du caryotype des cellules tumorales, le décryptage du génome humain et le développement des techniques moléculaires ont permis la compréhension des mécanismes fondamentaux de l'oncogenèse chez l'Homme. Il a ainsi été possible de caractériser les fonctions de nombreux gènes de cancer, et de décortiquer les voies de signalisation dans lesquelles ils agissent.

L'analyse simultanée de plusieurs milliers de gènes dans une tumeur devrait permettre (outre une caractérisation de plus en plus précise des mécanismes moléculaires aboutissant au cancer) la définition de sous-classes de pathologies non reconnues par les facteurs cliniques, et l'identification de nouveaux marqueurs de susceptibilité aux cancers ainsi que de nouveaux marqueurs pronostiques ou prédictifs d'une réponse au traitement. La compréhension détaillée, au niveau moléculaire, des voies de transduction ainsi que des mécanismes de surveillance cellulaire, constitue déjà la source du développement de stratégies, chimiques ou géniques, destinées à pallier les défauts fonctionnels de chacun des oncogènes, suppresseurs de tumeurs et autres molécules impliquées dans l'oncogenèse. Il est très probable que ces progrès permettront, dans les années qui viennent, de développer de nouvelles thérapies contre le cancer.

mécanismes d'action des produits de ces gènes sont en partie communs dans les deux espèces. Toutefois, des observations concernant les altérations de la cycline A et la réactivation de la télomérase permettent d'envisager des différences inter-espèces du processus cancéreux.

De même, s'il est évident que le risque de tumeurs mammaires est lié, chez la chienne comme chez la femme, à des facteurs hormonaux, il est possible que la participation hormonale à la Cancérogenèse mammaire puisse être différente dans ces deux espèces. Nous retiendrons également que la difficulté de distinguer clairement des races prédisposées explique qu'il n'existe aucune publication se rapportant à la recherche de gènes de prédisposition aux tumeurs mammaires dans cette espèce. On peut raisonnablement espérer que le temps apportera de nouvelles études qui viendront alimenter cet ensemble de données et répondre à ces questions.

L'approche génétique du cancer du Chien profite de l'expérience acquise en génétique du cancer chez l'Homme afin d'exploiter les résultats et les techniques déjà élaborées, et d'avancer le plus rapidement possible, au bénéfice à la fois de l'Homme et de l'animal. Toutefois, des études de liaison génétique initiées chez le Chien permettront sans doute de caractériser des gènes impliqués dans les cancers canins, éventuellement non encore documentés chez l'Homme.

Les études exposées ouvrent des perspectives intéressantes mais sont trop peu nombreuses pour trouver une application pratique véritable. Elles permettent néanmoins d'espérer pour l'avenir le développement de nouveaux outils diagnostiques ainsi qu'une amélioration du suivi clinique et du pronostic. Par contre, les perspectives thérapeutiques envisagées chez l'Homme ne semblent pas devoir trouver d'applications en Cancérologie vétérinaire avant plusieurs années.

Liste des figures.

Figure 1. Schéma général de la carcinogenèse multi-étapes.	11
Figure 2. Compartiments cellulaires, cycle cellulaire et points d'impact de la carcinogenèse moléculaire.	13
Figure 3. Le cycle cellulaire et ses régulateurs.	17
Figure 4. Mécanismes responsables de l'inhibition du cycle cellulaire lors de la sénescence, d'après OUELLETTE et SAVRE-TRAIN [323].	31
Figure 5. Un modèle de développement tumoral concernant les relations entre télomères, prolifération cellulaire et transformation tumorale chez l'Homme et la Souris, adapté selon ANCELLIN [7].	34
Figure 6. Effets de la télomérase et des oncogènes viraux sur la durée de vie des cellules humaines, d'après OUELLETTE et SAVRE-TRAIN [323].	36
Figure 7. Schéma récapitulatif de la cancérogenèse moléculaire, adapté selon DE GUNZBURG [91].	39
Figure 8. Caryotype normal de chienne.	47
Figure 9. Exemple du chromosome 9 humain.	47
Figure 10. Principe de la PCR.	53
Figure 11. Principe de l'électrophorèse d'acides nucléiques, d'après TAGU [435].	54
Figure 12. Principe du Southern blot.	56
Figure 13. Le gène <i>TP53</i> humain, d'après SOUSSI [419].	69
Figure 14. Schéma de la structure biochimique de la protéine TP53 humaine, d'après SOUSSI [421].	69
Figure 15. <i>TP53</i> gardien du génome, d'après SOUSSI <i>et al.</i> [416].	71
Figure 16. La protéine TP53, ses voies de signalisation et quelques-uns de ses partenaires, adapté selon SOUSSI <i>et al.</i> [416].	72
Figure 17. Le tissu mammaire et les principales tumeurs mammaires, d'après MAGNOL <i>et al.</i> [239].	96
Figure 18. Pedigrees partiels des familles "résistante" et "sensible", d'après SCHAFFER <i>et al.</i> [386].	115
Figure 19. Caryotype d'une cellule d'un adénocarcinome mammaire, d'après MAYR <i>et al.</i> [257].	128
Figure 20. Caryotype d'une cellule d'un adénocarcinome mammaire, d'après MAYR <i>et al.</i> [257].	128
Figure 21. Analyse SCCP des exons 5 (A), 7 (B) et 8 (C) du gène <i>TP53</i> dans 4 adénocarcinomes tubulaires simples canins, d'après WAKUI <i>et al.</i> [465].	135
Figure 22. Expression des ARNm des gènes de la famille <i>erbB</i> dans les 12 échantillons de tumeurs mammaires du tableau 22, d'après MATSUYAMA <i>et al.</i> [248].	152
Figure 23. Niveaux relatifs des produits d'amplification des ARNm des gènes de la famille <i>erbB</i> dans les tumeurs du tableau 22, d'après MATSUYAMA <i>et al.</i> [248].	153
Figure 24. Expression de <i>c-kit</i> dans 11 tumeurs mammaires canines, d'après KUBO <i>et al.</i> [200].	157
Figure 25. Analyse Southern blot des ADN génotypes issus de 14 tumeurs mammaires, digérés avec l'enzyme de restriction <i>BamHI</i> , d'après RUNGSIPAT <i>et al.</i> [366].	159

Liste des tableaux.

Tableau 1.	Exemples d'oncoprotéines codées par des oncogènes et de tumeurs associées à une modification de l'expression de ces oncogènes.....	21
Tableau 2.	Principaux gènes suppresseurs de tumeurs.....	27
Tableau 3.	Les différentes méthodes pouvant être réalisées à partir des tissus selon leur mode de fixation, d'après AUDOUIN [13].....	44
Tableau 4.	Anomalies chromosomiques visibles sur un caryotype.....	64
Tableau 5.	Exemples d'anomalies chromosomiques des tumeurs humaines, d'après MORRIS et DOBSON [295].....	66
Tableau 6.	Classification histologique des tumeurs et des dysplasies mammaires des carnivores, O.M.S 1999, d'après MISDORP <i>et al.</i> [279].....	100
Tableau 7.	Incidence des différents types histologiques de tumeurs mammaires chez la chienne d'après BOSTOCK <i>et al.</i> [42] et LAGADIC <i>et al.</i> [202].....	102
Tableau 8.	Nombre de tumeurs mammaires des différents types histologiques dans les familles dites "résistante" et "sensible", d'après SCHAFFER <i>et al.</i> [386].....	115
Tableau 9.	Les techniques de biologie moléculaires appliquées à des tumeurs mammaires canines.....	121
Tableau 10.	La technique immunohistochimique appliquée à des tumeurs mammaires canines.....	121
Tableau 11.	Les anomalies chromosomiques observées dans les tumeurs mammaires de la chienne.....	130
Tableau 12.	Les anomalies de la ploïdie observées dans les tumeurs mammaires de la chienne.....	133
Tableau 13.	Les mutations du gène TP53 dans les tumeurs mammaires canines.....	137
Tableau 14.	Localisation des mutations du gène TP53 observées dans les tumeurs mammaires canines.....	139
Tableau 15.	Mutations du gène TP53 observées sur 6 des 40 carcinomes mammaires étudiés, d'après CHU <i>et al.</i> [71].....	143
Tableau 16.	Expression de la protéine TP53 dans 226 tumeurs canines, d'après GAMBLIN <i>et al.</i> [128].....	146
Tableau 17.	Immunomarquage de la protéine TP53 dans 61 tumeurs mammaires canines, d'après RUNGSIPIPAT <i>et al.</i> [365].....	146
Tableau 18.	Expression de la protéine TP53 dans 22 tumeurs mammaires canines, d'après INOUE <i>et al.</i> [175].....	147
Tableau 19.	Expression du produit de TP53 dans 20 tumeurs mammaires canines, d'après HAGA <i>et al.</i> [147].....	147
Tableau 20.	Distribution, parmi 103 chiens, des génotypes du polymorphisme de microsatellite à l'intérieur de l'intron 14 du gène canin BRCA1, d'après TSUSHIDA <i>et al.</i> [448].....	149
Tableau 21.	Fréquence des différents allèles et séquences polymorphes du polymorphisme de microsatellite à l'intérieur de l'intron 14 du gène canin BRCA1, d'après TSUSHIDA <i>et al.</i> [448].....	149
Tableau 22.	Expression des gènes de la famille erbB dans 12 tumeurs mammaires d'après MATSUYAMA <i>et al.</i> [248].....	152
Tableau 23.	Comparaison des produits d'amplification des ARNm des gènes canins de la famille erbB avec d'autres espèces d'après MATSUYAMA <i>et al.</i> [248].....	153
Tableau 24.	Expression de l'oncogène c-erbB-2 dans 28 tumeurs mammaires canines, d'après AHERN <i>et al.</i> [2].....	155
Tableau 25.	Expression de la protéine p ^{185erbB-2} dans 28 tumeurs mammaires canines, d'après SCHAFER <i>et al.</i> [386].....	155
Tableau 26.	Expression de la protéine p ^{185erbB-2} dans 79 tumeurs mammaires canines, d'après RUNGSIPIPAT <i>et al.</i> [365].....	155
Tableau 27.	Amplification du gène c-kit dans 11 tumeurs mammaires canines, d'après KUBO <i>et al.</i> [200]....	157
Tableau 28.	Expression du produit de l'oncogène c-yes par analyse immunohistochimique dans 79 tumeurs mammaires de chiennes, d'après RUNGSIPIPAT <i>et al.</i> [366, 367].....	159
Tableau 29.	Poids moléculaires (kb) des bandes obtenues à partir de tumeurs mammaires en utilisant 4 enzymes de restriction, d'après RUNGSIPIPAT <i>et al.</i> [366].....	161
Tableau 30.	Amplification du gène c-yes observée dans 14 tumeurs mammaires canines chiennes, d'après RUNGSIPIPAT <i>et al.</i> [366].....	161
Tableau 31.	Immunomarquage de la protéine Myc dans 22 tumeurs mammaires canines, d'après INOUE <i>et al.</i> [175].....	163
Tableau 32.	Expression de la cycline A et D1 dans 73 tumeurs et 2 dysplasies mammaires canines, d'après MURAKAMI <i>et al.</i> [300].....	163
Tableau 33.	Amplification du gène de la cycline A et expression de la cycline A (analyse immunohistochimique) dans 33 tumeurs mammaires canines, d'après MURAKAMI <i>et al.</i> [301].	165
Tableau 34.	Activité de la télomérase dans des tissus normaux de chiens, d'après YAZAWA <i>et al.</i> [487, 488].....	167
Tableau 35.	Activité de la télomérase dans des tumeurs malignes et bénignes de différentes origines et dans des tissus normaux, d'après BILLER <i>et al.</i> [32].....	167

Tableau 36. Activité de la télomérase dans 21 tumeurs mammaires canines et dans 4 tissus mammaires normaux, d'après YAZAWA <i>et al.</i> [487].....	167
Tableau 37. Activité de la télomérase dans des tissus mammaires normaux, hyperplasiques et tumoraux, d'après FUNAKOSHI <i>et al.</i> [124].....	167
Tableau 38. Activité de la télomérase dans 28 tumeurs mammaires canines, d'après YAZAWA <i>et al.</i> [487, 488].	169
Tableau 39. Activités télomérase relatives moyennes dans 27 tumeurs mammaires canines, d'après FUNAKOSHI <i>et al.</i> [124].....	171
Tableau 40. Bilan des anomalies génétiques observées dans les tumeurs mammaires de la chienne.	173
Tableau 41. Hyperamplification des centrosomes, mutations du gène TP53 et expression de la protéine MDM2 dans 9 tumeurs canines spontanées, d'après SETOGUCHI <i>et al.</i> [402].....	180
Tableau 42. Eléments du pronostic des tumeurs mammaires malignes de la chienne selon différentes études statistiques.	221
Tableau 43. Résumé des facteurs classiques du pronostic des tumeurs mammaires de la chienne.....	222
Tableau 44. Les nouveaux facteurs de pronostic.	224
Tableau 45. Mutations du gène TP53 dans les carcinomes mammaires de chiennes et état clinique, d'après WAKUI <i>et al.</i> [465].....	225
Tableau 46. Expression de la protéine TP53 dans les carcinomes mammaires de chiennes et état clinique, d'après WAKUI <i>et al.</i> [465].	225

Bibliographie.

