

LES MARQUEURS DE PROLIFERATION EN ONCOLOGIE VETERINAIRE : APPLICATIONS A L'ETUDE PRONOSTIQUE DU MASTOCYTOME CUTANE CANIN.

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Jérôme ABADIE
Thèse soutenue le 09/11/01

À Monsieur le Professeur DELSOL

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Anatomie pathologique

Qui nous a fait l'immense honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse

Hommage respectueux.

À Monsieur le Professeur DELVERDIER

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Histologie, Anatomie Pathologique

Qui nous a proposé le sujet de cette thèse et guidé avec bienveillance dans sa réalisation

Pour nous avoir montré la voie,

Sincères remerciements.

À Mademoiselle le Docteur TRUMEL

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie médicale des équidés et carnivores

Qui nous a fait le plaisir et l'honneur de participer à notre jury de thèse

Profonde reconnaissance.

À Madame BOURGES-ABELLA et Madame le Docteur RAYMOND-LETRON

Maîtres de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Histologie, Anatomie Pathologique

Qui nous ont fait l'honneur de s'intéresser à notre travail et d'assister à sa soutenance

Profonde reconnaissance.

À Madame FRECHOU-AMARDEILH

Du Laboratoire d'Anatomie pathologique de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Sans laquelle ce travail n'aurait pu être conduit

Sincère gratitude.

À Madame POUJADE

Du Laboratoire d'Anatomie Pathologique Vétérinaire du Sud-Ouest
Qui a mis à notre disposition la totalité des prélèvements utilisés dans cette étude

Sincère gratitude.

À tous les vétérinaires praticiens

Qui ont eu la gentillesse de répondre à notre sollicitation
Dont l'indispensable collaboration a permis de mener à bien ce travail

Sincère gratitude.

À tous les chiens Boxer...

« Il y a toujours un ciel »

Proverbe africain

À Marie-Louise et Enrique
Pour la bonté, la fierté et le courage partagés
Vous me donnez chaque jour toutes les forces

À ma mère et à mon père
Modèles d'amour, de gentillesse, de justice et de paix
Vous me montrez à chaque instant l'exemple

À ma famille, à mes amis
Responsables de mon bilan T.T.N. (Tarbes-Toulouse-Nantes) largement positif
Pour ce que nous avons partagé, partageons et partagerons
Vous m'autorisez l'espoir de croire en la prochaine et éclatante victoire des gentils

À Bettina, la plus belle chose qui me soit jamais arrivée
Tu m'as offert tant de bonheur
Mais le meilleur est à venir...

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
LES MARQUEURS DE PROLIFERATION EN ONCOLOGIE VETERINAIRE	6
Introduction.....	6
I. Le cycle cellulaire : déroulement, mécanismes et régulation.....	9
I.A. La prolifération cellulaire : généralités	9
I.A.1. Populations cellulaires dans un organisme et capacités prolifératives	9
I.A.2. Différentes phases du cycle cellulaire	9
I.A.3. Chronologie du cycle cellulaire	10
I.B. L'entrée dans le cycle cellulaire	11
I.B.1. Le signal de prolifération	11
I.B.2. La transmission intracellulaire du signal de prolifération	11
I.C. Déroulement et mécanismes des différentes phases du cycle cellulaire	13
I.C.1. Les phases de croissance G1 et G2.....	13
I.C.2. La réplication de l'ADN : phase S du cycle cellulaire	13
I.C.3. Le déroulement de la mitose : phase M du cycle cellulaire	15
I.D. Mécanismes généraux du contrôle du cycle cellulaire.....	16
I.D.1. Les CDK et cyclines	16
I.D.2. Le point de restriction et les points de contrôles (checkpoints).....	18
I.E. Mécanismes de contrôle spécifiques des transitions du cycle cellulaire.....	20
I.E.1. Régulation des phases précoces du cycle : progression en G1 et transition G1-S	20
I.E.2. Régulation des phases tardives du cycle : transition G2-M et progression de la mitose	21
II. La prolifération cellulaire en oncologie : significations et techniques d'étude	24
II.A. Biologie et cinétique de la prolifération cellulaire néoplasique et de la croissance tumorale	24

II.A.1. Les cycles cellulaires normaux et néoplasiques : analogies et différences.....	24
II.A.2. Bases moléculaires et géniques de la prolifération cellulaire néoplasique	25
II.A.3 La croissance tumorale.....	26
II.A.3.a. <i>Les paramètres de la croissance tumorale</i>	26
II.A.3.b. <i>Le temps de doublement : intérêt en clinique oncologique</i>	28
II.B. Techniques d'étude de la prolifération : applications en clinique oncologique.....	29
II.B.1. Techniques d'incorporation.....	29
II.B.1.a. <i>Principe général</i>	29
II.B.1.b. <i>Intérêts et limites en clinique oncologique vétérinaire</i>	30
II.B.2. Analyse du contenu cellulaire en ADN.....	31
II.B.2.a. <i>Principe général</i>	31
II.B.2.b. <i>Intérêts et limites en clinique oncologique vétérinaire</i>	32
II.B.3. Index mitotique	33
II.B.3.a. <i>Principe général</i>	33
II.B.3.b. <i>Intérêts et limites en clinique oncologique vétérinaire</i>	33
II.B.4. Organismes nucléolaires (AgNORs)	35
II.B.4.a. <i>Principe général</i>	35
II.B.4.b. <i>Intérêts et limites en clinique oncologique vétérinaire</i>	35
II.B.5. Détection immunohistochimique des marqueurs de prolifération	37
II.B.5.a. <i>Principe général</i>	37
II.B.5.b. <i>Intérêts et limites en clinique oncologique vétérinaire</i>	38
III. Les marqueurs de prolifération cellulaire PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et Ki-67.....	40
III.A. L'antigène nucléaire de prolifération cellulaire ou Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) : biologie et utilisation comme marqueur de prolifération.....	40
III.A.1. Historique et découverte	40
III.A.2. De la structure à la fonction.....	41
III.A.3. Expression durant le cycle cellulaire	42
III.A.4. Significations biologiques et utilisations comme marqueur de prolifération.....	44
III.B. L'antigène Ki-67 : biologie et utilisation comme marqueur de prolifération.....	45
III.B.1. Historique et découverte	45
III.B.2. De la structure à la fonction.....	46
III.B.3. Expression durant le cycle cellulaire	48
III.B.4. Significations biologiques et utilisations comme marqueur de prolifération.....	50
III.C. Utilisations de la détection des marqueurs de prolifération PCNA et Ki-67 en oncologie vétérinaire	52

III.C.1. Détection immunohistochimique des marqueurs de prolifération PCNA et Ki-67 sur tissus animaux.....	52
III.C.2. Applications à l'évaluation pronostique et thérapeutique en oncologie vétérinaire spontanée.....	53
III.C.2.a. <i>Tumeurs mammaires</i>	54
III.C.2.b. <i>Lymphomes malins</i>	55
III.C.2.c <i>Autres types tumoraux</i>	56
Conclusion.....	59

ETUDE EXPERIMENTALE

APPLICATION DE LA DETECTION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DES MARQUEURS DE PROLIFERATION PCNA ET Ki-67 A L'ETUDE PRONOSTIQUE DU MASTOCYTOME CUTANE CANIN.. 61

Introduction.....	62
Matériels et méthodes.....	65
I. Matériel tumoral	65
II. Fiche de renseignements.....	65
III. Analyse histopathologique	66
IV. Immunohistochimie.....	67
IV.A. Modes opératoires	67
IV.B. Quantifications des marquages	67
IV.C. Déterminations des index de prolifération Ki-67 et PCNA	68
V. Analyse statistique	68
V.A. Généralités	68
V.B. Tests statistiques	69
V.B.1. Applications aux résultats de l'analyse histologique	69
V.B.2. Applications aux résultats de l'analyse immunohistochimique	69
Résultats.....	71
I. Caractéristiques épidémiologiques de la population	71
I.A. Répartition selon l'âge.....	71
I.B. Répartition selon le sexe	71
I.C. Répartition selon la race.....	71
I.D. Répartition selon la localisation tumorale.....	72
II. Résultats clinico-pathologiques.....	72
II.A. Taux et durée de survie	72
II.B. Comportement biologique et évolution	73
II.B.1. Récidive locale	73
II.B.2. Écllosion multicentrique	73
II.B.3. Dissémination métastatique	74
III. Résultats de l'analyse histologique (grading).....	74
III.A. Répartition en fonction du grade histologique	74
III.B. Étude de survie en fonction du grade histologique	75