1. AHERN TE, BIRD RC, BIRD AE, WOLFE LG. Overexpression of c-erbB-2 and c-myc but not c-ras, in canine melanoma cell lines, is associated with metastatic potential in nude mice. *Anticancer Res.*, 1993, **13**, 1365-1371.
2. AHERN TE, BIRD RC, BIRD RC, CHURCH BIRD AE, WOLFE LG. Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *Am. J. Vet. Res.*, 1996, **57**, 693-696.
3. ALBERTAZZI E, CAJONE F, LEONE BE, NAGUIB RN, LAKHSMI MS, SHERBET GV. Expression of metastasis-associated genes h-mts1 (S100A4) and nm23 in carcinoma of breast is related to disease progression. *DNA Cell. Biol.*, 1998, **17**, 335-342.
4. ALBERTS B, BRAY D, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. L'essentiel de la biologie moléculaire. Introduction à la biologie moléculaire de la cellule. Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 1998, 768p.
5. AMERICAN KENNEL CLUB. The American Kennel Club on line [en-ligne], [<http://clubs.akc.org>], (consulté le 30 juin 2001).
6. AMERICAN KENNEL CLUB CANINE HEALTH FOUNDATION. AKC Canine Health Foundation [en-ligne], [<http://akcchf.org/research.htm#cancer.html>], (consulté le 30 juin 2001).
7. ANCELIN K, CASTELLAZI M, GILSON E. Télomères et cancers : les barrières tombent. *Med. Sci.*, 2000, **16**, 491-496.
8. ANDRAWISS M, MARON A, BELTRAN W, OPOLON P, CONNAULT E, GRISVELLI F, YEH P, PERRICAUDET M, DEVAUCHELLE P. Adenovirus-mediated gene transfer in canine eyes: a preclinical study for gene therapy of human uveal melanoma. *J. Gene Med.*, 2001, **3**, 228-239.
9. ANDRE C, RENIER C, GALIBERT F, CHAUDIEU G. Les tests génétiques dans l'espèce canine : utilité, usage, résultats. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 2000, **5**, 343-349.
10. ANKER P, STROUN M. L'ADN du plasma, base d'un test sanguin pour détecter le cancer ? *Med. Sci.*, 1997, **13**, 269-271.
11. ASGEIRSSON KS, JONASSON JG, TRYGGVADOTTIR L, OLAFSDOTTIR K, SIGUGEIRSDOTTIR JR, INGVARSSON S, OGMUNDSDOTTIR HM. Altered expression of E-cadherin in breast cancer: patterns, mechanisms and clinical significance. *Eur. J. Cancer*, 2000, **36**, 1098-1106.
12. AUBIN G. Identification de gènes responsables de maladies héréditaires par clonage positionnel. *Point Vét.*, 1996, **28**, 417-422.
13. AUDOUIN J, DE MAUBLANC MA, MOLINA T. Anatomie et cytologie pathologiques. Apport des nouvelles méthodes et leurs développements. In *Cancers : évaluation, traitement et surveillance*. JM Andrieu et P Colonna Ed. ESTEM, Paris 1997.
14. BARBACID M. *ras* genes. *Ann. Rev. Biochem.*, 1987, **56**, 779-827.
15. BARNITZKE S, MOTZKO H, ROSENHAGEN C, BULLERDIEK J. Benign mixed tumor of canine mammary gland showing an r(X) and trisomy 5 as the only clonal abnormalities. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 199a, **62**, 29-31.
16. BARNITZKE S, MOTZKO H, CASELITZ J, KORNBERG M, BULLERDIEK J, SCHLOOT W. A recurrent marker chromosome involving chromosome 1 in two mammary tumors of the dogs. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1992, **60**, 135-137.
17. BARTKOVA J, LUKAS J, MULLER H, LUTZHOFT D, STRAUSS M, BARTEK J. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int. J. Cancer*, 1994, **57**, 353-361.
18. BAYLIN S, HERMAN J. DNA hypermethylation in tumorigenesis. *Trends Genet.*, 2000, **16**, 168-173.
19. BEERMAN H, SMIT VT, KLUIN PM, BONSING BA, HERMANS J, CORNELISSE CJ. Flow cytometry analysis of DNA stemline heterogeneity in primary and metastatic breast cancer. *Cytometry*, 1991, **12**, 147-154.
20. BELLET D, LAZAR V, BRESSAC DE PAILLERETS B, BENNARCEUR GRISCELLI A, BENARD J, BIDART JM. L'évolution des marqueurs de cancer : de la radio-immunologie aux puces à ADN et de la surveillance à la prédiction. *Bull. Cancer*, 2000, **87**, 35-39.
21. BENARD J, BRESSAC DE PAILLERETS B. Actualités sur les marqueurs génétiques de cancer. *Bull. Cancer*, 1998, **85**, 21-26.

22. BENJAMIN SA, LEE AC, SAUNDERS WJ. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Vet. Pathol.*, 1999, **36**, 423-436.
23. BERGH J, NORBERG T, SJOGREN S, LINDGREN A, HOLMBERG L. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nature Med.*, 1995, **1**, 1029-1034.
24. BERNHEIM A, VAGNER-CAPODANO AM, COUTURIER J. De la cytogénétique à la cytogénomique oncologique. *Med. Sci.*, 2000, **16**, 528-539.
25. BEROUD C, SOUSSI T. p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res.* 1998, **26**, 200-204.
26. BERTUCCI F, HOULGATTE R, BENZIANE A, GRANJEAUD S, ADELAIDE J, TAGETT R *et al.* Gene expression profiling of primary breast carcinoma using arrays of candidate genes. *Hum. Mol. Genet.*, 2000, **9**, 2981-2991.
27. BERTUCCI F, NGUYEN C, HOULGATTE R, BIRNBAUM D. Puces savantes à l'assaut du cancer du sein. *Méd. Sci.*, 2001, **17**, 531-532.
28. BERTUCCI F, HOULGATTE R, NGUYEN C, BENZIANE A, NASSER V, GRANJEAUD S, TAGETT B *et al.* Typage moléculaire du cancer du sein : transcriptome et puces à ADN. *Bull. Cancer*, 2001, **88**, 277-286.
29. BEUZEBOC P, SCHOLL S, SASTRE GARAU X, VINCENT-SALOMON A, DE CREMOUX P, COUTURIER J *et al.* Anticorps humanisé anti-HER2 (Trastuzumab ou Herceptin) : une avancée thérapeutique majeure dans le cancer du sein surexprimant cet oncogène ? *Bull. Cancer*, 86, 99, 544-549.
30. BIECHE I, LIDERAU R. Genetic alteration in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995, **14**, 227-251.
31. BIGNELL G, STRATTON MR, ASHWORTH A, WOOSTER R. The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. *Hum. Mol. Genet.*, 1997, **6**, 53-58.
32. BILLER BJ, KITCHELL BE, CADILE CD. Evaluation of an assay for detecting telomerase activity in neoplastic tissues of dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 1998, **59**, 1526-1529.
33. BIRNBAUM D, EISINGER F, JACQUEMIER J, LONGY M, SOBOL H, THEILLET C. Breast cancer. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*, 1999,
URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Tumors/breastID5018.htm>.
34. BLACKBURN EH. Structure and function of telomeres. *Nature*, 1991, **350**, 569-573.
35. BLANCHARD JM. Mécanismes moléculaires de la transformation oncogénique : quoi de neuf ? *Bull. Cancer*, 2002, **89**, 9-16.
36. BLASCO MA, LEE HW, HANDE MP, SAMPER E, LANSDORP PM, DEPINHO RA, GREIDER CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 1997, **91**, 25-34.
37. BLEZINGER P, WANG J, GONDO M, QUEZADA A, MEHRENS D, FRENCH M, SINGHAL A, SULLIVAN S, ROLLAND A, RALSTON R, MIN W. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene. *Nat. Biotechnol.*, 1999, **17**, 343-348.
38. BODNAR AG, OUELLETTE M, FROLKIS M, HOLT SE, CHIU CH, MOUN GB. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 1998, **279**, 349-352.
39. BONHERT. Contribution à l'étude du taux de survie des chiennes atteintes d'un cancer mammaire. Thèse Doct. Vét. Alfort, Créteil, 1981.
40. BORG A, TANDOM AK, SIGURDSSON H, CLARK GM, FERNO M, FUQUA SA, KILLANDER D, MAC GUIRE WL. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer res.*, 1990, **50**, 4332-4337.
41. BOSTOCK DE. The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *Eur. J. Cancer*, 1975, **11**, 389-396.
42. BOSTOCK DE. Canine and feline mammary neoplasms. *Brit. Vet. J.*, 1986, **142**, 506-515.
43. BOSTOCK DE, MORIARTY J, COCKER J. Correlation between histologic diagnosis, mean nucleolar organizer region count and prognosis in canine mammary tumors. *Vet. Pathol.*, 1992, **29**, 381-385.

44. BOVERI T. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. *Gustav Fischer*, 1914.
45. BRANDT BH, ROETGEN A, DIFFER T, NIKOLAI G. A mitogenic phenotype in human breast cancer cells. *FASEB J.*, 1999, 1939-1949.
46. BRAVO R, FRANK R, BLUNDELL PA, MAC DONALD-BRAVO H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature*, 1987, **326**, 515-517.
47. BREEN M. Canine molecular cytogenetics – Development of resources and their application to studies of canine cancer. In MODIANO JF. Editors: *Genes, dogs and cancer: emerging concepts in molecular diagnosis and therapy*. [en-ligne]. Ithaca, New York, USA, 2001. [http://www.ivis.org/proceedings/Keystone/Breen/chapter_frm.asp?LA=1]. (consulté le 20 octobre 2001).
48. BREEN M, BULLERDIEK J, LANGFORD CF. The dapi banded karyotype of the domestic dog (*canis familiaris*) generated using chromosome-specific paint probes. *Chromosome Res.*, 1999, **7**, 401-406.
49. BREEN M, THOMAS R, BINNS MM, CARTER NP, LANGFORD CF. Reciprocal chromosome painting reveals detailed regions of conserved synteny between the karyotype of the domestic dog (*Canis familiaris*) and human. *Genomics*, 1999, **61**, 145-155.
50. BREEN M, JOUQUAND S, RENIER C, MELLERSH CS, HITTE C, HOLMES NG et al. Chromosome-specific single-locus FISH probes allow anchorage of an 1800-marker integrated radiation-hybrid/linkage map of the domestic dog genome to all chromosomes. *Genome Res.*, 2001, **11**, 1784-1795.
51. BRET L, DELVERDIER M, FOURNIE GJ. L'apoptose. *Rev. Med. Vet.*, 1993, **144**, 579-589.
52. BRODEY RS, FIDLER IJ, HOWSON AE. The relationship of estrus irregularity, pseudopregnancy, and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. *JAVMA*, 1966, **149**, 1047-1049.
53. BRODEY RS, GOLDSCHMIDT MH, ROSZEL JR. Canine mammary gland neoplasm. *J. Am. Animal Hosp.Assoc.*, 1983, **19**, 61-90
54. BROWN MA. Tumor suppressor genes and human cancer. *Adv. Genet.*, 1997, **36**, 45-135.
55. BRYAN TM, ENGLEZOU A, DALLA-POZZA L, DUNHAM MA, REDDEL RR, Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med*, 1997, **3**, 1271-1274.
56. BUDILLON A. Molecular genetics of cancer: oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer*, 1995, **76**, 1869-1873.
57. BUKHOLM IK, NESLAND JM, KARESEN R, JACOBSEN U, BORRESEN-DALE AL. Expression of E-cadherin and its relation to the p53 protein status in human breast carcinomas. *Virchows Arch.*, 1997, **431**, 317-321.
58. BURGER AM, DOUBLE JA, NEWELL DR. Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. *Eur. J. Cancer*, 1997, **33**, 638-644.
59. CANCE WG, CRAVEN RG, WEINER TM, LIU ET. Novel protein kinases expression in human breast cancer. *Intl. J. Cancer*, 1993, **54**, 571-577.
60. CAREY LA, HEDICAN CA, HENDERSON GS, UMBRICKT CB, DOME JS, VARON D. Careful histological confirmation and microdissection reveal telomerase activity in otherwise telomerase-negative breast cancers. *Clin. Cancer. Res.*, 1998, **4**, 435-440.
61. CARIOTO LM, KRUTH SA, BETTS DH, KING WA. Telomerase activity in clinically normal dogs and dogs with malignant lymphoma. *Am J Vet Res*, 2001, **62**, 1442-1446.
62. CARON DE FROMENTEL C, SOUSSI T. TP53 tumor suppressor gene : a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 1992, **4**, 1-15.
63. CARROLL KK, GAMMAL EB, PLUNKETT ER. Dietary fat and mammary cancer. *Canad. Med. Ass. J.*, 1968, **98**, 590-593.
64. CARROLL PE, OKUDA M, HORN HF, BIDDINGER P, STAMBROOK PJ, GLEICH LL, LI YQ, TARAPORE P, FUKASAWA K. Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene*, 1999, **18**, 1935-1944.

65. CASTAGNARO M. Ras gene analysis in mammary tumors of dogs by means of PCR-SSCP and direct genomic analysis. *Ann. Ist. Super Sanita*, 1995, **31**, 337-341.
66. CASTELLAZZI M. Une avancée majeure en cancérogenèse expérimentale. La création de lignées tumorales humaines à partir d'une combinaison définie de gènes. *Méd. Sci.*, 1999, **15**, 1061-1063.
67. CASTRO-RIVERA E, SAMUDIO I, SAFE S. Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. *J. Biol. Chem.*, 2001, **246**, 30853-30861.
68. CAVALIERI EL, STACK DE, DEVANESAN PD, TODOROVIC R, DWIVEDY I, HIGGINBOTHAM S, et al. Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**, 10937-10942.
69. CAVALIERI E, FRENKEL K, LIEHR JG, ROGAN E, ROY D. Estrogens as endogenous genotoxic agents-DNA adducts and mutations. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 2000, **27**, 75-93.
70. CAVENEE WK, DRYJA TP, PHILLIPS RA et al. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, 1983, **305**, 779-784.
71. CHU LL, RUTTEMAN GR, KONG JM, GHAREMANI M, SCHMEING M, MISDORF W, VAN GARDEREN E, PELLETIER J. Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1998, **50**, 11-25.
72. CHUI X, EGAMI H, YAMASHITA J, KURIZAKI T, OHMACHI H, YAMAMOTO S, OGAWA M. Immunohistochemical expression of the *c-kit* proto-oncogene product in human malignant and non-malignant breast tissues. *Br. J. Cancer*, 1996, **73**, 1233-1236.
73. CLARK GJ, DER CJ. Aberrant function of the Ras signal transduction pathway in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1995, **35**, 133-144.
74. CLAUS EB, SCHILDKRAUT JM, THOMPSON WD, RISCH NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer*, 1997, **77**, 2318-2324.
75. CLEMONS M, GOSS P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2001, **344**, 276, 282.
76. COHEN D. Epidemiological analysis of the most prevalence sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer. Res.*, 1974, **37**, 2859-2868.
77. COHN-BENDIT F. Lésions et symptômes évocateurs en oncologie clinique vétérinaire. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 1994, **29**, 331-334.
78. COMINGS DE. General theory of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, **70**, 3324-3328.
79. CORN PG, EL-DEIRY WS. Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *BioEssays*, 2002, **24**, 83-90.
80. CORTEZ D, WANG Y, QIN J, ELLEDGE SJ. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the damage response to double-strand breaks. *Science*, 1999, **286**, 1162-1166.
81. COTRAN RS, KUMAR V, ROBBINS SL, SCHOEN FJ. The breast. In: COTRAN RS, KUMAR V, ROBBINS SL, SCHOEN FJ, editors. *Pathologic basis of disease*. 5th ed., Philadelphia: WB Saunders, 1994, 1089-1111.
82. COURJAL F, LOUASON G, SPEISER P, KATSAROS D, ZEILLINGER R, THEILLET C. Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers: evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors. *Int. J. Cancer*, 1996, **69**, 247-253.
83. CRIBIU E. La cytogénétique du chien et ses applications. *Point Vét.*, 1996, **28**, 399-403.
84. CROPP CS, CHAMPEME MH, LIDEREAU R, CALLAHAN R. Identification of three regions on chromosome 17q in primary breast carcinomas which are frequently deleted. *Cancer Res.*, 1993, **53**, 5617-2619.
85. DAMSKY CH, RICHA J, SOLTER D, KNUDSEN K, BUCK CA. Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell*, 1983, **34**, 455-466.
86. DARCY KM, ZANGANI D, WALHUTER AL, HUANG RY, VAUGHAN MM, RUSSEL JA, IP MM. Changes in ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 and ErbB4 during growth, differentiation and apoptosis of normal rat mammary epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 2000, **48**, 63-80.

87. DAVIDOFF AM, HUMPHREY PA, IGLEHART JD, MARKS JR. Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**, 5005-5010.
88. DAVIS DL, BRADLOW HL, WOLFF M, WOODRUFF T, HOEL DG, ANTON-CULVER H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ. Health Perspect.*, 1993, **101**, 372-377.
89. DECAMPS S, PRIGENT C. Aurora-A, -B, -C : à l'aube d'une nouvelle connexion entre l'amplification des centrosomes, l'aneuploidie et le cancer ? *Med. Sci.*, 2002, **18**, 474-480.
90. DE CREMOUX P, SALOMON AV, LIVA S, DENDALE R, BOUCHIND'HOMME B, MARTIN E *et al.* p53 mutations as a genetic trait of typical medullary breast carcinoma. *Trends Genet.*, 1997, **13**, 27-33.
91. DE GUNZBURG J. Cancer : GTPases et suppresseurs de tumeurs. *Med/Sci*, 2000, **16**, 487-491.
92. DE PINHO RA, HATTON K, FERRIER P, ZIMMERMAN K, LEGOUY E, TESFAYE A *et al.* Myc family genes : a dispersed multi-gene family. *Ann., Clin. Res.*, 1986, **18**, 248-289.
93. DEPOWSKI PL, ROSENTHAL SI, ROSS JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod. Pathol.*, 2001, **14**, 672-676.
94. DESTREXHE E, VANMANSHOVEN P, COIGNOUL F. Comparison of argyrophilic nuclear organizer regions by counting image analysis in canine mammary tumors. *Am. J. Vet. Res.*, 1995, **56**, 185-187.
95. DESTREXHE E, BICKER E, COIGNOUL F. Image analysis evaluation of ploidy, S-phase fraction and nuclear area in canine mammary tumours. *J. Comp. Path.*, 1995, **113**, 205-216.
96. DOLL R, PETO R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1981, **66**, 1192-1308.
97. DONNAY I, RAUÏS J, VERSTEGEN J. Influence des antécédents hormonaux sur l'apparition clinique des tumeurs mammaires chez la chienne. Etude épidémiologique. *Ann. Méd. Vét.*, 1994, **138**, 109-117.
98. DONNAY I, RAUÏS J, DEVLEESCHOWER N, WOUTERS-BALLMAN P, LECLERQ G, VERSTEGEN J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 1995, **56**, 1188-1194.
99. DORN CR, TAYLOR DON, SCHNEIDER R. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa countries, California II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda country. *J. Nat. Cancer. Inst.*, 1968, **40**, 307-318.
100. DORN CR. Epidemiology of canine and feline tumors. *J. Pathol.*, 1976, **12**, 307-334.
101. DOW SW, ELMSLIE RE, WILLSON AP, ROCHE L, GORMAN C, POTTER TA. In vivo tumor transfection with superantigen plus cytokines genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma. *J. Clin. Invest.*, 1998, **101**, 2406-2414.
102. DUCOS A. Cytogénétique et cancérologie chez le chien. *Point Vét.*, 1996, **28**, 429-435.
103. DULIC V, KAUFFMANN WK, WILSON SJ, TLSTY TD, LEES E, HARPER W, ELLEDGE SJ, REEDSI. P53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, 1994, **76**, 1013-1023.
104. EDWARDS MD, PAZZI KA, GUMERLOCK PH, MADEWELL BR. c-N-ras is activated infrequently in canine malignant lymphoma. *Toxicol. Pathol.*, 1993, **21**, 288-291.
105. ELENBAAS B, SPIRIO L, KOERNER F, FLEMING MD, ZIMONJIC DB, DONATHER JL *et al.* Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes dev.*, 2001, **14**, 50-65.
106. ELLEDGE RM, GRAY R, MANSOUR E. Accumulation of p53 protein as a possible predictor of response to adjuvant combination chemotherapy with cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil, and prednisone for breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1995, **87**, 1254-1256.
107. ELSE RW, HANNANT D. Some epidemiologic aspects of the mammary neoplasia in the bitch. *Vet. Rec.*, 1979, **104**, 296.
108. ELSE RW, NORVAL M, NEIL WA. The characteristics of a canine mammary carcinoma cell line. *Br. J. Cancer*, 1982, **46**, 675-681.

109. ENGSTROM W, BARRIOS C, WILLEMS JS, MOLLERMARK G, KANGSTROM LE, ELIASSEN I, LARSSON O. Expression of the myc protooncogene in canine rhabdomyosarcomas. *Anticancer Res.*, 1987, **7**, 1109-1110.
110. ENGSTROM W, BARRIOS C, AZAWEDO E, MOLLERMARK G, KANGSTROM LE, ELIASSEN I, LARSSON O. Expression of *c-myc* in canine mammary tumours. *Anticancer Res.*, 1987, **7**, 1235-1241.
111. EVANS T, ROSENTHAL ET, YOUNGBLOM J, DISTEL D, HUNT T. Cycline : a protéine specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 1983, **33**, 389-396.
112. FALETTE N, PAPERIN MP, TREILLEUX I, GRATADOUR AC, PELOUX N, MIGNOTTE H, TOOLE N., LOFMAN E et coll. Prognostic value of *p53* gene mutation in a large series of node-negative breast cancer patients. *Cancer Res.*, 1998, **58**, 1451-1455.
113. FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990, **61**, 759-767.
114. FENG J, FUNK WD, WANG SS, WEINRICH SL, AVILION AA, CHIU CP et al. The RNA component of human telomerase. *Science*, 1995, **269**, 1236-1241.
115. FEUER E, WUN L, BORING C, FLANDERS W, TIMMEL M, TONG T. The lifetime risk of developing breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1993, **85**, 892-897.
116. FEUNTEUN J. La prédisposition héréditaire au cancer du sein liée à BRCA1 et BRCA2 : une maladie de la réponse aux lésions génotoxiques ? *Med. Sci.*, 1999, **15**, 38-44.
117. FEUNTEUN J. BRCA1 et BRCA2: des échafaudages de réparation des lésions de l'ADN ? *Med. Sci.*, 2001, **17**, 1070-1071.
118. FIDLER I, BRODEY R. A necropsy study of canine malignant mammary neoplasms. *J. Am. Vet. Assn.*, 1967, **151**, 710-715.
119. FIGARELLA-BRANGER D, BOUVIER-LABIT C, CIVATTE M, PELLISIER JF. Régulateurs du cycle cellulaire. 1998, *Ann. Pathol.*, **18**, 178-186.
120. FITZGERALD MG, BEAN JM, HEDGE SR, UNSAL H, MAC DONALD DJ, HARKIN DP, FINKELSTEIN DM, ISSELBACHER KJ, HABER DA. Heterozygous ATM mutations do not contribute to early onset of breast cancer. *Nat. Genet.*, 1997, **15**, 307-310.
121. FOWLER EH, WILSON GP, KOESTNER A. Biologic behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenetic classification. *Vet. Pathol.*, 1974, **11**, 212-229.
122. FRIEIRSON HF. Poidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast. *Am. J. Surg. Pathol.*, 1991, **15**, 358-367.
123. FUKASAWA K, CHOI T, KURIYAMA R, RULONG S, VANDE WOUDE GF. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*, 1996, **271**, 1744-1747.
124. FUNAKOSHI Y, NAKAYAMA H, UETSUKA K, NISHIMURA R, SASAKI N, DOI K. Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Vet. Pathol.*, 2000, **37**, 177-183.
125. FURITSU T, TSUJIMURA T, TONO T, IKEDA H, KITAYAMA H, KOSHIMIZU U, SUGAHARA H. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene *c-kit* in a human mast cell leukaemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J. Clin. Invest.*, 1993, **92**, 1736-1744.
126. GAD S, SCHEUNER MT, PAGES-BERTHOUE S, CAUX-MONCOUTIER V, BENSIMON A, AURIAS A, PINTO M, STOPPA-LYONNET D. Identification of a large rearrangement of the BRCA1 gene using colour bar code on combed DNA in an American breast/ovarian cancer family previously studied by direct sequencing. *Am. J. Med. Genet.*, 2001, **38**, 388-391.
127. GALLI SJ, TSAI M, WERSHIL BK. The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others? *Am. J. Pathol.*, 1993, **142**, 965-974.
128. GAMBLIN RM, SAGARTZ JE, COUTO CG. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 1997, **58**, 857-863.
129. GÄRTNER F. DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed tumours: putative evidence for a common histogenesis. *Vet. J.*, 1999, **158**, 39-47.