IV. Résultats de l'analyse immunohistochimique (détection des marqueurs de prolifération)	75
IV.A. L'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA)	75
IV.A.1. Caractéristiques du marquage	75
IV.A.2. Corrélations des marquages	76
IV.A.3. Statistiques descriptives	76
IV.A.4. Signification pronostique	77
IV.B. L'antigène Ki-67	78
IV.B.1. Caractéristiques du marquage	78
IV.B.2. Corrélations des marquages	78
IV.B.3. Statistiques descriptives	79
IV.B.4. Signification pronostique.....	79
IV.C. Corrélation des marquages Ki-67 et PCNA	81
V. Etude particulière des tumeurs de différenciation intermédiaire (grade 2 de Patnaik).....	81
V.A. Population d'étude	81
V.B. Caractéristiques descriptives des immunomarquages PCNA et Ki-67	81
V.C. Valeur pronostique du marqueur de prolifération PCNA.....	82
V.D. Valeur pronostique du marqueur de prolifération Ki-67.....	82
V.E. Valeur pronostique de la détection associée des marqueurs de prolifération Ki-67 et PCNA.....	83
V.F. Protocole d'immunomarquage proposé pour les tumeurs de grade 2	84
Discussion.....	86
CONCLUSION GENERALE.....	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	100
ANNEXES	113

LISTE DES FIGURES

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- Figure 1** Populations cellulaires dans un organisme et phases du cycle cellulaire
- Figure 2** Transduction du signal prolifératif par la cascade MAP (Mitogen Activated Protein) kinase
- Figure 3** Représentation schématique des différentes étapes de la mitose
- Figure 4** Fonctionnement général du système CDK/cycline dans le contrôle du cycle cellulaire
- Figure 5** Régulation de l'activité des kinases dépendantes des cyclines (CDK)
- Figure 6** Schéma général et principaux acteurs de la régulation des phases et transitions du cycle cellulaire
- Figure 7** Représentation schématique de la croissance tumorale
- Figure 8** Localisations cellulaire et fonctions des produits des gènes associés au cancer (oncogènes, anti-oncogènes ou gènes suppresseurs du cancer, gènes de réparation de l'ADN et gènes régulant l'apoptose)

ETUDE EXPERIMENTALE

- Figure 1** Aspects microscopiques caractéristiques des trois grades histologiques des mastocytomes cutanés canins
- Figure 2** Répartition des mastocytomes cutanés canins en fonction de l'âge d'apparition
- Figure 3** Répartition des mastocytomes cutanés canins selon la race
- Figure 4** Répartitions corporelles des localisations des mastocytomes cutanés canins
- Figure 5** Analyse de survie (Méthode de Kaplan-Meier) basée sur les trois grades histologiques de mastocytomes

- Figure 6** Aspects microscopiques du marquage obtenu lors de la détection immunohistochimique de l'antigène PCNA
- Figure 7** Régression linéaire entre le comptage PCNA réalisé sur 1000 cellules tumorales et le comptage PCNA effectué sur 500 cellules tumorales
- Figure 8** Régression linéaire entre le comptage PCNA réalisé sur 1000 cellules tumorales et le comptage PCNA effectué par unité de surface tumorale (mm^2)
- Figure 9** Valeur moyenne (\pm écart type) du comptage PCNA pour 1000 cellules tumorales en fonction des trois grades histologiques
- Figure 10** Analyse de survie (Méthode de Kaplan Meier) basée sur l'index de prolifération PCNA
- Figure 11** Aspects microscopiques du marquage obtenu lors de la détection immunohistochimique de l'antigène Ki-67
- Figure 12** Régression linéaire entre le comptage Ki-67 réalisé sur 1000 cellules tumorales et le comptage Ki-67 effectué sur 500 cellules tumorales
- Figure 13** Régression linéaire entre le comptage Ki-67 réalisé sur 1000 cellules tumorales et le comptage Ki-67 effectué par unité de surface tumorale (mm^2)
- Figure 14** Valeur moyenne (\pm écart type) du comptage Ki-67 pour 1000 cellules tumorales, en fonction des trois grades histologiques
- Figure 15** Analyse de survie (Méthode de Kaplan Meier) basée sur l'index de prolifération Ki-67
- Figure 16** Régression linéaire entre le comptage Ki-67 et le comptage PCNA, réalisés sur 1000 cellules tumorales
- Figure 17** Analyse de survie (Méthode de Kaplan Meier) basée sur l'index de prolifération PCNA (valeur seuil de 50%), restreinte aux chiens porteurs de tumeurs de grade intermédiaire (grade 2 de Patnaik)
- Figure 18** Analyse de survie (Méthode de Kaplan Meier) basée sur l'index de prolifération Ki-67 (valeur seuil de 10%), restreinte aux chiens porteurs de tumeurs de grade intermédiaire (grade 2 de Patnaik)

LISTE DES TABLEAUX

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- Tableau I** Principaux facteurs de croissance et de prolifération cellulaire et leurs cibles cellulaires
- Tableau II** Principaux oncogènes et tumeurs humaines associées
- Tableau III** Principaux anti-oncogènes et tumeurs humaines associées
- Tableau IV** Principaux gènes régulant l'apoptose et la réparation de l'ADN et tumeurs humaines associées

ETUDE EXPERIMENTALE

- Tableau I** Grading histopathologique des mastocytomes cutanés du chien (d'après Patnaik et coll.,1984)
- Tableau II** Age moyen d'apparition et répartition des mastocytomes cutanés canins en fonction du sexe
- Tableau III** Répartitions corporelles en nombre de tumeurs et en pourcentage des 120 mastocytomes cutanés canins de notre étude
- Tableau IV** Taux de survie et de mortalité à 12, 18 et 24 mois après l'intervention chirurgicale pour les chiens porteurs de mastocytomes, selon le grade histologique de la tumeur
- Tableau V** Temps de survie (moyenne \pm écart-type, valeurs minimales et maximales) pour les chiens porteurs de mastocytome, en fonction du grade histologique des tumeurs
- Tableau VI** Comparaison entre les valeurs moyennes (\pm écart type) du nombre de noyaux PCNA positifs / 1000 cellules tumorales et des index de prolifération PCNA, entre les chiens porteurs de mastocytome vivants à la fin de l'étude et ceux morts (ou euthanasiés) des suites de leur mastocytome
- Tableau VII** Comparaison entre les valeurs moyennes (\pm écart type) du nombre de noyaux Ki-67 positifs / 1000 cellules tumorales et des index de prolifération Ki-67,

entre les chiens porteurs de mastocytome vivants à la fin de l'étude et ceux morts (ou euthanasiés) des suites de leur mastocytome

Tableau VIII Valeurs moyenne (\pm écart type) des index de prolifération Ki-67 à 12, 18 et 24 mois après l'intervention chirurgicale, selon le devenir des chiens porteurs de mastocytomes

Tableau IX Analyse statistique descriptive de l'index de prolifération PCNA (valeur moyenne \pm écart-type, valeurs minimale et maximale), restreinte à la population des tumeurs de grade intermédiaire (grade 2 de Patnaik), en fonction du devenir des chiens

Tableau X Analyse statistique descriptive de l'index de prolifération Ki-67 (valeur moyenne \pm écart-type, valeurs minimale et maximale), restreinte à la population des tumeurs de grade intermédiaire (grade 2 de Patnaik), en fonction du devenir des chiens

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1** Fiche de renseignements clinico-pathologiques des mastocytomes cutanés canins
- Annexe 2** Coloration par l'hémalum-éosine sur coupes tissulaires de prélèvements fixés au formol à 10% et inclus en paraffine
- Annexe 3** Réaction au bleu de toluidine sur coupes tissulaires de prélèvements fixés au formol à 10% et inclus en paraffine
- Annexe 4** Fiche d'examen histologique des mastocytomes cutanés canins
- Annexe 5** Détection immunohistochimique du marqueur de prolifération Ki-67 sur coupes tissulaires de prélèvements fixés au formol et inclus en paraffine à l'aide de l'anticorps MIB1
- Annexe 6** Détection immunohistochimique du marqueur de prolifération PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) sur coupes tissulaires de prélèvements fixés au formol et inclus en paraffine à l'aide de l'anticorps PC 10

GLOSSAIRE

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AgNOR : Argyrophilic Nucleolar Organizing Region

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BrdU : bromodeoxyuridine

CAK : CDK Activating Kinase

CDC : gènes (et protéines) du Cycle de Division Cellulaire

CDK : Cycline Dependent Kinase

CENPF : CENtromere Protein F

CKI : Cycline Dependent Kinase Inhibitor

G1, G2 : Gap 1, Gap 2 (phases du cycle cellulaire)

GADD : Growth Arrest and Death Domain

GTP : guanoside triphosphate

³H : thymidine tritiée

kDa : kilodalton

M : Mitosis (phase du cycle cellulaire)

MAP : Mitogen Activated Protein

NOR : Nucleolar Organizing Region

PEST : séquence d'acides aminés Proline, acide glutamique, Sérine et Thréonine

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

pRb : protéine du Rétinoblastome

RF-C : Replication Factor C

S : Synthesis (phase du cycle cellulaire)

SV40 : Simian Virus 40

Avant propos

L'oncologie représente un domaine de la médecine vétérinaire en expansion constante au cours de ces dernières années. La prévention des principales maladies d'origine infectieuse et la médicalisation croissante, associée à la mise en œuvre de moyens diagnostiques et thérapeutiques toujours plus performants, a fait grandement augmenter la longévité des animaux de compagnie. Aussi la prévalence des cancers, en tant que cause de mortalité directe ou indirecte chez les carnivores domestiques, n'a pas cessé de croître. Dans ce domaine comme dans la plupart des autres, les attentes voire les exigences de la clientèle sont de plus en plus en grandes; et l'annonce d'un diagnostic de cancer revêt en plus un aspect émotionnel, majoré par le profond attachement généré par les années de vie commune. Après suspicion, puis confirmation de l'origine néoplasique d'une affection, le praticien doit donc désormais être en mesure d'émettre un pronostic et de proposer un traitement.

Largement dépendante et tributaire à ses débuts du progrès des connaissances réalisé en médecine humaine, la cancérologie vétérinaire apparaît aujourd'hui clairement comme une discipline possédant ses caractéristiques propres et ses particularités. Elle a de fait acquise une certaine autonomie. Il n'en demeure pas moins que les mécanismes de transformation néoplasique et de développement des cancers sont vraisemblablement communs ou du moins largement comparables entre les espèces. Et les travaux de recherche en oncologie, fondamentale ou appliquée, dans une espèce, animale ou humaine, servent invariablement les intérêts des autres. Les progrès en cancérologie vétérinaire ont été effectifs dans tous les secteurs de la discipline. Mais c'est dans l'établissement d'un pronostic le plus précis possible de l'évolution du processus néoplasique, dont est d'ailleurs directement tributaire la mise en œuvre de modalités thérapeutiques adaptées, que se focalisent le plus grand nombre de travaux expérimentaux.

Dans ce cadre, l'étude anatomopathologique des tumeurs occupe une place de première importance en oncologie. Elle constitue l'étape incontournable du diagnostic, en permettant de reconnaître la nature tumorale d'une lésion et surtout d'en identifier le type histologique. C'est à partir de cette identification histologique précise, que peut et se formuler un pronostic et se définir une stratégie thérapeutique, en confrontation permanente avec le stade d'évolution clinique de l'affection, en particulier le bilan d'extension du processus tumoral. Développée primitivement et reposant encore largement sur des bases morphologiques, l'étude histopathologique des tumeurs est fondée sur l'appréciation de critères architecturaux, structuraux et cytologiques.

Mais, du fait des progrès spectaculaires de la biologie moléculaire, de la génétique et de l'immunologie, l'histologie est devenue aujourd'hui également histologie moléculaire, passant de science purement descriptive à l'étude *in situ* des molécules. Ce nouveau visage de l'histologie a connu son champ d'application le plus vaste en oncologie. Il a permis de seconder avantageusement les seuls critères morphologiques dans la détermination du phénotype néoplasique, par la détection de marqueurs spécifiques d'histogenèse et de différenciation cellulaire. Mais surtout, compte tenu des avancées de la cancérologie moléculaire, il a autorisé sur le plan théorique une compréhension de plus en plus fine de l'histoire naturelle de la maladie.

Bien que l'événement initial qui transforme une cellule normale en cellule néoplasique n'est pas complètement élucidé, il apparaît que la caractéristique majeure d'une cellule tumorale est de proliférer sans les contraintes fixées par l'homéostasie qui imposent normalement l'arrêt des divisions cellulaires. Par l'intermédiaire de leurs produits, oncogènes (littéralement gènes du cancer) et antioncogènes (ou gènes supresseurs de tumeurs) contrôlent de manière positive ou négative l'ensemble des réactions métaboliques impliquées dans la progression coordonnée du cycle cellulaire. De l'intensité relative des deux circuits opposés dépend la décision de rester pour une cellule donnée dans un état quiescent ou de s'engager vers la division cellulaire. Aussi, l'étude de la cinétique de prolifération cellulaire a au moins un triple intérêt en cancérologie. Sur un plan théorique tout d'abord, le cancer étant directement associé à un trouble de la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire, ces recherches aident à comprendre les mécanismes intimes, au niveau moléculaire, de cette complexe régulation. Ensuite il est aujourd'hui clairement admis que la prolifération cellulaire est fortement corrélée avec le comportement biologique dans un très grand nombre de types néoplasiques. Enfin, la cinétique cellulaire influence la radiosensibilité et la chimiosensibilité d'une tumeur, ouvrant des perspectives thérapeutiques à l'étude de la multiplication cellulaire.

L'étude du cycle cellulaire et de la prolifération des cellules cancéreuses peut avoir des approches statiques, dynamiques et biochimiques. En pathologie tumorale spontanée, la nature du matériel disponible, représenté dans l'immense majorité des cas par des pièces d'exérèse ou des biopsies tissulaires réalisées primitivement pour le diagnostic histopathologique d'affection, conduit à privilégier les techniques d'évaluation de la prolifération tissulaire utilisables sur coupes tissulaires. Parallèlement aux techniques d'évaluation strictement morphologique de l'activité proliférative, principalement représentées par l'évaluation sur coupes tissulaires du nombre de figures de mitose, des nouvelles méthodes d'analyse ont été progressivement développées et perfectionnées.

Parmi elles, ce sont les techniques immunohistochimiques, qui ont connu le plus grand développement ces dernières années, comme le révèle l'augmentation exponentielle du nombre de publications qui leur sont consacrées. Ces techniques, basées sur la détection sur coupes tissulaires de molécules à propriétés antigéniques, ont été rendues possible du fait de l'avancée spectaculaire des connaissances dans le domaine de l'oncologie moléculaire, dont elles ont par ailleurs été un des principaux acteurs. Cette détection se fait à l'aide d'anticorps, dont la fixation spécifique est révélée par une réaction colorimétrique enzymatique ou par une substance fluorescente. L'immunohistochimie est en fait une réaction immunologique *in situ* et son interprétation est associée à une analyse morphologique, en permettant ainsi de préciser au sein d'un tissu le type de la cellule contenant le signal et la topographie du signal dans la cellule. Alors que les premiers travaux expérimentaux étaient orientés vers l'utilisation de l'immunohistochimie pour déterminer l'histogénèse néoplasique, grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires de différenciation, l'objet des études récentes est clairement dirigé vers la recherche de marqueurs permettant de caractériser le potentiel biologique des tumeurs, et de fournir ainsi des méthodes objectives à visée pronostique. La division cellulaire des organismes multicellulaires est un phénomène étroitement régulé par différentes combinaisons de facteurs stimulateurs et inhibiteurs de la prolifération. Une grande variété de molécules représentent ainsi des cibles antigéniques potentielles pour définir la position de cellules au sein du cycle cellulaire et de ses différentes phases. Parmi ces molécules, certaines, dont l'expression est exclusivement associée ou au moins significativement augmentée lors du cycle cellulaire et susceptible de ce fait d'être détectée uniquement dans les cellules en phase active de prolifération, sont particulièrement intéressantes. Ces molécules, de nature quasi-exclusivement protéique, dont la présence détectée au sein d'une cellule signe la présence au sein du cycle de division cellulaire, sont appelées marqueurs de prolifération.

L'objet de notre étude expérimentale a été de déterminer l'intérêt de la détection immunohistochimique de deux marqueurs de prolifération dans l'étude pronostique d'une des tumeurs les plus fréquentes mais aussi imprévisible du chien, le mastocytome cutané canin. Les deux marqueurs qui ont retenu notre attention sont l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire ou PCNA, pour Proliferating Cell Nuclear Antigen, et l'antigène Ki-67.

Notre travail sera introduit par une revue bibliographique consacrée à la prolifération cellulaire et à ses techniques d'étude, et sera tout particulièrement axée sur les données récentes concernant les deux marqueurs de prolifération que nous avons utilisés.

Notre étude expérimentale, portant sur 120 chiens atteints de mastocytome cutané, tentera de démontrer l'intérêt que présente la détection immunohistochimique sur coupes tissulaires de ces marqueurs de prolifération dans l'étude pronostique de ce type tumoral. Elle visera à mettre en évidence tout particulièrement l'apport, à notre sens considérable, autorisé par la détection du marqueur Ki-67 dans la gestion clinique individuelle des chiens atteints par ce processus néoplasique, dont la fréquence, la variabilité d'évolution, et la gravité potentielle en font à la fois l'une des tumeurs majeures mais aussi des plus cliniquement déroutantes de l'oncologie vétérinaire.