130. GERALDES M, GÄRTNER F, SCHMITT F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet. Rec.*, 2000, **146**, 103-106.
131. GIACCIA AJ, KASTAN MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.*, 1998, **12**, 2973-2983.
132. GILBERSON SR, KURZMAN ID, ZACHRAV RE, HURVITZ AI, BLACK MM. Canine mammary epithelial neoplasms. Biologic implication of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet. Pathol.*, 1983, **20**, 127-142.
133. GINN PE, FOX LE, BROWER JC, GASKIN A, KURZMAN ID, KUBILIS PS. Immunohistochemical detection of p53 tumor-suppressor protein is a poor predictor of prognosis for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.*, 2000, **37**, 33-39.
134. GIRE V, WINFORD-THOMAS D. La sénescence dans les cellules humaines: un obstacle au développement tumoral ? *Med. Sci.*, 1999, **15**, 1094-1104.
135. GOMEZ DE, TEJERA AM, OLIVERO OA. Irreversible telomere shortening by 3'-azido2'3'-dideoxythymidine (AZT) treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, **246**, 107-110.
136. GRAHAM JC, KYERS RK. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *J. Vet. Intern. Med.*, 1999, **13**, 416-418.
137. GRAY IS, YUSBASIYAN-GURKAN V. A single nucleotide (T->G) polymorphism within intron 23 of the canine BRCA1 gene. *Anim. Genet.*, 2000, **31**, 76-77.
138. GREENBLATT MS, BENNET WP, HOLLSTEIN M, HARRIS CC. Mutation in the p53 tumor suppressor gene : clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994, **54**, 4855-4878.
139. GRIFFEY SM, KRAEGEL SA, MADEWELL BR. Rapid detection of K-ras gene mutations in canine lung cancer using single-strand conformational polymorphism analysis. *Carcinogenesis*, 1998, **19**, 959-963.
140. GRIGORIAN MS, TULCHINSKY EM, ZAIN S, EBRALIDZE AK, KRAMEROV DA, KRIAJEVSKA MV, GEORGIEV GP, LUKANODIN EM. The mts1 gene and control of tumor metastasis. *Gene*, 1993, **135**, 229-238.
141. GRIGORIAN M, ANDRESEN S, TULCHINSKY E, KRIAJEVSKA M, CARLBERG C, KRUSE C, COHN M *et al.* Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein : functional consequences of their interaction. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 22699-22708.
142. GRISCELLI F, LI H, BENNACEUR-GRISCELLI A, SORIA J, OPOLON P, SORIA C, PERRICAUDET M, YEH P, LU H. Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 6367-6372.
143. GUDMUNDSSON J, JOHANNESDOTTIR G, BERGH THORSSON J, ARASON A, INGVARSSON S, EGILSSON V, BARKARDOTTIR R. Different tumor types from BRCA2 carriers show wild-type chromosome deletions on 13q12-q13. *Cancer Res.*, 1995, **55**, 4830-4832.
144. GUEVARA-FUJITA ML, LOECHEL R, VENTA PJ, YUZBASIYAN-GURKAN V, BREWER GJ. Chromosomal assignment of seven genes on canine chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Mam. Genome*, 1996, **7**, 268-70.
145. GUPTA J, HAN LP, WANG P, GALLIE BL, BACCHETTI S. Development of retinoblastoma in the absence of telomerase activity. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996, **88**, 1152-1127.
146. HABER D. Roads leading to breast cancer. *New Engl. J. Med.*, 2000, **343**, 1566-1568.
147. HAGA S, NAKAYAMA M, TATSUMI K, MAEDA M, IMAI S, UMESAKO S, YAMAMOTO H, HILGERS J, SARKAR NH. Overexpression of the p53 gene product in canine mammary tumors. *Oncol. Rep.*, 2001, **8**, 1215-1219.
148. HAHN WC, COUNTER CM, LUNDBERG AS, BEIJERSBERGEN RL, BROOKS MW, WEINBERG RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 1999, **400**, 464-468.
149. HAHN WC, STEWART SA, BROOK MW, YORK SG, EATON E, KURACHI A *et al.* Inhibition of telomerase limits the growth of human tumour cells. *Nat. Med.*, 1999, **5**, 1164-1170.
150. HAINAUT P, SOUSSI T, SHOMER B, HOLLSTEIN M, GREENBLATT M, HOVIG E, HARRIS CC, MONTESANO R. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines : updated compilation and future prospects. *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**, 151-157.

151. HALL PA, LANE DP. P53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry ? –Revisited ! *J. Pathol.*, 1994, **171**, 1-4.
152. HAMILTON JM. Comparative aspects of mammary tumors. *Adv. Cancer Res.*, 1974, **19**, 13-26.
153. HAMPE JF, MISDORP W. Tumors and dysplasias of the mammary gland. *Bull. Wld Hlth Org.*, 1974, **50**, 11-133.
154. HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, **100**, 57-70.
155. HARLEY CB, FUTCHER AB, GREIDER CW. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature*, 1990, **345**, 458-460.
156. HARTMANN A, BLASZYK H, KOVACH JS, SOMMER SS. The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer. *Trends genet.*, 1997, **13**, 27-33.
157. HARTWELL LH, CULOTTI J, PRINGLE JR, REID BJ. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science*, 1974, **183**, 46-51.
158. HARTWELL LH, WEINERT T. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 1989, **246**, 629-634.
159. HARVELL DM, STRECKER TE, XIE B, BUCKLES LK, TOCHACEK M, McCOMB RD, SHULL JD. Diet-gene interactions in estrogen-induced mammary carcinogenesis in the ACI rat. *J. Nutr.*, 2001, **131**, 3087S-3091S.
160. HEDENFALK I, DUGGAN D, CHEN Y, RADMACHER M, BITTNER M, SIMON R, MELTZER P, GUSTERSON B, ESTELLER M, KALLIONIEMI OP, WILFOND B, BORG A, TRENT J. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2001, **344**, 539-548.
161. HELLMEN E. The pathogenesis of canine mammary tumors. *Cancer J.* 1996, **9**, 282-286.
162. HELLMEN E, BERGSTRÖM R, HOLMBERG L, SPANGBERG IB, HANSSON K, LINDGREN A. Prognostic factors in canine mammary tumors : a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet. Pathol.*, 1993, **30**, 20-27.
163. HERZOG RW, YANG EY, COUTO LB, HAGSTROM JN, ELWELL D, FIELDS PA *et al*. Long-term correction of canine hemophilia b by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat. Med.*, **5**, 56-63.
164. HINES SJ, ORGAN C, KORNSTEIN MJ, KRYSRAL GW. Coexpression of the *c-kit* and stem cell factor genes in breast carcinoma. *Cell. Growth Differ.*, 1995, **6**, 769-779.
165. HOGGE GS, BURKHOLER JK, CULP J, ALBERTINI MR, DUBIELZIG RR, KELLER ET, YANG NS, MAC EWEN EG. Development of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transfected tumor cell vaccines for the treatment of spontaneous canine cancer. *Hum. Gene Ther.*, 1998, **9**, 1851-1861.
166. HOGGE GS, BURKHOLER JK, CULP J, ALBERTINI MR, DUBIELZIG RR, YANG NS, MAC EWEN EG. Preclinical development of human –granulocyte colony-stimulating factor-transfected melanoma cell vaccine using established canine cell lines and normal dogs. *Cancer Gene Ther.*, 1999, **6**, 26-36.
167. HOKAIWADO N, ASAMOTO M, CHO YM, IMAIDA K, SHIRAI T. Frequent c-Ha-ras gene mutations in rat mammary carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine. *Cancer Lett.*, 2001, **163**, 187-190.
168. HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, HARRIS CC. p53 mutations in human cancers. *Science*, 1991, **253**, 49-53.
169. HOWES GP, STEPHENSON J, HUMPHREYS S. Sensitive and reliable PCR and sequencing used to detect p53 point mutations in fine needle aspirates of the breast. *J. Clin. Pathol.*, 1996, **49**, 570-573.
170. HYNES NE, LANE HA. Myc and mammary cancer : Myc is a downstream effector of the ErbB2 receptor tyrosine kinase. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2001, **6**, 141-150.
171. IACOPETTA B, GRIEU F, POWELL B, SOONG R, MAC CAUL K, SESHAJADRI R. Analysis of p53 gene mutation by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism provides independent prognostic information in node-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1998, **4**, 1597-1602.

172. IARC. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans. Vol. 72, Hormonal contraception and post-menopausal hormonal therapy, CIRC, 1999, Lyon.
173. IGGLEHART JD, KRAUS MH, LANGTON BC, HUPER G, KERNS BJ, MARKS JR. Increased c-erbB-2 gene copies and expression in multiple stages of breast cancer. *Cancer Res.*, 1990, **50**, 6701-6707.
174. INGVARSSON S. Molecular genetics of breast cancer progression. *Sem. Cancer Biol.*, 1999, **9**, 277-288.
175. INOUE I, SHIRAMIZU K. Immunohistochemical detection of p53 and c-myc proteins in canine mammary tumours. *J. Comp. Path.*, 1999, **120**, 169-175.
176. INOUE M, WADA N. Immunohistochemical detection of p53 and p21 protéins in canine testicular tumours. *Vet. Rec.*, 2000, **146**, 370-372.
177. JACKSON AL, LOEB LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.*, 2001, **477**, 7-21.
178. JACQUEMIN-SABLON A. Anticancer proteins and drugs : structure, function, and design. *Bull. Cancer*. 1999, **86**, 207-211.
179. JAFFE MH, HOSGOOD G, TAYLOR HW, KERWIN SC, HEDLUND CS, LOPEZ MK, DAVIDSON JR, MILLER DM, PARANJPE M. Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.*, 2000, **37**, 40-46.
180. JANSSON T, INGANAS M, SJOGREN S, NORBERG T, LINDGREN A, HOLMBERG L, BERGH J. p53 Status predicts survival in breast cancer patients treated with or without postoperative radiotherapy : a novel hypothesis based on clinical findings. *J. Clin. Oncol.*, 1995, **13**, 2745-2751.
181. JIANG M, SHAO ZM, WU J, LU LM, YUAN JD, HAN QX, SHEN ZZ, FONTANA JA. P21/waf1/cip1 and mdm-2 expression in breast carcinoma patients as related to prognosis. *Int. J. Cancer*, 1997, **74**, 529-534.
182. JONASDOTTIR TJ, DOLF G, SLETTEN M, AARSKAUG T, SCHELLING C, SCHLAPFER J *et al.* Five new linkage groups in the canine linkage map. *Anim. Genet.* 1999, **30**, 366-370.
183. JONASDOTTIR TJ, MELLERSH CS, MOE L, HEGGEBO R, GAMLEM H, OSTRANDER EA, LINGAAS F. Genetic mapping of a naturally occurring hereditary renal cancer syndrome in dogs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, **97**, 4132-4137.
184. JOHNSON TS, RAJU MR, GILTINAN RK, GILLETTE EL. Ploidy and DNA distribution analysis of spontaneous dog tumors by flow cytometry. *Cancer Res.*, 1981, **41**, 3005-3009.
185. JONVEAUX P, BERGER R. Oncogènes, anti-oncogènes et cytogénétique. In: ANDRIEU JM, COLONNA P, éditeurs. *Cancers: évaluation, traitement et surveillance*. Paris: ESTEM, 1997. [http://195.154.207.129/mdspace/cancero/doc/antionc.html] (consulté le 13/03/01).
186. JOUQUAN S. Construction de cartes d'hybrides d'irradiation du génome canin et intérêt du modèle canin en génétique moléculaire. Thèse de doctorat de l'université de Rennes I, 2000.
187. KASTAN MB. Genetic instability and tumorogenesis : introduction. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1997, **221**, 1-4.
188. KATO M, YANO K, MATSUO F, SAITO H, KATAGIRI T, KURUMIZAKA H *et al.* Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer. *J. Hum. Genet.*, 2000, **45**, 133-137.
189. KIM NW, PIATYSZEK MA, PROWSEKR, HARLEY CB, WEST MD, HO PLC *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, **266**, 2011-2015.
190. KING TM. Epidemiology of cancer: the genetic link. In MODIANO JF. Editors: *Genes, dogs and cancer : emerging concepts in molecular diagnosis and therapy*. [en-ligne]. Ithaca, New York, USA, 2001. [http://www.ivis.org/proceedings/Keystone/King/chapter_frm.asp?LA=1].(consulté le 20 octobre 2001).
191. KITCHELL BE, FIDEL JL. Tamoxifen as a potential therapy for canine mammary carcinoma. *Proc. Vet. Cancer Soc.*, 1992, 91.
192. KLEIN I. Acromegaly and cancer. *Ann. Intern. Med.*, **1984**, 101, 706-707.
193. KNAPP DW, WATERS DJ. Naturally occuring cancer in pet dogs : important models for developing improved cancer therapy for humans. *Mol. Med. Today*, 1997, **3**, 8-11.