Etude bibliographique

Les marqueurs de prolifération en oncologie vétérinaire

INTRODUCTION

La prolifération apparaît comme l'un des processus parmi les plus fondamentaux de la biologie cellulaire, impliquée dans tous les domaines de la vie des organismes pluricellulaires, tels que le développement embryonnaire, la croissance post-natale et le maintien permanent de l'homéostasie tissulaire par renouvellement cellulaire. Son importance en pathologie a été largement détaillée. Et en particulier il existe aujourd'hui peu de controverses au sujet de l'importance de la prolifération cellulaire en anatomie pathologique oncologique. Si l'évènement initial qui transforme une cellule normale en une cellule tumorale n'est pas encore complètement élucidé, la caractéristique majeure avérée d'une cellule tumorale est de proliférer sans les contraintes de l'homéostasie qui imposent normalement l'arrêt de la prolifération. Les cellules tumorales ne répondent plus à ces règles et continuent à se diviser.

L'étude et l'évaluation de la prolifération cellulaire apparaissent ainsi d'un grand intérêt au moins à deux niveaux de la transformation néoplasique. Tout d'abord et à un stade que l'on peut considérer comme précoce, la prolifération cellulaire est un événement précurseur et probablement prédictif de la tumorigénèse (Cohen et coll., 1990). Ensuite, et de façon plus appliquée à l'évaluation pronostique de maladies tumorales déclarées, de nombreuses études de la prolifération cellulaire, ayant concerné un grand nombre de types néoplasiques différents chez l'homme, ont montré que l'évaluation quantitative de l'activité proliférative d'un tissu tumoral pouvait permettre de prédire le comportement biologique et clinique d'un néoplasme.

Le concept de cycle cellulaire a été introduit par Howard et Pelc, il y a 50 ans (Howard et coll., 1951). Il n'a pas été depuis remis en question. Ainsi et d'une manière générale, la grande majorité des cellules d'un organisme pluricellulaire subit des modifications cycliques qui la conduisent à la division cellulaire et à la formation de deux cellules filles. Le cycle cellulaire peut être ainsi défini comme l'ensemble des modifications qu'une cellule subit entre sa formation par division de la cellule mère et le moment où cette cellule a fini de se diviser en deux cellules filles. Depuis, les connaissances de cet événement biologique cellulaire majeur ont considérablement progressé. Les mécanismes moléculaires de son déroulement et de son contrôle ont été largement étudiés et précisés. Les techniques d'étude du cycle et de la prolifération se sont multipliées et perfectionnées. L'enjeu est d'importance. Les progrès des connaissances dans ce domaine pourraient déboucher sur des applications cliniques majeures en cancérologie, en particulier en terme d'évaluation pronostique ou de décision thérapeutique.

Notre étude bibliographique présentera tout d'abord les caractéristiques majeures du cycle de prolifération cellulaire, tel qu'il peut intervenir dans une cellule normale, à la fois dans ses aspects descriptifs morphologiques à l'échelle cellulaire, mais également et surtout dans les mécanismes de son déroulement et de sa régulation à l'échelle moléculaire. Ces données nous permettront d'appréhender les bases moléculaires de la transformation et de la progression néoplasique, et les analogies et caractéristiques propres du cycle cellulaire tumoral par rapport au cycle normal de prolifération cellulaire. Elle essaiera enfin de détailler l'intérêt de l'étude de la prolifération cellulaire en oncologie et les techniques permettant de l'évaluer. Parmi celles-ci, une attention toute particulière sera apportée à la détection de l'expression des marqueurs de prolifération, avec un développement consacré aux deux principaux marqueurs utilisés à visée pronostique en cancérologie humaine et vétérinaire, et qui ont été employés dans notre étude expérimentale, l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire ou PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et l'antigène Ki-67.

I. LE CYCLE CELLULAIRE : DEROULEMENT, MECANISMES ET REGULATION

I.A. La prolifération cellulaire : généralités

I.A.1. Populations cellulaires dans un organisme et capacités prolifératives

L'ensemble des cellules de l'organisme peut être réparti en trois catégories en fonction de leur capacité de prolifération et des rapports qu'elles entretiennent avec le cycle cellulaire (Figure 1). Schématiquement et de façon générale, la plupart des tissus de l'organisme sont ainsi constitués d'une combinaison, en proportions variables, de trois populations cellulaires : des cellules en prolifération continue, des cellules quiescentes mais susceptibles si nécessaires d'entrer dans le cycle cellulaire, et des cellules non prolifératives définitivement exclues du cycle cellulaire, souvent dans un état très différencié (Leblond , 1963).

Les cellules en prolifération continue progressent en permanence dans les différentes phases du cycle cellulaire, d'une mitose à la suivante, les cellules filles issues d'une précédente division entrant immédiatement dans le cycle suivant.

Les cellules quiescentes se caractérisent par un faible niveau spontané de prolifération. Cependant ces cellules sont capables d'entrer rapidement dans le cycle cellulaire en réponse à un stimulus de prolifération. Ces cellules sont considérées comme en phase de repos et peuvent donc être recrutées pour entrer dans le cycle cellulaire par des facteurs inducteurs de prolifération.

Enfin les cellules non prolifératives correspondent à une population de cellules définitivement sorties du cycle cellulaire. Il s'agit le plus souvent de cellules dans un état de différenciation terminale, ayant a priori définitivement perdu toute capacité proliférative.

I.A.2. Différentes phases du cycle cellulaire

Le cycle de prolifération cellulaire est séparé en quatre phases :

- la phase G1 (G pour "gap", qui signifie intervalle) pendant laquelle la cellule grandit du fait de synthèses protéiques et se prépare à la duplication de son stock d'ADN,

- la phase S (S pour synthèse) pendant laquelle la cellule duplique son ADN et présente donc un contenu en ADN aneuploïde, c'est-à-dire compris entre $2N$ et $4N$
- la phase G2 qui est une autre phase de croissance durant laquelle la cellule se prépare à la mitose
- la phase M (M pour mitose) qui représente la division cellulaire proprement dite (Figure 1).

On sépare communément le cycle cellulaire en deux périodes : l'interphase et la mitose. L'interphase correspond aux trois temps G1, S et G2, c'est-à-dire à l'intervalle de temps séparant deux mitoses successives. Il existe, toutefois, deux exceptions à ce cycle classique. La première est constituée par les cellules qui à un moment de leur existence, fréquemment à un stade différencié, arrêtent de se diviser. Ces cellules quittent soit définitivement le cycle cellulaire, soit seulement de façon temporaire et sont alors dans une phase de quiescence appelé G0, par analogie avec les phases de croissance G1 et G2 du cycle. La seconde exception est représentée par des cellules qui ne présentent pas de phase G1, chaque phase M étant immédiatement suivie par une phase S. Le principal exemple de ces cellules en cycle continu et accéléré est constitué par les cellules embryonnaires (Poirier et coll., 1997).

I.A.3. Chronologie du cycle cellulaire

La durée du cycle et de ses différentes phases apparaît éminemment variable selon les types cellulaires, et selon les tissus, qu'ils soient normaux ou néoplasiques. Une durée moyenne globale de 2 à 4 jours est généralement proposée pour un cycle cellulaire se déroulant dans des conditions normales. Cependant, et de façon générale, les durées relatives des différentes phases les unes par rapport aux autres apparaissent relativement constantes, quelle que soit la durée totale du cycle, et l'on a pu définir des intervalles de temps au sein desquels les durées des différentes phases du cycle évoluaient. Ainsi la phase S peut être estimée comme durant entre 6 et 12 heures, la phase G2 entre 1 et 6 heures et la phase M durerait généralement entre 1 et 2 heures (Hall et coll., 1990). Pour la phase G1, la définition d'un tel intervalle est très difficile, puisque cette phase est celle qui est susceptible de présenter les plus fortes variations de durée à la fois entre types cellulaires différents mais également au sein d'un même type cellulaire en fonction des conditions de stimulation extrinsèques et intrinsèques. Elle est toutefois considérée comme la phase la plus longue du cycle cellulaire.

A noter que la phase de mitose, seule phase morphologiquement identifiable du cycle, est de loin la plus brève et ne représente qu'une très faible proportion par rapport à la durée totale du cycle cellulaire.

I.B. L'entrée dans le cycle cellulaire

I.B.1. Le signal de prolifération

Dans les conditions normales, l'entrée dans le cycle cellulaire est contrôlée essentiellement par l'intermédiaire de facteurs chimiques présents dans le microenvironnement cellulaire. Ces facteurs, de nature variable, sont capables soit de stimuler soit au contraire d'inhiber la prolifération, selon les besoins de l'homéostasie tissulaire. Ainsi un excès de facteurs stimulateurs ou un défaut de facteurs inhibiteurs sont à l'origine d'une croissance tissulaire avec un gain cellulaire global, par l'intermédiaire d'une augmentation de la fraction tissulaire proliférative. L'action des facteurs stimulateurs de la prolifération cellulaire peut correspondre à un raccourcissement de la durée du cycle cellulaire (principalement par une réduction de la durée de la phase G1) mais les mécanismes les plus importants sont ceux qui induisent le recrutement de cellules quiescentes ou au repos dans le cycle cellulaire (Cotran et coll., 1999).

Au niveau cellulaire, la prolifération est initiée par la fixation d'une molécule, le plus souvent un facteur de croissance ou une hormone, sur un récepteur spécifique. Ce récepteur, de nature protéique, peut être localisé au niveau membranaire à la surface cellulaire, ou au sein du cytoplasme cellulaire, voire au niveau nucléaire. Le récepteur présente une spécificité de liaison pour son ligand et le complexe résultant de l'association du récepteur et du ligand initie une réponse cellulaire spécifique.

Un grand nombre de facteurs de croissance stimulant la prolifération cellulaire ont été isolés durant les deux dernières décennies (Tableau I). Leur nom découle, en première intention, de celui du type cellulaire à partir duquel ils ont été isolés ou pour lequel leur action trophique fut la première fois mis en évidence *in vitro*. Cependant, à quelques exceptions près, leur spectre d'action est le plus souvent large et ces facteurs protéiques ubiquitaires sont capables de stimuler la prolifération d'un grand nombre de types cellulaires différents dans l'organisme (Tableau I).

I.B.2. La transmission intracellulaire du signal de prolifération

La réponse cellulaire à un facteur de prolifération correspond à un signal transmis jusqu'au sein du noyau cellulaire et mettant en jeu des cascades de signalisation intracellulaires, appelées systèmes de transduction du signal. Ces systèmes de transduction correspondent au processus par lequel un signal extracellulaire (ici la fixation d'un facteur de prolifération sur son récepteur) est reconnu et converti en une signalisation intracellulaire générant une ou des réponses cellulaires spécifiques. Ces systèmes de signalisation intracellulaire se caractérisent par une série d'activation moléculaire, basée le plus souvent sur des phosphorylations en chaîne catalysées par des protéines kinases (Alberts et coll., 1995). Ces phosphorylations séquentielles de molécules de signalisation intermédiaires aboutissent à terme à l'activation de facteurs de transcription nucléaire, dont la translocation dans le noyau et la fixation au niveau de l'ADN, engendrent l'activation de l'expression de gènes spécifiques stimulant, dans le cas de la transduction d'un signal de prolifération, l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire.

Parmi les différents systèmes de transduction impliqués dans l'intégration et la transmission du signal de prolifération cellulaire induits par les facteurs de croissance, le système mettant en jeu la kinase MAP, pour Mitogen-Activated Protein, joue un rôle de tout premier plan. En guise d'exemple, ce système de signalisation et les différents acteurs mis en jeu sont représentés dans la Figure 2.

Les systèmes de transduction du signal aboutissent à un transfert de l'information au noyau cellulaire où se déroulent des changements spécifiques dans la régulation de l'expression de certains gènes. Cette régulation a lieu essentiellement au niveau transcriptionnel et est contrôlée par l'activation de facteurs régulateurs appelés facteurs de transcription. Ces facteurs possèdent une structure modulable, composée de plusieurs domaines spécifiques, dont principalement des domaines de liaison à l'ADN et des domaines de régulation de la transcription (Cotran et coll., 1999). Les domaines de liaison à l'ADN permettent au facteur de transcription de s'associer à des séquences nucléotidiques spécifiques par l'intermédiaire de différents mécanismes moléculaires (liaisons par homéodomains, par domaines à doigt de zinc...). Les domaines de régulation transcriptionnelle oriente l'activité du facteur soit vers l'augmentation de la transcription (domaine activateur) soit vers la diminution (domaine répresseur) de l'activité transcriptionnelle (Tijan et coll., 1994).

Les facteurs de transcription subissent une phosphorylation par des protéines kinases spécifiques, activées lors de la transduction du signal de prolifération, et ces phosphorylations sont susceptibles de modifier la localisation cellulaire du facteur (translocation nucléaire) ou son affinité à l'ADN, et donc son activité régulatrice de l'expression génique (Hill et coll., 1995). Les facteurs de transcription interviennent ainsi de façon directe ou indirecte dans la régulation du cycle cellulaire.

I.C. Déroulement et mécanismes des différentes phases du cycle cellulaire

I.C.1. Les phases de croissance G1 et G2

La phase G1 (correspondant à l'intervalle séparant, pour une population cellulaire en cycle continu, la fin de la mitose et le début de la synthèse d'ADN) et la phase G2 (correspondant à l'intervalle entre la fin de la synthèse de l'ADN et le début de la mitose) appartiennent à l'interphase du cycle cellulaire. Elles représentent un temps supplémentaire réservé à la croissance cellulaire, permettant à la cellule d'augmenter son volume cytoplasmique avant de se diviser (Alberts et coll., 1995).

Pendant la phase G1, la cellule contrôle son environnement et sa propre taille puis, le moment venu, elle s'engage dans le cycle cellulaire en s'orientant vers la phase de réplication de son ADN. Bien que la longueur de toutes les phases du cycle soit variable, la plus grande variation, dans la majorité des types de cellules communément étudiés, concerne la phase G1. C'est durant cette phase, en particulier par l'intermédiaire de l'action des facteurs de croissance, que la cellule se détermine définitivement vers la réalisation ou non de la division cellulaire. En effet après franchissement d'un point situé en fin de G1, la cellule parcourra forcément les phases suivantes du cycle ou, en cas de dommages irréparables de l'ADN, préexistant ou survenant lors de sa réplication, mourra et sera éliminée.

La phase G2 fournit un espace de sécurité, permettant à la cellule de s'assurer que la réplication de son ADN est bien complète avant de commencer la mitose. Durant cette phase, les mécanismes de surveillance immunitaire et les systèmes de réparation de l'ADN sont potentiellement mis en jeu pour détecter et corriger toute anomalie survenue durant la phase S de duplication du génome.

I.C.2. La réplication de l'ADN : phase S du cycle cellulaire

Pour que la division cellulaire puisse donner naissance à deux cellules filles contenant les mêmes informations génétiques, il est nécessaire qu'avant la division le contenu d'ADN de la cellule soit dupliqué. Ceci est réalisé durant la phase S du cycle par la réplication de l'ADN. La réplication fait intervenir de nombreux systèmes enzymatiques, agissant de façon séquentielle et coordonnée.

La principale famille d'enzymes intervenant dans cet événement correspond à celle des ADN polymérases qui assurent la duplication de la double hélice. Au cours de la réplication de l'ADN, chacune des chaînes de la double hélice d'ADN sert de matrice pour la fabrication d'une chaîne entièrement nouvelle. De ce fait, chaque gène est présent non plus en deux mais quatre copies, deux d'origine maternelle et deux d'origine paternelle, et chacune des deux cellules filles d'une cellule qui se divise hérite d'une nouvelle double hélice d'ADN contenant une ancienne et une nouvelle chaîne (Alberts et coll., 1995).

Cependant pour que les ADN polymérases puissent catalyser la polymérisation des nucléotides triphosphates de la chaîne complémentaire à partir de la chaîne matrice, la double hélice doit être, successivement, déroulée, ouverte, puis les deux brins écartés, afin d'être accessible aux systèmes enzymatiques assurant sa réplication. Deux types de protéines de réplication contribuent à ce processus : les ADN hélicases d'une part et des protéines de déstabilisation de la double hélice et de liaison à l'ADN simple brin d'autre part, qui facilitent l'ouverture de la chaîne double brin et stabilisent l'ADN monocaténaire. Ensuite, la synthèse d'un brin complémentaire, qui débute en plusieurs sites d'origine, appelés fourches de réplication et dont le nombre est estimé entre 20 000 et 30 000 par cellule, peut être assurée par les ADN polymérases, l'action de ces dernières nécessitant par ailleurs au niveau de ces fourches de réplication la coopération de protéines non enzymatiques agissant comme cofacteurs.