194. KNUDSON AG. Mutations and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971, **68**, 820-823.
195. KOCHÉVAR DT, KOCHÉVAR J, GARRET L. Low level amplification of c-sis and c-myc in a spontaneous osteosarcoma model. *Cancer Lett.*, 1990, **53**, 213-222.
196. KOBAYASHI T, HIRAYAMA Y, KOBAYASHI E, KUBO Y, HINO O. A germline insertion in the tuberous sclerosis (Tsc2) gene gives rise to the Eker rat model of dominantly inherited cancer. *Nat. Genet.*, 1995, **9**, 70-74.
197. KOTSCHENREUTHER M. *p53 et tumeurs dans l'espèce canine*. Thèse Méd. Vét., Nantes, 2001, n°89, 112p.
198. KRAEGEL SA, GUMERLOCK PH, DUNWORTH DL, OREFFO VI, MADEWELL BR. K-ras activation in non-small cell lung cancer in the dog. *Cancer Res.*, 1992, **52**, 4724-4727.
199. KRAEGEL SA, PAZZI KA, MADEWELL BR. Sequence analysis of canine p53 in the region of exons 3-8. *Cancer Lett.*, 1995, **92**, 181-186.
200. KUBO K, MATSUYAMA S, KATAYAMA K, TSUTSUMI C, YONEZAWA K, SHIMADA T *et al.* Frequent expression of the *c-kit* proto-oncogene in canine malignant mammary tumor. *J. Vet. Med. Sci.*, 1998, **60**, 1335-1340.
201. KUSKA B. Sit, DNA, sit: cancer genetics going to the dogs. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999, **91**, 204-206.
202. LAGADIC M, COHN-BENDIT F. Les tumeurs mammaires dans l'espèce canine. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 1995, **30**, 437-451.
203. LAGADIC M, ESTRADA M, CAMADRO JP, DURAND P, GOEBEL J. Tumeurs mammaires de la chienne : critères du pronostic histologique et intérêt d'un grading. *Rec., Méd. Vét.*, 1990, **166**, 1035-1042.
204. LAI JL. Cytogénétique des hémopathies malignes: actualités. *Bull. Cancer*. 1999, **86**, 23-28.
205. LAIRD PW. Oncogenic mechanisms mediated by DNA methylation. *Mol. Med. Today*, 1997, **3**, 223-229.
206. L'ALLEMAIN G, BENARD J. Nouvelles molécules pour les cibles thérapeutiques du cancer. *Bull. Cancer*, 2001, **88**, 1240-1245.
207. LAMNIE A, DROBNJAK M, GERALD W, SAAD A, COTE R, CORDON-CARDO C. Expression of *c-kit* and kit ligand proteins in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 1994, **42**, 1417-1425.
208. LANE D. p53, guardian of the genome. *Nature*, 1992, **358**, 15-16.
209. LANGFORD CF, FISCHER PE, BINNS MM, HOLMES NG, CARTER NP. Chromosome-specific paints from a high-resolution flow karyotype of the dog. *Chrom. Res.*, 1996, **4**, 115-123.
210. LANTIGA-VAN LEEUWEN IS, VAN GARDEREN E, RUTTEMAN GR, MOL JA. Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2000, **75**, 219-228.
211. LARSEN CJ. Ce n'est qu'un début : continuons le combat. *Bull. Cancer*, 1999, **86**, 603-604.
212. LARSEN CJ. Télomérase et cancer : un authentique espoir thérapeutique ou un cul-de-sac ? *Bull. Cancer*, 2000, **87**, 305-306.
213. LARSEN CJ. BRCA1 et cancer : une nouvelle piste. *Bull. Cancer*, 2000, **87**, 693-694.
214. LARSEN CJ. Cancer du sein : un vrai modèle experimental. *Bull. Cancer*, 2001, **88**, 801.
215. LAVELLE F, JEHANNO A. Actualités en pharmacologie antitumorale : réalités et perspectives en 1998. *Bull. Cancer*. 1998, **85**, 83-88.
216. LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 1998, **386**, 643-649.
217. LEREBOURS F. Méthodes de détection des mutations dans les cancers humains. *Bull. Cancer*, 1999, **86**, 876-879.

218. LEVY R. Applications de la biologie moléculaire à la clinique cancérologique. In ANDRIEU J, COLONNA P, editors. *Cancers : évaluation, traitement et surveillance*. [en-ligne]. Paris : ESTEM, 1997. [<http://www.medinspace.com/cancero/doc/therageni.html>]. (consulté le 3 mars 2002).
219. LEVY R. Thérapie génique. In ANDRIEU J, COLONNA P, editors. *Cancers : évaluation, traitement et surveillance*. [en-ligne]. Paris : ESTEM, 1997. [<http://www.medinspace.com/cancero/doc/therageni.html>]. (consulté le 3 mars 2002).
220. LEVY R, ANDRIEU JM, COLONNA P. De la cellule normale au cancer clinique. In ANDRIEU J, COLONNA P, editors. *Cancers : évaluation, traitement et surveillance*. [en-ligne]. Paris : ESTEM, 1997. [<http://www.medinspace.com/cancero/doc/cellule.html>].(consulté le 10 mai 2001).
221. LEVY-LAHAD E, LAHAD A, EISENBERG S, DAGAN E, PAPERNA T, KASINETZ L. A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**, 3232-3236.
222. LINDEN MD, TORRESS FX, KUBUS J, ZARBO RJ. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am. J. Clin. Path.*, 1992, **97**, Suppl. 1, S4-S13.
223. LINGAAS F, SORENSEN A, JUNEJA RK, JOHANSSON S, FREDHOLM M, WINTERO AK. Towards construction of a canine linkage map: establishment of 16 linkage groups. *Mamm. Genome*, 1997, **8**, 218-221.
224. LINGLE WL, LUTZ WH, INGLE JN, MAIHLE NJ, SALISBURY L. Centrosome hypertrophy in human breast tumors : implications for genomic stability and cell polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 2950-2955.
225. LIPPMAN ME, DICKSON RB, BATES S, KNABBE C, HUFF K, SWAIN S *et al*. Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1986, **6**, 59-70.
226. LOEB LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.*, 2001, **61**, 3230-3239.
227. LÖHR CV, TEIFKE JP, FAILING K, WEISS E. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Vet. Pathol.*, 1997, **34**, 212-221.
228. LONDON CA, GALLI SJ, YUUKI T, HU ZQ, HELFAND SC, GEISSLER EN. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene *c-kit*. *Exp. Hematol.*, 1999, **27**, 689-697.
229. LONGY M. La maladie de Cowden et le gène PTEN : un exemple d'intégration réussie entre clinique et biologie. *Bull. Cancer*, 2001, **88**, 1153-1158.
230. LUPULESCU A. Estrogen use and cancer incidence: a review. *Cancer Invest*, 1995, **13**, 287-295.
231. MA Y, LONGLEY BJ, WANG X, BLOUNT JL, LANGLEY K, CAUGHEY GH. Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *J. Invest. Dermatol.*, 1999, **112**, 165-170.
232. McENZIE K, UMBRECHT CB, SUKUMAR S. Applications of telomerase research in the fight against cancer. *Mol. Med. Today*, 1999, **5**, 114-122.
233. McEWEN EG. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 1990, **9**, 125-136.
234. McEWEN EG, PATTNAIK AK, HARVEY HJ, PANKO WB. Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer Res.*, 1982, **42**, 2255-2259.
235. McEWEN EG, KHANNA C, RADINSKY R. (2001). Cancer biology and metastasis. In: WITHROW SJ, MAC EWEN EG, editors. *Small Animal Clinical Oncology*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 18-34.
236. McGEOCH C, BARNES DM, NEWTON JA, MOHAMMED S, HODGSON SV, NG M, BISHOP DT, SPURR NK. P53 protein detected by immunohistochemical staining is not always mutant. *Dis. Markers*, 1993, **11**, 239-250.
237. MCLEOD KF, SHERRY N, HANNON G, BEACH D, TOKINO T, KINZLER K, VOGELSTEIN B, JACKS T. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes dev.*, 1995, **9**, 935-944.
238. MADEWELL BR, THIELEN GH. Tumors of the mammary gland. In: THIELEN G, MADEWELL BR, editors. *Veterinary Cancer Medicine*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1987, 327-344.
239. MAGNOL JP, MARCHAL T, DELISLE F, DEVAUCHELLE P, FOURNEL C. Cancérologie clinique du chien, Saint-Pierre-La-Palud : Th. Marchal, 426p.

240. MALANEY S, DALY RJ. The ras signalling pathway in mammary tumorigenesis and metastasis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2001, **6**, 101-113.
241. MALKIN D. p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1993, **66**, 83-92.
242. MAO L, LEE DJ, TOCKMAN MS, EROZAN YS, ASKIN F, SIDRANSKY D. Microsatellite alterations as clonal markers for the détection of human cancer. 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9871-9875.
243. MANGUES R, PELLICER A. ras activation in experimental carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, 1992, **3**, 229-239.
244. MARTIN GM, SPRAGUE CA, EPSTEIN CJ. Replicative lifespan of cultivated human cells: effect of donor's age, tissue and genotype. *Lab. Invest.*, 1970, **23**, 86-92.
245. MARTIN KJ, GRANER E, LI Y, PRICE LM, KRITZMAN BM, FOURNIER MV *et al.* High-sensitivity array analysis of gene expression for the early detection of disseminated breast tumor cells in peripheral blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**, 2646-2651.
246. MARTIN P, COTARD M, MIALOT J. Animal models for hormone-dependent human breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1984, **12**, 13-17.
247. MATSUKURA N, HOSHINO A, IGARASHI T, HASEGAWA H, OKINO T, ONDA M, IIJIMA O *et al.* In situ gene transfer and suicide gene therapy of gastric cancer induced by N-ethyl-N' -nitro-N-nitrosoguanidine in dogs. *Jpn. J. Cancer Res.* 1999, **90**, 1039-1049.
248. MATSUYAMA S, NAKAMURA M, YONEZAWA K, SHIMADA T, OHASHI F, TAKAMORI Y, KUBO K. Expression patterns of the erbB subfamily mRNA in canine benign and malignant tumors. *J. Vet. Med. Sci.*, 2001, **63**, 949-954.
249. MAYR B, SCHLEGER W, KALAT M, SCHWEIGER P, REIFINGER M, EISENMENGER E. Cytogenetic studies in a canine mammary tumor. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1990, **47**, 83-87.
250. MAYR B, SWIDERSKY W, SCHLEGER W. Translocation t(4 ;27) in a canine mammary complex adenocarcinoma. *Vet. Rec.*, 1990, **126**, 42.
251. MAYR B, GILLI H, SCHLEGER W, REIFINGER M, BURTSCHER H. Cytogenetic characterization of mammary tumors in two domestic dogs. *J. Vet. Med.*, 1991, **38**, 141-147.
252. MAYR B, KRAMBERGER-KAPLAN E, LOUPAL G, SCHLEGER W. Analysis of complex cytogenetic alterations in three canine mammary sarcomas. *Res. Vet. Sci.*, 1992, **53**, 205-211.
253. MAYR B, PLASSER J, SCHLEGER W, LOUPAL G, BURTSCHER H. Deleted chromosome 32 in mammary neoplasms in two domestic dogs. *J. Small. Anim. Practice*, 1992, **33**, 277-278.
254. MAYR B, ESCHBORN U, LOUPAL G, SCHLEGER W. Trisomy 1 in a canine mammary tubular adenocarcinoma, complex type. *Vet. Pathol.*, 1993, **30**, 311-313.
255. MAYR B, REIFINGER M, WEISSENBOCK H, EISENMENGER E. Cytogenetic analysis of four solid tumours in dogs. *Res. Vet. Sci.*, 1994, **57**, 88-95.
256. MAYR B, LOUPAL G, SCHLEGER W. Genetic alterations in four cases of canine mammary tumours : two trisomies, translocations and one tumor suppressor gene p53 mutation. 12th European Colloquium on Cytogenetics in Domestic Animals, 25-28 june 1996, Zaragoza, Spain.
257. MAYR B, DRESSLER A, REIFINGER M, FEIL C. Cytogenetic alterations in eight mammary tumors and tumor-suppressor gene p53 mutation in one mammary tumor from dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 1998, **59**, 69-78.
258. MAYR B, REIFINGER M, BREM G, FEIL C, SCHLEGER W. Cytogenetic, ras, and p53 : studies in cases of canine neoplasms (hemangiopericytoma, mastocytoma, histiocytoma, chloroma). *J. Hered.*, 1999, **90**, 124-128.
259. MAYR B, REIFINGER M, ALTON K. Novel canine tumour suppressor gene p53 mutations in cases of skin and mammary neoplasms. *Vet. Res. Commun.*, 1999, **23**, 285-291.
260. MAYR B, BREM G, REIFINGER M. Absence of S100A4 (mts1) gene mutations in various canine and feline tumours. *Zentralbl. Veterinarmed A*, 2000, **47**, 123-128.

261. MAYR B, RESCH S, HEPPERLE S, BREM G, REIFINGER M, SCHAFFNER G. Comparative studies in the promoter and exon 1 regions of tumour suppressor p53 in several mammalian species: absence of mutations in a panel of spontaneous domestic animal tumours. *J. Vet. Med. A.*, 2000, **47**, 593-597.
262. MEEKER AK, COFFEY DS. Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells. A review. *Biochemistry (Mosc)*, 1997, **62**, 1323-1331.
263. MELLERSH CS, LANGSTON AA, ACLAND GM, FLEMING MA, RAY K, WIEGLAND NA, FRANCISCO LV, GIBBS M, AGUIRRE GD, OSTRANDER EA. A linkage map of the canine genome. *Genomics*, 1997, **46**, 326, 336.
264. MELLERSH CS, HITTE C, RICHMAN M, VIGNAUX F, PRIAT C, JOUQUAND S, WERNER P, ANDRE C. An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. *Mamm. Genome* 2000, **11**, 120-130.
265. MELLINK CH, BOSMA AA, RUTTEMAN GR. Cytogenetic analysis of cell lines derived from metastases of mammary carcinoma in a dog. *Anticancer Res.*, 1989, **9**, 1241-1244.
266. MENG L, LIN L, ZHANG H, NASSIRI M, MORALES AR, NADJI M. Multiples mutations of the p53 genes in human mammary carcinoma. *Mutat. Res.*, 1999, **435**, 263-269.
267. MEYNE J, RATLIFF RL, MOYZIS RK. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86**, 7049-7053.
268. MIALOT JP, ANDRE F, MARTIN PM, COTARD M, RAINAUD JP. Etude des récepteurs des hormones stéroïdes dans les tumeurs mammaires de la chienne. I. Mise en évidence, caractérisation et relation avec le type histologique. *Rec. Méd. Vét.*, 1982, **158**, 215-221.
269. MIALOT JP, LAGADIC M. Epidémiologie descriptive des tumeurs du chien et du chat. *Rec. Méd. Vét.*, 1990, **166**, 937-947.
270. MIKI Y, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D, FUTREAL PA, HARSHMAN K, TAVTIGIAN S *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 1994, **266**, 66-71.
271. MILDE-LANGOSCH K, BAMBERGER AM, RIECK G, KELP B, LONING T. Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2001, **67**, 61-70.
272. MILLIKAN R, HULKA B, THOR A, ZHANG Y, EDGERTON S, ZHANG X, PEI H, HE M, WOLD L, MELTON LJ, BALLARD D, CONWAY K, LIU E. P53 mutations in benign breast tissue. *J. Clin. Oncol.*, 1995, **13**, 2293-2300.
273. MINA RB, TATEYAMA S, MIYOSHI N, UCHIDA K, YAMAGUCHI R, OHTSUKA H. Amplification of a c-yes-1-related oncogene in canine lymphoid leukaemia. *J. Vet. Med. Sci.*, 1994, **4**, 773-774.
274. MISDORP W. Histological classification and further characterization of tumours in domestic animals. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 1976, **20**, 191-221.
275. MISDORP W. Progestogens and mammary tumors on dogs and cats. *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 1991, **125**(Suppl), 27-31.
276. MISDORP W. Veterinary cancer epidemiology. *Vet. Quart.*, 1996, **18**, 32-36.
277. MISDORP W, COTCHIN E, HAMPE JF, JABARA AG, VON SANDERSLEBEN J. Canine malignant mammary tumours. II. Adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas. *Vet. Pathol.*, 1972, **9**, 447-470.
278. MISDORP W, COTCHIN E, HAMPE JF, JABARA AG, VON SANDERSLEBEN J. Canine malignant mammary tumours. III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumours. *Vet. Pathol.*, 1973, **10**, 241-256.
279. MISDORP W, ELSE RW, HELLMEN E, LIPSCOMB TP. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, Washington, DC, USA. 1999. Vol VII.
280. MITELMAN F, JOHANSSON B, MANDAHL N, MERTENS F. Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1997, **95**, 1-8.
281. MIYOSHI N, TATEYAMA S, OGAWA K, NOSAKA D, OHASHI T, SUNYASOOTCHAREE B. Proto-oncogene of genomic DNA in clinically normal animals of various species. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 940-944.

282. MIYOSHI N, TATEYAMA S, OGAWA K, YAMAGUCHI R, KURODA H, YASUDA N, SHIMIZY T. Abnormal structure of the canine oncogene, related to the human c-yes-1 oncogene, in canine mammary tumor tissue. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 2046-2049.
283. MODIANO JF. Introduction. In MODIANO JF. Editors: *Genes, dogs and cancer : emerging concepts in molecular diagnosis and therapy*. [en-ligne]. Ithaca, New York, USA, 2001. [http://www.ivis.org/proceedings/Keystone/Introduction/chapter_frm.asp?LA=1]. (consulté le 20 octobre 2001).
284. MODIANO JF. Loss of tumor suppressor gene expression in canine cancer: sporadic or heritable lesions? In MODIANO JF. Editors: *Genes, dogs and cancer: emerging concepts in molecular diagnosis and therapy*. [en-ligne]. Ithaca, New York, USA, 2001. [http://www.ivis.org/proceedings/Keystone/Modiano/chapter_frm.asp?LA=1].(consulté le 20 octobre 2001).
285. MODIANO JF, RITT MG, WOJCIESZYN J. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *J. Vet. Intern. Med.*, 1999, **13**, 163-174.
286. MOE L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 2001, **57**, 439-443.
287. MOL JA, VAN GARDEREN E, SELMAN PJ, WOLFSWINKEL J, RIJNBERK A. Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats. *J. Clin. Invest.*, 1995, **95**, 2028-2034.
288. MOL JA, VAN GARDEREN E, RUTTEMAN GR, RIJNBERK A. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and humans. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 1996, **57**, 67-71.
289. MOL JA, LANTIGA-VAN LEEUWEN IS, VAN GARDEREN E, SELMAN PJ, OOSTERLAKEN-DIJKSTERHUIS MA, SCHALKEN A, RIJNBERK A. Mammary growth hormone and tumorigenesis lessons from the dog. *Vet Q*, 1999, **21**, 111-115.
290. MOMAND J, ZAMBETTI GP, OLSON DC, GEORGE D, LEVINE AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 1992, **69**, 1237-1245.
291. MORIMOTO M, TSUJIMURA T, KANAKURA Y, KITAMURA Y, MATSUDA H. Expression of c-kit and stem cell factor mRNA in liver specimens from healthy adult dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 1998, **59**, 363-366.
292. MORIN GB. Telomere integrity and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996, **88**, 1095-1096.
293. MORRIS J, DOBSON J, BOSTOCK D. Use of tamoxifen in the control of mammary neoplasia. *Vet. Rec.*, 1993, **133**, 539-542.
294. MORRIS J, DOBSON J. Pathogenesis and tumour biology. In: *Small Animal Oncology*. Owford: Blackwell Science, 2001, 4-14.
295. MORRIS J, DOBSON J. Tumor of the mammary gland. In: *Small Animal Oncology*. Owford: Blackwell Science, 2001, 184-191.
296. MOTORUKA T, BLOOM T, GOO-KIM H, JÜPPNER H, RUDERMAN JV, KRONENBERG HM, et al. A novel cyclin encoded by a *bcl1*-linked candidate oncogene. *Nature*, 1991, **350**, 512-515.
297. MOULTON JE, TAYLOR DON, DORN CR, ANDERSEN AC. Canine mammary tumors. *Vet. Pathol.*, 1970, **7**, 289-320.
298. MOULTON JE. Tumors of the mammary gland. In: *Tumours in Domestic Animals*, 3rd edn. Ed J.E. Moulton. University of California Press, Berkely, 1990, 518-552.
299. MOYZIS RK, BUCKINGHAM JM, CRAM LS, DANI M, DEAVEN LL, JONES MD et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 6622-6626.
300. MURAKAMI Y, TATEYAMA S, RUNGSIPIPAT A, UCHIDA K, YAMAGUCHI R. Immunohistochemical analysis of cyclin A, Cyclin D1 and p53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *J. Vet. Med. Sci.*, 2000, **62**, 743-750.
301. MURAKAMI Y, TATEYAMA S, UCHIDA K, YAMAGUCHI R. Amplification of the cyclin A gene in canine and feline mammary tumors. *J. Vet. Med. Sci.*, 2000, **62**, 783-787.

302. MURAKAMI Y, TATEYAMA S, UCHIDA K, YAMAGUCHI R. Immunohistochemical analysis of cyclins in canine normal testes and testicular tumors. *J. Vet. Med. Sci.*, 2001, **63**, 909-912.
303. MURUA ESCOBAR H, BECKER K, BULLERDIEK J, NOLTE I. The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). *Cytogenet. Cell. Genet.*, 2001, **94**, 194-195.
304. MUSSMAN JG, HORN HF, CARROLL PE, OKUDA M, TARAPORE P, DONEHOWER LA, FUKASAWA K. Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression. *Oncogene*, 2000, **19**, 1635-1646.
305. MUTHUSWAMY SK, SIEGEL PM, DANLORT DL, WEBSTER MA, MULLER WJ. Mammary tumours expressing the neu proto-oncogene posses elevated c-src tyrosine kinase activity. *Mol. Cell. Biol.*, 1994, **14**, 735-743.
306. MUTO T, WAKUI S, TAKAHASHI H, MAEKAWA S, MASAOKA T, USHIGOME S, FURUSATO M. p53 gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. *Vet. Pathol.*, 2000, **37**, 248-253.
307. NAKOPOULOU LL, ALEXIADOU A, THEODOROPOULOS GE, LAZARIS ACH, TZONOU A, KERAMOPOULOS A. Prognostic significance of the co-expression of p53 and c-erbB-2 protein in breast cancer. *J. Pathol.*, 1996, **179**, 31-38.
308. NASIR L, ARGYLE DHJ, McFARLANE ST, REID SW. Nucleotide sequence of a highly conserved region of the canine p53 tumour suppressor gene. *DNA seq.*, 1997, **8**, 83-86.
309. NASIR L, BURR PD, Mc FARLANE ST, GAULT E, THOMPSON H, ARGYLE DJ. Cloning, sequence analysis and expression of the cDNAs encoding the canine and equine homologues of the mouse double minute 2 (mdm2) proto-oncogene. *Cancer Lett.*, 2000, **152**, 9-13.
310. NASIR L, DEVLIN P, MAC KEVITT T, RUTTEMAN G, ARGYLE DJ. Telomere lengths and telomerase activity in dogs tissues: a potential model system to study human telomere and telomerase biology. *Neoplasia*, 2001, **3**, 351-359.
311. NERURKAR VR, SEHADRI R, MULHERKAR R, ISHWAD CS, LALITHA VS, NAIK SN. Receptors for epidermal growth factor and estradiol in canine mammary tumors. *Int. J. Cancer*, 1987, **40**, 230-232.
312. NESBIT CE, TERSAK JM, PROCHOWNIK EV. Myc oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*, 1999, **18**, 3004-3016.
313. NEUGUT A, WEINBERG M., AHSAN H, RESCIGNO J. Carcinogenic effects of radiotherapy for breast cancer. *Oncology*, 1999, **13**, 1245-1265.
314. NEWMAN B, AUSTIN MA, LEE M, KING MC. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 3044-3048.
315. NORVAL M, MAINGAY J, ELSE RW. Studies of three canine mammary carcinoma cell lines-I. In vitro properties. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1984, **20**, 1489-1500.
316. NOWELL PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 1976, **194**, 23-28.
317. NURSE P, THURIAUX P. Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 1980, **96**, 627-637.
318. OCHIAI K, MORIMATSU M, TOMIZAWA N, SYUTO B. Cloning and sequencing full length of canine *Brca2* and *Rad51* cDNA. *J. Vet. Med. Sci.*, 2001, **63**, 1103-1108.
319. OLINER JD, KINZLER KW, MELTZER PS, GEORGE DL, VOGELSTEIN B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, 1992, **358**, 80-83.
320. OMS. Histological typing of the breast tumors. 2e edition, Genève.
321. ONIONS DE. A prospective survey of familial canine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1984, **72**, 909-911.
322. OSTRANDER EA, GALIBERT F, PATTERSON DF. Canine genetics comes of age. *Trends genet.*, 2000, **16**, 117-124.
323. OUELLETTE MM, SAVRE-TRAIN I. Les télomères et le vieillissement des cellules. *Méd. Sci.*, 1996, **16**, 473-780.

324. OVERGAARD J, YILMAZ M, GULDBERG P, HANSEN LL, ALSNER J. TP53 mutation is an independant prognostic marker for poor outcome in both node-negative and node-positive breast cancer. *Acta. Oncol.*, 2000, **39**, 327-333.
325. OWEN LN, MORGAN DR, BOSTOCK DE, FLEMANS RJ. Tissue culture and transplantation studies on canine mammary carcinoma. *Eur. J. Cancer.*, 1977, **13**, 1445-1449.
326. OWEN LN. A comparative study of canine and human breast cancer. *Invest. Cell. Pathol.*, 1979, **2**, 257-275.
327. OWEN LN, DOYLE A, LITTLEWOOD TD. Long-term tissue cultures and cell lines of neoplasms in domesticated animals. *J. Comp. Pathol.*, 1981, **91**, 159-163.
328. PARLE L, MIALOT JP, LAGNEAU F, PARODI AL. Etude de quelques facteurs potentiels de risque dans l'épidémiologie des tumeurs mammaires de la chienne. *Rec. Méd. Vét.*, 1980, **156**, 93-100.
329. PARODI AL. Les éléments du pronostic. *Prat. Méd. Anim. Comp.*, 1983, **18**, 31-36.
330. PARODI AL. Le chien est-il l'avenir de la génétique du cancer ? *Rev. Prat.*, 2001, **51**, 585-586.
331. PARODI AL, LAGNEAU F. Tumeurs mammaires de la chienne et de la chatte. *Rec. Méd. Vét.*, 1977, **153**, 835-844.
332. PARVIN JD. BRCA1 at a branch point. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, **98**, 5952-5954.
333. PATTERSON DF. Companion animal medicine in the age of medical genetics. *J. Vet. Internal Med.*, 2000, **14**, 1-9.
334. PENA LL, NIETO AI, PEREZ-ALENZA MD, CUESTA P, CASTANO M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors : relationship to clinical and pathologic variables. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1998, **10**, 237-246.
335. PEREZ-ALENZA MD, RUTTEMAN GR, KUIPERS-DIJKSHOORN NJ, PENA L, MONTOYA A. DNA flow cytometry of canine mammary tumours: the relationship of DNA ploidy and S-phase fraction to clinical and histological features. *Res. Vet. Sci.*, 1995, **58**, 238-243.
336. PEREZ-ALENZA MD, RUTTEMAN GR, PENA L, BEYNEN AC, CUESTA AP. Relation between habitual diet and canine mammary tumours in a case control study. *J. Vet. Int. Med.*, 1998, **12**, 132-139.
337. PEREZ-ALENZA MD, PENA LL, DEL CASTILLO N, NIETO AI. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J. Small Anim. Pract.*, 2000, **41**, 287-291.
338. PEROU CM, SORLIE T, EISEN M, VAN DE RIJN M, JEFFREY S, REES CA *et al.*, Molecular portrait of breast tumours. *Nature*, **406**, 747-752.
339. PHAROAH DP, CALDAS C. Molecular genetics and the assessment of human cancers. *Exp. Rev. Mol. Med.*, 11 March 1999, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/99000526h.htm>
340. PIERREPOINT CG. Possible benefits to veterinary medicine of considering the dog as a model for human cancer. *J. Small. Anim. Pract.*, 1985, **26**, 43-47.
341. PIGNATELLI M. E-cadherin: a biological marker of tumour differentiation. *J. Pathol.*, 1993, **171**, 81-82.
342. PITTS AE, PITTS A, COREY D. Inhibition of human telomerase by 2'-0-methyl-RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 11549-11554.
343. PLOMION C. SSCP: électrophorèse de l'ADN simple brin. In: TAGU E, editor. *Principe des techniques de biologie moléculaire*. Paris: INRA éd., 1999, 119-120.
344. PLOTON D, MENAGER M, JEANNESON P, HIMBER G, PIGEON F, ADNET JJ. Improvement in the staining and visualization of hte argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.*, 1986, **18**, 5-14.
345. POWELL B, SOONG R, IACOPETTA B, SESHAUDRI R, SMITH DR. Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the p53 gene in breast cancer. *Clin. Cancer*, 2000, **6**, 443-451.
346. PRIAT C, HITTE C, VIGNAUX F, RENIER C, JIANG Z, JOUQUAND S, CHERON A, ANDRE C, GALIBERT F. A whole-genome radiation hybrid map of the dog genome. *Genomics*, 1998, **54**, 361-378.