La plupart des molécules d'ADN polymérases synthétisent d'elles-mêmes des fragments de chaînes nucléotidiques de façon discontinue avant de se séparer de la chaîne matrice d'ADN. Ces fragments seront ensuite secondairement soudés entre eux par une autre famille d'enzymes, les ADN ligases. Enfin, du fait de la disposition topographique naturelle enroulée de la double hélice, l'ouverture et le déroulement de l'ADN lors de la progression de la fourche de réplication le long des chromosomes provoquent d'importantes forces de tension dues au superenroulement de l'hélice d'ADN parentale en avant de la fourche.

Pour lutter contre ces problèmes de tension d'enroulement excessive, des enzymes spécifiques, les ADN topoisomérases catalysent des réactions de coupure réversible, mono- ou bicaténaire, permettant aux deux parties de l'hélice d'ADN, de part et d'autre de la coupure, de pivoter librement l'une par rapport à l'autre, dans la direction qui réduit la tension. Cette coupure transitoire est suivie d'une soudure avec reconstitution spontanée. La duplication de l'ADN met ainsi en jeu une véritable machinerie de réplication multienzymatique.

Après la phase de réplication de l'ADN proprement dite, il existe un temps essentiel celui du contrôle de la réplication à la recherche d'erreurs de lecture des polymérase et de leur réparation éventuelle. Ce mécanisme de réparation de l'ADN dépend de la présence de deux copies séparées de l'information génétique sur chacun des brins de la double hélice d'ADN. Ainsi la présence d'une lésion accidentelle sur l'un des brins, survenue lors de sa réplication, va être reconnue et excisée par des enzymes spécifiques, appelées nucléases de réparation de l'ADN, qui hydrolysent les liaisons qui unissent les nucléotides erronés ou endommagés au reste de la molécule d'ADN, laissant une brèche dans l'hélice dans cette région. Les brèches créées par les événements d'excision sont comblées par l'intervention des ADN polymérase, qui fabriquent une copie complémentaire de l'information stockée dans la chaîne "correcte", servant de matrice. Enfin, la cassure ou "coupure", laissée dans la chaîne endommagée lorsque l'ADN polymérase a comblé la brèche, est soudée par un troisième type d'enzyme, l'ADN ligase, qui complète et termine le processus de reconstitution.

L'ADN polymérase et l'ADN ligase jouent donc des rôles généraux majeurs dans le métabolisme de l'ADN, agissant par exemple toutes les deux dans la réplication de l'ADN ainsi que dans la réparation de l'ADN.

I.C.3. Le déroulement de la mitose : phase M du cycle cellulaire

Les modifications morphologiques accompagnant le déroulement de la mitose sont aujourd'hui bien connues. Même s'il existe des variations selon le type cellulaire et selon l'organisme étudié, le schéma général de la division cellulaire mitotique comprend six étapes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase, la télophase et la cytotérièse (Figure 3).

De façon très schématique et simplifiée, la prophase est marquée par la formation du fuseau mitotique et la condensation de la chromatine en chromosomes. Au cours de cette phase, la chromatine qui est sous forme diffuse pendant l'interphase se condense progressivement pour donner naissance aux chromosomes. Chaque chromosome est formé de deux brins d'ADN identiques issus de la réplication de la phase S, les chromatides, unis en un point spécifique appelé centromère. Le fuseau mitotique est une structure du cytosquelette composée de microtubules et de protéines associées, au sein de laquelle on distingue deux types de fibres : des fibres polaires qui s'étendent d'un pôle fusorial à l'autre et des fibres des kinétochores qui sont attachées aux centromères et s'étendent à un des deux pôles du fuseau.

La prométaphase débute par la disparition brutale de l'enveloppe nucléaire et est ensuite marquée par le développement des kinétochores, systèmes fibrillaires permettant l'ancrage des chromosomes au fuseau mitotique, au niveau des centromères. Deux kinétochores, orientés en directions opposées, se forment par chromosome.

A la métaphase, les chromosomes se déplacent par rapport au fuseau mitotique et s'alignent sur un même plan situé au niveau de la région médiane, aussi appelée équatoriale, du fuseau. La figure réalisée est de ce fait appelée plaque équatoriale.

L'anaphase est caractérisée par la séparation des deux chromatides de chaque chromosome, chacune migrant vers l'un des deux pôles du fuseau. Ce mouvement est dû au raccourcissement des fibres des kinétochores solidaires des centromères. Pendant cette phase, le fuseau mitotique grandit, si bien que les deux pôles du fuseau s'éloignent.

Au cours de la télophase, une enveloppe nucléaire se reforme autour des chromatides-filles et simultanément, les chromosomes, sous forme de chromatides, se décondensent.

La cytotélière correspond au clivage du cytoplasme pour permettre la formation de deux cellules-filles. La membrane cellulaire se creuse d'un sillon de clivage perpendiculaire à l'axe du fuseau. Ce sillon se creuse progressivement jusqu'à ce que ses deux bords se joignent, donnant naissance à la partition cellulaire.

I.D. Mécanismes généraux du contrôle du cycle cellulaire

La division cellulaire n'est que la phase la plus spectaculaire du cycle cellulaire. En effet, tout au long des différentes phases du cycle, se déroulent une série d'activations et d'interactions

moléculaires beaucoup moins retentissantes a priori mais d'importance considérable dans le contrôle et la régulation de la progression du cycle. Ces événements biochimiques permettent d'assurer une haute fidélité de la transmission de l'information génétique au cours de la division cellulaire.

Le contrôle du cycle cellulaire met en jeu deux grands types généraux de mécanismes à l'échelle moléculaire. Le premier correspond à une série de phosphorylations protéiques en cascade mettant en jeu principalement deux familles de protéines spécifiques du cycle cellulaire, les cyclines et les CDK (pour cyclin dependent protein kinase ou protéine kinase dépendante des cyclines). Le second mécanisme fait intervenir un ensemble d'étapes clés ou "check points", représentant de véritables systèmes cellulaires internes de contrôle, permettant en particulier à la cellule de retarder sa progression à travers le cycle cellulaire si certains événements normaux préalables n'ont pas été réalisés.

I.D.1. Les CDK et cyclines

Le système de contrôle du cycle cellulaire est basé sur deux familles de protéines clés. La première est une famille de protéines kinases cycline-dépendantes ou CDK, qui induisent et coordonnent les processus en aval essentiels à la duplication et à la division des constituants de la cellule. Comme toutes les protéines kinases, les CDK agissent en phosphorylant des protéines spécifiques, tout particulièrement pour cette famille sur des résidus sérine et thréonine. La famille des CDK comprend chez les cellules eucaryotes huit membres aujourd'hui identifiés, dénommés par les initiales CDK suivies par les chiffres de 1 à 8. La seconde est une famille de protéines spécialisées, appelées cyclines, qui se lient aux molécules CDK et contrôlent leur capacité à phosphoryler les protéines cibles appropriées.

L'assemblage cyclique, l'activation et le désassemblage des complexes cycline / CDK sont les principaux événements sur lesquels reposent le cycle cellulaire (Arellano, 1997). Les cyclines sont appelées ainsi parce qu'elles subissent un cycle de synthèse et de dégradation à chaque étape du cycle de division de la cellule. Sept familles de cyclines, dénommées par les lettres A, B, C, D, E, F et G, ont été à ce jour mises en évidence dans les cellules de mammifères. Parmi elles, seules cinq ont cependant des fonctions clairement identifiées dans la régulation du cycle.

Elles se répartissent en deux classes : les cyclines G1 (correspondant aux familles C, D et E) qui se lient aux molécules CDK pendant la phase G1 et sont nécessaires pour l'entrée en phase S, et les

cyclines mitotiques (correspondant aux familles A et B), qui se lient aux molécules CDK pendant la phase G2 et sont nécessaires à l'entrée en mitose.

Les différentes phases et transitions du cycle cellulaire sont donc caractérisées et gouvernées par différentes combinaisons d'associations entre cyclines et CDK, l'interaction avec une cycline entraînant des modifications structurales essentielles à l'activité catalytique des CDK (Morgan, 1995). Un schéma général simplifié du rôle des complexes CDK / cycline dans la progression du cycle cellulaire est représenté Figure 4.