347. PRIESTER WA. Occurrence of mammary neoplasms in bitches in relation to breed, age, tumor type and geographical region from which reported. *J. Small Anim. Pract.*, 1979, **20**, 1-13.
348. PRIESTER WA, MANTEL N. Occurrence of tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1971, **47**, 1333-1344.
349. PRIESTER WA, MAC KAY FW. The occurrence of tumours in domestic animals. *Nat. Cancer. Inst. Monog.*, 1980, **54**, 46.
350. QUINTIN-COLONNA F, DEVAUCHELLE P, FRADELIZI D, MOUROT B, FAURE T, KOURILDKY P, ROTH C, MEHTALI M. Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcome by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Ther.*, 1996, **3**, 1104-1112.
351. RAFFLO CP, DIAMOND SS. Neoplasm of the mammary papilla in a male dog. *Am. J. Vet. Res.*, 1980, **41**, 953-954.
352. RAYNAUD JP, COTARD M, ANDRE F, MIALOT JP, ROLLAND PH, MARTIN PM. Spontaneous canine mammary tumours: a model for human endocrine therapy. *J. Ster. Biochem.*, 1981, **15**, 201-207.
353. REGUERA MJ, RABANAL RM, PUIGDEMONT A, FERRER L. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *Am. J. Dermatopathol.*, 2000, **22**, 49-54.
354. REIMANN N, BULLERDIEK J, NOLTE I *et al.* Trisomies in canine tumors. 12th European Colloquium on Cytogenetics in Domestic Animals, 25-28 june 1996, Zaragoza, Spain.
355. REIMANN N, BARNITZKE S, BULLERDIEK J, SCHMITZ U, ROGALLA P, NOLTE I, RONNE. An extended nomenclature of the canine karyotype. *Cytogenet Cell. Genet.*, 1996, **73**, 140-144.
356. REIMANN N, NOLTE I, BARNITZKE S *et al.* Clonal structural aberrations in canine tumors: preferential involvement of the X-chromosome. 12th European Colloquium on Cytogenetics in Domestic Animals, 25-28 june 1996, Zaragoza, Spain.
357. REIMANN N, NOLTE I, BARNITZKE S, BULLERDIEK J. Re: Sit, DNA, Sit: Cancer genetics going to the dogs. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999, **91**, 1688-1689.
358. RESTUCCI B, PAPPARELLA S, DE VICO G, MAIOLINO P. E cadherin expression in normal and neoplastic canine mammary gland. *J. Comp. Pathol.*, 1997, **116**, 191-202.
359. RIDINGER K, ILG EC, NIGGLI FK, HEIZMAN CW, SCHAFER BW. Clustered organization of S100 genes in human and mouse. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1998, **1448**, 254-263.
360. ROHAN TE, HARTWICK W, MILLER B, KANDL RA. Immunohistochemical detection of c-erbB2 and p53 in benign breast disease and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, **90**, 1262-1269.
361. ROSENBLATT LS, BOOK SA, GOLDMAN M. Effect of X-irradiation of young female beagles on life span and tumor incidence. In: THOMPSON RC, MEHAFFEY JA, editors. *Life-span radiation effects studies in animals: what can they tell us ?*, Office of Scientific and Technical Information, US Department of Energy, Washington DC, 1986, 628-645.
362. ROSENTHAL FM, ZIEN KS, GANSBACHER B. Human tumor vaccines and genetic engineering of tumors cytokines and histocompatibility genes to enhance immunogenicity. *Curr. Opinion Oncol.*, 1996, **6**, 611-615.
363. ROUNTREE MR, BACHMAN KE, HERMAN JG, BAYLIN SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene*, 2001, **20**, 3156-3165.
364. ROUS P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumour cells. *J. Exp. Med.*, 1911, **13**, 397-411.
365. RUNGSIPAT A, TATEYAMA S, YAMAGUCHI R, UCHIDA K, MIYOSHI N, HAYASHI T. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *J. Vet. Med. Sci.*, 1999, **61**, 27-32.
366. RUNGSIPAT A, TATEYAMA S, YAMAGUCHI R, UCHIDA K, MURAKAMI Y, MIYOSHI N, HAYASHI T. Amplification of the c-yes oncogene in canine mammary tumors. *J. Vet. Med. Sci.*, 1999, **61**, 185-189.
367. RUNGSIPAT A, TATEYAMA S, YAMAGUCHI R, UCHIDA K. Expression of c-yes oncogene product in various animal tissues and spontaneous canine tumours. *Res. Vet. Sci.*, 1999, **66**, 205-210.

368. RUSSO J, GUSTERSON B, ROGERS A, RUSSO I, WELLINGS S, VAN ZWEITEN M. Biology of disease: comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab. Invest.*, 1990, **62**, 244-278.
369. RUSSO J, HU YF, YANG X, RUSSO IH. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 2000, **27**, 17-37.
370. RUTTEMAN GR. Hormones and mammary tumour disease in the female dog. An update. *In vivo*, 1990, **4**, 33-40.
371. RUTTEMAN GR. Contraceptive steroids and the mammary gland: is there a hazard? *Breast Cancer Res. Treat.*, 1992, **23**, 29-41.
372. RUTTEMAN GR, MISDORP W. Hormonal background of canine and feline mammary tumours. *J. Reprod. Fertil., Suppl.*, 1993, **47**, 483-487.
373. RUTTEMAN GR, CORNELISSE CJ, DIJKSHOORN NJ, POORTMAN J, MISDORP W. Flow cytometric analysis of DNA ploidy in canine mammary tumors. *Cancer Res.*, 1988, **48**, 3411-3418.
374. RUTTEMAN GR, MISDORP W, BLANKENSTEIN NMA, VAN DEN BROM WE. Oestrogen and progestin receptors in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *Breast Cancer*, 1988, **58**, 594-599.
375. RUTTEMAN GR, BEVERS MM, MISDORP W, VAN DEN BROM WE. Anterior pituitary function in female dogs with mammary tumors : II . Prolactin. *Anticancer Res.*, 1989, **9**, 241-245.
376. SABBAH M, COURILLEAU D, MESTER J, REDEUILH G. Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP responser-like element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, **96**, 11217-11222.
377. SAGARTZ JE, BODLEY WL, GAMBLIN RM, COUTO CG, TIERNEY LA, CAPEN CC. P53 tumor suppressor protein overexpression in osteogenic tumors of dogs. *Vet. Pathol.*, 1996, **33**, 213-221.
378. SALISBURY JL, WHITEHEAD CM, LINGLE WL, BARRET SL. Centrosome and cancer. *Biol. Cell.*, 1999, **91**, 451-460.
379. SANCHO-GARNIER H. Epidémiologie des cancers du sein. *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1998, **182**, 1621-1633.
380. SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-termination inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 1977, **74**, 5493-5467.
381. SATO T, TANIGAMI A, YAMAKAWA K, AKIYAMA F, KASUMI F, SAKAMOTO G, NAKAMUA Y. Allelotype of breast cancer : cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Research*, 1990, **50**, 7184-7189.
382. SAUNDERS KA, MADEWELL BR, OREFFO VI, KRAEGEL SA, GUMERLOCK PH. Nucleotide sequence of canine c-N-ras : codons 1 to 71. *Am. J. Vet. Res.*, 1992, **53**, 600-603.
383. SAWHNEY N, HALL PA. Ki-67 –Structure, function and new antibodies. *J. Pathol.*, 1992, **168**, 161-162.
384. SCANZIANI E, CANIATTI M, SEN S, ERBA E, CAIROLI F, BATTOCCHIO M. Flow cytometric analysis of cellular DNA content in paraffin wax-embedded specimens of canine mammary tumours. *J. Comp. Path.*, 1991, **105**, 75-82.
385. SCHÄFER BW, HEIZMANN CW. The S100 family of EF-han calcium-binding proteins: fonctions and pathology. *Trends Biochem. Sci.*, 1996, **21**, 134-140.
386. SCHAFER KA, KELLY G, SCHRADER R, GTIFFITH WC, MUGGENBURG BA, TIERNEY LA, LECHNER JF, JANOVITZ EB, HAHN FF. A canine model of familial mammary gland neoplasia. *Vet. Pathol.*, 1998, **35**, 168-177.
387. SCHMITT FC. Multistep progression from an oestrogen-dependent growth towards an autonomous growth in breast carcinogenesis. *Eur. J. Cancer*. 1995, **31A**, 2049-2052.
388. SCHNEIDER R, Comparaison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer*, 1970, **26**, 419-426.
389. SCHNEIDER R, DORN CR, TAYLOR DON. Factors influencing canine mammary development and post-chirurgical survival. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1969, **43**, 1249-1261.

390. SCHROEDER JA, LEE DC. Dynamic expression and activation of ERBB receptors in the developing mouse mammary gland. *Cell Growth Differ.*, 1998, **9**, 451-464.
391. SCHWAB M. Amplification of oncogenes in human cancer cells. *BioEssays*, 1998, **20**, 473-479.
392. SEACHRIST L. Man's best friend may be companion in cancer research. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1993, **85**, 1455-1456.
393. SEIDMAN H. Cancer of the breast. Statistical and epidemiological data. *Cancer*, 1969, **24**, 1355.
394. SEKI T, FUJII G, MORI S, TAMAOKI N, SHIBUYA M. Amplification of c-yes-1 proto-oncogene in a primary human gastric cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1985, **76**, 907-910.
395. SELDEN JR, MOORHEAD PS, OEHLMERT ML, PATTERSON DF. The giemsa banding pattern of the canine karyotype. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 1975, **15**, 308-387.
396. SELMAN PJ, MOL JA, RUTTEMAN GR, VAN GARDEREN E, RIJNBERK A. Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology*, 1994, **134**, 287-292.
397. SEMBA K, YAMANASHI Y, NISHIZAWA M, SUKEGAWA J, YOSHIDA M, SASAKI M et al. Location of the c-yes gene on the human chromosome and its expression in various tissues. *Science*, 1984, **227**, 1038-1040.
398. SENECHAT O. L'acromégalie et la polydysendocrinie liée au cycle oestral chez la chienne. *Point Vét.*, 2000, **31**, 403-410.
399. SERRANO M. The tumor suppressor protein p16/ink4a. *Exp. Cell. Res.*, 1997, **237**, 7-13.
400. SESHDADRI R, LEONG ASY, MC CAUL K, FIRGAIRA FA, SELTUR V, HORSFALL DJ. Relationship between p53 gene abnormalities and other tumour characteristics in breast cancer prognosis. *Int. J. Cancer*. 1996, **69**, 135-141.
401. SETOGUCHI A, SAKAI T, OKUDA M, MINEHATA K, YAZAWA M, ISHIZAKA T, WATARI T, NISHIMURA R, SASAKI N, HASEGAWA A, TSUJIMOTO H. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 2001, **62**, 433-9.
402. SETOGUCHI A, OKUDA M, NISHIDA E, YAZAWA M, ISHIZAKA T, HONG SH, HISASUE M et al. Results of hyperamplification of centrosomes in naturally developing tumors of dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 2001b, **62**, 1134-1141.
403. SFACTERIA A, CERVASI B, BERTANI C, PAIARDINI M, COSTANTINO G, PIEDIMONTE A, DE VICO G. Update on animal models for testing innovative antineoplastic strategies : the mammary tumor in dogs. *Chir. Ital.*, 2001, **53**, 857-868.
404. SHAK S. Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin. Oncol.*, 1999, **26**, 78-83.
405. SHERR CJ. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependant kinases. *Gene Dev.*, 1995, **9**, 1149-1163.
406. SHERR CJ. The pezcoller lecture : cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.*, 2000, **60**, 3689-3695.
407. SHOFER FS, SONNENSCHEIN EG, GOLDSCHMIDT MH, LASTER LL, GLICKMAN LT. Histopathology and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1989, **13**, 49-60.
408. SICINSKY P, WEINBERG RA. A specific role for cyclin D1 in mammary gland development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 1997, **2**, 335-342.
409. SIDRANSKY D, VON ESCHENBACH A, TSAI YC, JONES P, SUMMERHAYES I, MARSHALL F. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*, 1991, **252**, 706-709.
410. SLAMON DJ, CLARCK GM, WONG SG, LEVIN WJ, ULRICH A, Mc GUIRE WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987, **235**, 177-182.
411. SLAMON DJ, LEYLAND-JONES B, SHAK S, FUCHS H, PATON V, BAJAMONDE A, FLEMING T et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.*, 2001, **344**, 783-792.
412. SMITH SA, EASTON DE, EVANDS DGR, PONDER BAJ. Alleles losses in the region 17q12-q21 in familial breast and ovarian cancer non-randomly involve the wild type chromosome. *Nature Genet.*, 1992, **2**, 128-131.

413. SONNENSCHEIN EG, GLICKMAN LT, GOLDSCHMIDT MH, MAC KEE LJ. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Am. J. Epidemiol.*, 1991, **133**, 694-703.
414. SORIA, JC, RIXE O. Télomères, télomérase et cancer. *Bull. Cancer*, 1997, **84**, 963-970.
415. SOUSSI T. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol. Med., Today*, 1996, **2**, 32-37.
416. SOUSSI T. Cycle cellulaire et apoptose : le gene suppresseur de tumeur *p53*. *Med. Sci.*, 2000, **16**, 469-472.
417. SOUSSI T. P53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res.*, 2000, **60**, 1777-1788.
418. SOUSSI T. Polymorphismes et mutations du gène p53 : quelles relations dans la susceptibilité au cancer ? In : *Eurocancer 2001*, Paris : John Libbey Eurotext, 2001, 159-161. URL [<http://eurocancerjle.com/articles/2001/159-161.htm>] (consulté le 23 juin 2001).
419. SOUSSI T. p53 web site at the Institut Curie [en-ligne], Mise à jour mai 2002 [<http://p53.curie.fr>], (consulté le 7 juin 2002).
420. SOUSSI T, MAY P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J. Mol. Biol.*, 1996, **260**, 623-637.
421. SOUSSI T, DEHOUCHE K, BEROUD C. L'analyse des mutations du gène p53 dans les cancers humains : le lien entre l'épidémiologie et la carcinogenèse. *Med. Sci.*, 2000, **16**, 1387-1396.
422. SOUSSI T, DEHOUCHE K, BEROUD C. p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum. Mutat.*, 2000, **15**, 105-113.
423. SPENCER CA, GROUDINE M. Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv. Cancer Res.*, 1991, **56**, 1-48.
424. STANLEY LA. Molecular aspects of chemical carcinogenesis: the roles of oncogenes and tumour suppressor genes. *Toxicology*, 1995, **96**, 173-194.
425. STARK A, HULKA BS, JOENS S, NOVOTNY D, THOR AD, WOLD LE *et al.* HER-2/neu amplification in benign breast disease and the risk of subsequent breast cancer. *J Clin Oncol*, 2000, **18**, 267-269.
426. STOVRING M, MOE L, GLATTRE A. A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *APMIS*, 1997, **105**, 590-596.
427. STRANDBERG JD. Animal model of human disease. Bresat cancer. Animal model: canine mammary neoplasia. *Am. J. Pathol.*, 1974, **75**, 225-228.
428. STRECKFUS C, BIGLER L, TUCCI M, THIGPEN JT. A preliminary study of CA15-3, c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, cathepsin-D and *p53* in saliva among women with breast carcinoma. *Cancer Invest.*, 2000, **18**, 101-109.
429. SUGAWARA K, SUGAWARA I, SUKEGAWA J, AKATSUKA T, YAMAMOTO T, MORITA M *et al.* Distribution of c-yes-1 gene product in various cells and tissues. *Br. J. Cancer*, 1991, **63**, 508-513.
430. SUGINO T, YOSHIDA K, BOLODEOKU J, TAHARA H, BULEY I, MANEK S *et al.* Telomerase activity in human breast cancer and in benign breast lesions: diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle aspirates. *Int. J. Cancer*, 1996, **69**, 301-306.
431. SUKEGAWA J, SEMBA K, YANASHI Y, NISHIZAWA M MIYAJIMA N, YAMAMOTO T, TOYOSHIMA K. Characterization of cDNA clones for the human c-yes gene. *Mol. Cell. Biol.*, 1987, **7**, 41-47.
432. SWIFT M, MORREL, MASSEY RB, CHASE CL. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxiatelangiectasia. *New Engl. J. Med.*, 1991, **325**, 1831-1836.
433. SWITONSKY M. Committee for the Standardisation of Canine Karyotype. Second International DOGMAP Meeting, Cambridge, UK, 1995.
434. SZABO CI, WAGNER LA, FRANCISCO LV, ROACH JC, ARGONZA R, KING MC, OSTRANDER EA. Human, canine and murine *BRCA1* genes: sequence comparison among specie. *Hum. Mol. Genet.*, 1996, **5**, 1289-1298.

435. TAGU D. *Principes des techniques de biologie moléculaire*. Paris: INRA, 1999, 131p.
436. TAP OT, RUTTEMAN GR, ZIJLSTRA C, DE HAAN NA, BOSMA AA. Analysis of chromosome aberrations in a
mammary car
y

476.

(ca(ihomaes)Tj0.00131 Tc 0.0232 Tw 9 0 0 91591.9903 070.8002 Tm  cattle, horses, u)Tj9 0 0 9 213260691 070.8002 Tm cats u

457. VELDHOEN N, STEWART J, BROWN R, MILNER J. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. *Oncogene*, 1998, **16**, 249-255.
458. VELDHOEN N, METCALFE S, MILNER J. A novel exon within the mdm2 gene modulates translation initiation in vitro and disrupts the p53-binding domain of mdm2 protein. *Oncogene*, 1999, **18**, 7026-7033.
459. VELDHOEN N, WATTERSON J, BRASH M, MILNER J. Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. *Br. J. Cancer*, 1999, **81**, 409-415.
460. VIEL E. Cancer du sein : l'intérêt diagnostique du lavage des galactophores. *Lancet*, 2001, 1335-1336.
461. VIGNAUX F, HITTE C, PRIAT C, CHUAT JC, ANDRE C, GALIBERT F. Construction and optimization of a dog whole-genome radiation hybrid panel. *Mamm. Genome*, 1999, **10**, 888-894.
462. VIGNAUX F, PRIAT C, JOUQUAND S, HITTE C, JIANG Z, CHERON A, RENIER C, ANDRE C, GALIBERT F. Toward a dog radiation hybrid map. *J. Hered.*, 1999, **90**, 62-67.
463. VOGELSTEIN B, KINZLER KW. p53 function and dysfunction. *Cell*, 1992, **70**, 523-526.
464. VOGELSTEIN B, KINZLER KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.*, 1993, **9**, 138-141.
465. WAKUI S, MUTO T, YOKOO R, TAKAHASHI H, MASAOKA T, HANO H, FURUSATO M. Prognostic status of p53 gene mutation in canine mammary carcinoma. *Anticancer Res.*, 2001, **21**, 611-616.
466. WALKER D. Mammary adenomas in a male dog – Probable oestrogenic neoplasms. *J. Small Anim. Pract.*, 1968, **9**, 15-20.
467. WALKER RA, JONES L, CHAPPELL S, WALSH T, SHAW JA. Molecular pathology of breast cancer and its application to clinical management. *Cancer Metastasis Rev.*, 1997, **16**, 5-27.
468. WANG H, FEDOROFF S. Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nat. New Biol.*, 1972, **235**, 52-54.
469. WANG Y, CORTEZ D, YAZDI P, NEFF N, ELLEDGE SJ, QIN J. BASC a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.*, 2000, **14**, 927-939.
470. WATSON PH, SAFNECK JR, LE K, UBIK D, SHIU RP. Relationship of c-myc amplification to progression of breast cancer from in situ to invasive tumor and lymph node metastasis. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1993, **85**, 902-907.
471. WATZINGER F, LION T. RAS family. *Atlas Genet Cytogenet Oncol. Hematol.* [on-line], 1999 [<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/ras.html>], (consulté 21/10/01).
472. WATZINGER F, MAYR B, GAMERITH R, VETTER C, LION T. Comparative analysis of ras proto-oncogene
, 10-198m mues/c0s(i.)Tj9|0 0 9 128.3f#32 328.3401 Tm|sel, o

481. WRIGHT WE, SHAY J. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat. Med.*, 2000, **6**, 849-851.
482. WU X, BAYLE JH, OLSON D, LEVINE AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.*, 1993, **7**, 1126-1136.
483. WYNFORD-THOMAS D. p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry ? *J. Pathol.*, 1994, **172**, 1-4.
484. YIN YX, TAINSKY MA, BISCHOFF FZ, STRONG LC, WAHL GM. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell*, 1992, **70**, 937-948.
485. YAMADA KM, ARAKI M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signalling, growth, migration and apoptosis. *J. Cel. Sci.*, 2001, **114**, 2375-2382.
486. YAMAGAMI T, KOBAYASHI K, SUGIYAMA M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *J. Vet. Med. Sci.*, 1996, **58**, 1079-1083.
487. YAZAWA M, OKUDA M, SETOGUCHI A, NISHIMURA R, SASAKI N, HASEQAWA A, WATARI T, TSUJIMOTO H. Measurement of telomerase activity in dog tumors. *J. Vet. Med. Sci.*, 1999, **61**, 1125-1129.
488. YAZAWA M, OKUDA M, SETOGUCHI A, IWABUCHI S, NISHIMURA R, SASAKI N, MASUDA K, OHNO K, TSUJIMOTO H. Telomere lenght and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, **62**, 1539-1543.
489. ZALCMAN G. Biologie du cancer bronchique : de la paillasse aux thérapeutiques innovantes. *Médecine thérapeutique*. 2001, **7**, 528-44.
490. ZHAO YH, KREUGER JG, SUDOL M. Expression of cellular-yes protein in mammalian tissues. *Oncogene*, 1990, **5**, 1629-1635.
491. ZHAO DM, TATEYAMA S, MIYOSHI N, YAMAGUCHI R, UCHIDA K, KAI K *et al*. Human c-yes-1 related proto-oncogene in clinically normal dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 1994, **56**, 177-179.
492. ZHAO DM,

**LES APPORTS DE LA GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE
À LA CANCÉROLOGIE VÉTÉRINAIRE :
EXEMPLE DES TUMEURS MAMMAIRES DE LA CHIENNE**

NOM et Prénom : BEDU Nathalie

RESUME :

Les progrès de ces 25 dernières années ont permis d'identifier et de caractériser les acteurs moléculaires du processus de cancérisation. C'est grâce aux techniques de génétique moléculaire que la conception du cancer vu comme maladie du génome a émergé. Ainsi la carcinogenèse est un processus qui résulte de l'expansion clonale d'une cellule acquérant, par le jeu de l'accumulation de mutations génétiques, des avantages de croissance.

Après avoir décrit les principaux acteurs moléculaires du processus de cancérisation et les connaissances acquises sur les altérations génétiques observées dans les tumeurs humaines, nous montrerons dans une deuxième partie que des études relativement récentes ont abouti, grâce à l'utilisation d'outils moléculaires, à la mise en évidence dans les cellules de tumeurs mammaires canines, d'anomalies somatiques (mutations, surexpression ou amplification) de gènes déjà fortement incriminés pour leurs rôles dans la pathogénie des tumeurs du sein chez la femme. Des observations concernant la réactivation de la télomérase et l'expression de la cycline D1 suggèrent pourtant l'existence de différences inter-espèces dans les mécanismes moléculaires à la base de la Cancérogenèse mammaire.

Enfin, une dernière partie permet d'exposer des exemples pratiques d'application de l'analyse moléculaire aux différents domaines de la Cancérologie clinique chez l'Homme. Elle permet également de montrer que l'approche génétique du cancer du Chien profite de l'expérience acquise en génétique du cancer chez l'Homme. Cependant, même si les études exposées ouvrent des perspectives intéressantes, elles sont trop peu nombreuses pour trouver une application pratique véritable en Cancérologie vétérinaire avant plusieurs années.

Mots-Clés :

Cancérologie, tumeur mammaire, carnivore, chienne, génétique moléculaire.

JURY :

Président : Pr
Directeur : Dr BELLIER Sylvain
Assesseur : Dr TIRET Laurent
Invité : Dr DEVAUCHELLE Patrick

Adresse de l'auteur :

Melle BEDU Nathalie
16 rue de la Saulas
41 000 BLOIS

**CONTRIBUTION OF MOLECULAR GENETICS
TO VETERINARY CANCER RESEARCH :
EXAMPLE OF MAMMARY TUMORS IN DOGS**

SURNAME : BEDU

Given name : Nathalie

SUMMARY :

Progress of these 25 last years made it possible to identify and characterize the molecular actors of the fundamental mechanisms of the tumorigenesis. Thanks to the molecular genetic technologies, the design of cancer as a disease of the genome emerged. Thus tumorigenesis is a process that results from the clonal growth of a cell gaining, by the play of genetic changes accumulation, growth advantages.

After reviewing the current research into genetic bases of cancer and alterations to a number of genes that appear to be of importance in a proportion of human cancers, we show in a second part, that relatively recent studies succeeded, thanks to the use of molecular technologies, in revealing in canine mammary tumors cells, somatic abnormalities (mutation, surexpression or gene amplification) of genes 0 0 12 262.72097204 470.36096 genes 0 0 12 262 260 0 pr