La régulation générale de l'activité des différents complexes CDK / cycline est assurée par trois types différents de mécanismes, représentés Figure 5. Le premier mécanisme, fondamental, fait intervenir essentiellement l'expression différentielle des différentes classes de cycline au cours de la progression du cycle. En effet, le niveau d'expression des différentes CDK a été déterminé comme demeurant quasiment invariant durant le cycle. Par contre, le niveau d'expression des différentes familles de cyclines varie spécifiquement durant les différentes phases du cycle cellulaire. Leur activité est maximale au moment où elles atteignent leur pic d'expression (spécifique pour chaque famille de cycline d'une phase donnée du cycle cellulaire) puis disparaît du fait de leur dégradation rapide lorsque la cellule parvient à la phase suivante du cycle cellulaire (Evans et coll., 1983) (Figure 4). Cette dégradation met principalement en jeu le système ubiquitine-protéasome. Dans ce système les protéines devant être éliminées sont d'abord conjuguées à un petit cofacteur protéique, l'ubiquitine, puis la protéine ubiquitinée modifiée est spécifiquement reconnue et dégradée par le protéasome, un volumineux complexe protéolytique multimérique macromoléculaire (Deshaies, 1995).

Par ailleurs, hormis par le contrôle de leur synthèse et de leur dégradation, l'activité des complexes cycline-CDK est régulée par l'activité d'autres protéines enzymatiques, de type kinase et phosphatase, modulant leur action. En effet l'ajout ou le retrait de groupements phosphates en certaines localisations du site catalytique des CDK, modulent directement l'affinité et donc l'activité de ces enzymes. Ainsi et par exemple, la famille des phosphatases CDC25, dont plusieurs isoformes ont été identifiées, participent à ce processus en déphosphorylant et activant les kinases CDK (Grana et coll., 1995) (Figure 5).

Enfin un niveau de régulation supplémentaire est assuré par l'implication de protéines appelées inhibiteurs des CDK ou CKI (Cyclin-dependant Kinases Inhibitors), qui permettent de moduler

l'activité des kinases CDK. Les CKI sont synthétisés lors de la mise en jeu de voies de signalisation inhibitrices de la prolifération et agissent en bloquant, par différents mécanismes, l'activité des complexes cycline / CDK (Figure 5). Ces inhibiteurs sont regroupés en deux grandes sous-familles, celle de la protéine p21 (comprenant trois protéines p21, p27 et p57) qui participe à l'arrêt du cycle cellulaire induit par la présence de lésions de l'ADN en se liant aux complexes cycline / CDK qu'ils inactivent, et celle de la protéine p16 (comprenant quatre protéines p16, p15, p18 et p19) qui participe au contrôle de la transition G1/S en dissociant les complexes cycline-CDK de la phase G1 (Arellano et coll., 1997).

I.D.2. Le point de restriction et les points de contrôles (checkpoints)

Par ailleurs ont été définies, dans le déroulement du cycle cellulaire, plusieurs étapes privilégiées dans le déroulement de sa progression. L'une de ces étapes correspond au point de restriction. Comme indiqué précédemment, les facteurs de croissance ont une action inductrice de la prolifération sur des cellules en phase G0 ou G1 du cycle. Leur action principale correspond à la stimulation d'entrée dans le cycle cellulaire pour des cellules en phase G0. Cependant pour des cellules entrant dans le cycle de prolifération et présentes en début de la phase G1, la suppression des facteurs de croissance et donc de leur action stimulatrice conduit à une sortie précoce du cycle et à retour des cellules en phase G0. Par contre, pour des cellules engagées plus en avant dans la phase G1, le retrait des facteurs de croissance n'empêche pas la progression dans le cycle et le déclenchement de la phase S consécutive. Le point en G1 à partir duquel les cellules ne répondent plus à l'action inhibitrice sur la prolifération d'un retrait des facteurs de croissance est appelé le point de restriction (Pardee, 1974). Il correspond au moment où les cellules sont définitivement engagées dans la progression le long du cycle de prolifération, jusqu'à la division cellulaire proprement dite, sans retour en arrière possible.

Le second type d'étapes clés dans la progression du cycle cellulaire correspond aux points de contrôles ou " checkpoints ". Ces points de contrôle du cycle cellulaire ont été définis comme des systèmes de signalisation qui contrôlent la progression du cycle en assurant l'interdépendance entre des processus biologiques impliqués dans la prolifération cellulaire mais qui ne sont pas directement reliés entre eux d'un point de vue biochimique (Elledge, 1996).

Si le terme de point de contrôle suggère l'existence d'événements caractérisés se déroulant à des moments précis dans le cycle, les modalités de déclenchement, les mécanismes moléculaires et les temps et durée d'action de ces systèmes de contrôle ne sont pas tous à l'heure actuelle complètement définis. Ils permettent quoi qu'il en soit à la cellule de retarder voire d'arrêter sa progression au cours du cycle cellulaire si certains événements normaux préalables n'ont pas été réalisés. Au niveau de ces points de contrôle peuvent, en particulier, être détectées des anomalies dans la réplication ou la réparation de l'ADN ou dans la ségrégation des chromosomes, détection induisant l'envoi de signaux moléculaires à la machinerie du cycle cellulaire afin d'arrêter sa progression. Ainsi, à leur niveau, l'arrêt du cycle permet de disposer d'un délai nécessaire à la réparation des anomalies détectées, diminuant de ce fait les risques de mutations. Ces arrêts de progression du cycle peuvent intervenir soit par l'intervention de facteurs inhibiteurs de l'activité des complexes cycline / CDK, soit par la répression des facteurs activateurs de ces complexes (Cotran et coll., 1999).

Différents processus intrinsèques ou extrinsèques peuvent ainsi activer différents points de contrôle et stopper la progression du cycle cellulaire. Un exemple de facteur intrinsèque est représenté par la taille de la cellule, un volume cellulaire minimal étant nécessaire à une cellule pour parvenir jusqu'à la division et la répartition de ce volume en deux cellules filles viables. Pour les facteurs extrinsèques, la disponibilité en éléments nutritifs est, par exemple, un facteur limitant de la prolifération pour tous les types cellulaires, déterminant si et à quelle vitesse une cellule peut progresser le long du cycle.

Les agents induisant des dommages sur l'ADN (physiques, chimiques ou biologiques) déclenchent également des mécanismes de contrôle conduisant à l'arrêt en phase G1 ou G2 du cycle cellulaire. Un arrêt en phase G1 permet par exemple d'initier une réparation de l'ADN, avant la phase de réplication, tandis qu'un arrêt en phase G2 autorise une réparation du génome avant la ségrégation chromosomique mitotique. Les cellules peuvent également ralentir leur progression en phase S, si une phase de réplication allongée est nécessaire en cas d'un ralentissement anormal des mécanismes de duplication de l'ADN (Alberts et coll., 1995).

I.E. Mécanismes de contrôle spécifiques des transitions du cycle cellulaire

I.E.1. Régulation des phases précoces du cycle : progression en G1 et transition G1-S (Figure 6)

Les cyclines contrôlant la phase G1 appartiennent au groupe D (D1, D2, D3) et sont synthétisées sous l'action d'une stimulation extérieure provenant des facteurs de croissance. En l'absence de stimulation externe, le taux des cyclines D diminue rapidement. Dans ce cas, si la cellule est en phase G1 précoce, elle ne peut plus entrer en phase S. Par contre, si la cellule est dans une autre phase du cycle, la chute des cyclines D n'a aucun effet. Ainsi, ce phénomène agit sélectivement sur l'entrée en phase S (point de contrôle spécifique de la phase S).

Les cyclines D se lient aux CDK 4 ou aux CDK 6, durant la phase G1 précoce. La protéine codée par le gène du rétinoblastome (ou pRb) est le principal substrat de ces complexes cycline D/CDK4 ou cycline D/CDK6 de la phase G1. Cette protéine pRB, dont le nom découle de son isolement lors d'études réalisées sur une maladie entraînant une tumeur rétinienne génétiquement déterminée, est capable de se lier à des facteurs de transcription qu'elle inhibe, dont le principal est dénommé E2F. Sous sa forme active non phosphorylée, la protéine pRb inhibe ainsi la transition G1/S en séquestrant le facteur de transcription E2F. Lorsque pRb est phosphorylée par le complexe cycline / CDK en fin de G1, elle ne peut plus inhiber ce facteur transcriptionnel qui peut alors agir sur l'ADN et activer les gènes nécessaires à la réplication, c'est-à-dire au déroulement de la phase S (Cotran et coll., 1999). Parmi les gènes dont la transcription est activé par le facteur E2F, se trouve celui de la cycline E, dont la synthèse est ainsi activement induite en fin de G1. Cette cycline peut alors s'associer avec CDK2 et le complexe cycline E / CDK2 ainsi constitué contrôle la transition entre la phase G1 et la phase S du cycle cellulaire.

Le point de contrôle gouvernant la transition entre les phases G1 et S met en jeu également des mécanismes visant à empêcher la réplication d'un ADN endommagé. Le principal d'entre eux correspond à l'activation d'un gène majeur dans le contrôle de la prolifération cellulaire, le gène p53. Ce dernier est en effet activé lors de la détection de lésions de l'ADN et son produit, la protéine p53 est alors activement synthétisée. La protéine p53 a de multiples fonctions dans le déroulement du cycle cellulaire, principalement durant la phase G1, gouvernant lorsque cela est nécessaire l'arrêt

de progression du cycle lors de cette phase précoce. Cette activité de contrôle passe par la reconnaissance et la liaison de la protéine p53 sur différentes formes de lésions de l'ADN, comme les fragments d'ADN simple brin, les territoires d'insertion ou de délétion et les terminaisons d'ADN libres.

Par ailleurs, la protéine p53 présente également une activité de facteur de transcription par l'intermédiaire d'un domaine de liaison sur l'ADN spécifique de certaines séquences nucléotidiques (Zambetti et coll., 1992). Ainsi, la protéine p53 stimule, à la suite de dommages détectés sur l'ADN, la transcription de la protéine p21 qui inhibe l'activité des CDK de la phase G1 (Waldman et coll., 1995). Par ailleurs, en cas de dommages sévères et irréparables de l'ADN, la protéine p53, après l'arrêt du cycle cellulaire, stimule le déclenchement d'un processus de mort cellulaire par apoptose (Levine, 1997). Ce rôle proapoptique de cette protéine qui a valu à la protéine p53 le nom de "gardien du génome" a fait et fait encore aujourd'hui l'objet de nombreuses études. Bien que fondamental, il ne sera pas évoqué dans cette revue bibliographique principalement consacré à l'étude du cycle cellulaire.

La progression en phase S est gouverné par le complexe cycline A/CDK2, constitué à la faveur du remplacement de la cycline E sur le complexe qui dirigeait la transition G1/S. Le rôle de ce complexe spécifique de la phase S est de contrôler l'activité des systèmes de duplication de l'ADN. Il est également responsable de l'activation d'un autre complexe, constitué de l'association de la cycline B et de la CDK1, intervenant directement dans la régulation des phases tardives du cycle (phases G2 et M).

I.E.2. Régulation des phases tardives du cycle : transition G2-M et progression de la mitose (Figure 6)

Lorsque la cellule progresse dans la phase G2, le complexe cycline A / CDK2 est inactivé par la dégradation active de la cycline A. La cycline B est alors activement synthétisée et se lie spontanément à CDK1 exprimée de façon constitutive. Le complexe cyclineB / CDK1 ainsi formé est nécessaire pour l'entrée en phase M du cycle. Durant la phase G2, CDK1 peut également s'associer spontanément avec la cycline A, le complexe ainsi formé intervenant également dans la préparation de la division cellulaire, en assurant la phosphorylation de protéines impliquées en particulier dans la réorganisation du cytosquelette (dont les lamines) et dans le remodelage de la

structure de la chromatine. La transition entre les phases G2 et M du cycle cellulaire correspond au second point de contrôle majeur du cycle cellulaire. Il veille à prévenir la ségrégation chromosomique si ceux-ci ne sont pas intègres et intacts. En cas en particulier de détection de cassure de l'ADN double brin chromosomique, la survenue de la phase de mitose est retardée.

La mitose est contrôlée à trois niveaux successifs : initiation de la prophase, initiation de l'anaphase et remise à zéro du cycle cellulaire. L'initiation de la prophase est directement contrôlée par le taux de cycline B. A partir d'un certain seuil et après une période de latence, la cycline B active les facteurs déclenchant la mitose, par l'intermédiaire du complexe protéique cycline B / CDK1. CDK1 doit être phosphorylée sur un résidu thréonine pour être active, phosphorylation réalisée par la kinase activant la CDK1 (CAK pour CDK Activating Kinase). La kinase CAK doit être elle aussi activée par une phosphorylation. Ainsi, il existe une cascade régulatrice permettant d'aboutir à l'activation de CDK1. De plus, pour être active, CDK1 doit être déphosphorylée sur un résidu tyrosine situé dans le site catalytique de l'enzyme. Cette déphosphorylation est assurée par la phosphatase CDC25, dont l'activité est elle-même hautement régulée. Ce schéma simplifié rend compte de la complexité des phénomènes régulateurs de ces étapes préparatoires à la mitose. Le complexe cycline B / CDK1 ainsi activé assure alors la phosphorylation d'une grande variété de protéines impliquées directement dans le déroulement des phases précoces de la mitose, intervenant par exemple dans la dépolymérisation de l'enveloppe nucléaire et la formation du fuseau mitotique (Grana et coll., 1995).

À partir de la métaphase, le complexe CDK1/cycline B active les systèmes de dégradation des cyclines. Cette activation a pour conséquence une destruction du complexe et l'entrée en anaphase. On pense que ces systèmes de dégradation des cyclines agissent également sur une protéine, encore inconnue, mais possédant des motifs structuraux proches de ceux des cyclines. Cette protéine serait responsable de la liaison entre les deux chromatides au niveau des centromères. Ainsi, sa destruction permet la séparation des deux chromatides, c'est-à-dire l'anaphase.

A noter qu'après la mitose le devenir des cellules filles est également contrôlé, en permettant éventuellement d'amener les cellules vers le cycle cellulaire suivant. Ce dernier mécanisme de contrôle, décidant de l'entrée dans un nouveau cycle cellulaire, est encore très mal compris. Il veille quoi qu'il en soit à ce que une nouvelle phase M ne puisse survenir en absence de phase S, par l'intermédiaire d'une étape de contrôle qui surveille que la phase S a bien été complète. Si celle-ci

est incomplète, la survenue d'une phase M est inhibée par phosphorylation d'un résidu tyrosine situé dans le site catalytique de la protéine kinase CDK1 (Arellano et coll., 1997).

La réalisation d'une nouvelle division cellulaire ferait intervenir des mécanismes qui assurent la stabilisation de la cycline B, d'où son accumulation progressive. Ainsi au cours des phases G1, S et G2, le taux de cycline B augmente pour atteindre le seuil qui permet le déclenchement de la mitose suivante.

II. LA PROLIFERATION CELLULAIRE EN ONCOLOGIE : SIGNIFICATIONS ET TECHNIQUES D'ETUDE

II.A. Biologie et cinétique de la prolifération cellulaire néoplasique et de la croissance tumorale

II.A.1. Les cycles cellulaires normaux et néoplasiques : analogies et différences

L'étude du cycle cellulaire, de ses mécanismes et de son contrôle, a considérablement progressé grâce aux travaux expérimentaux effectués sur des cellules et tissus néoplasiques, sièges précisément d'une dérégulation de l'activité proliférative. Mais, réciproquement, les connaissances des mécanismes moléculaires associés à la transformation cancéreuse ont largement explosé avec la mise en évidence du mode d'action cellulaire des facteurs de croissance, de la transduction du signal de prolifération et dans les mécanismes de l'induction de l'expression des gènes impliqués dans le contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire normale. Il apparaît ainsi que la prolifération cellulaire, qu'elle soit normale ou tumorale, met en jeu les mêmes mécanismes de signalisation moléculaire. L'expression des gènes codant pour les différents acteurs impliqués dans ces processus est strictement régulée lors de la prolifération cellulaire normale accompagnant la croissance ou la régénération tissulaire. Mais des altérations dans la structure de ces gènes ou de leur niveau d'expression sont susceptibles d'être associées à une perturbation de l'activité normale de leur produit, contribuant ainsi à la prolifération cellulaire incontrôlée caractéristique des tissus cancéreux.

Dans une cellule normale, l'interaction de facteurs de croissance avec leurs récepteurs cellulaires spécifiques résulte en une cascade d'évènements intracellulaires transmettant au noyau le signal de prolifération. Dans les cellules cancéreuses, la perturbation des processus de régulation du cycle cellulaire (altération de la synthèse de facteurs de prolifération et/ou de leur récepteur, perturbation de la transduction du signal, altération des acteurs ou de facteurs nucléaires de régulation du cycle cellulaire, ou des mécanismes de contrôle de l'intégrité et de réparation de l'ADN) aboutit à une dérégulation de la synthèse de l'ADN.

Par ailleurs la perte d'activité régulatrice au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire (checkpoints) peut être associée à l'installation d'une instabilité génomique et prédisposer ainsi aux stades précoces de la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse (Cotran et coll., 1999).

II.A.2. Bases moléculaires et géniques de la prolifération cellulaire néoplasique

Le concept selon lequel les cancers se développent par étapes successives résultant de la croissance de plus en plus excessive de clones cellulaires dans certains tissus est maintenant bien établi. L'origine génétique des modifications conduisant à l'apparition de ces clones et à leur prolifération anarchique a trouvé confirmation dans l'identification puis l'isolement et la caractérisation des gènes responsables. La survenue et la progression d'une tumeur maligne apparaissent ainsi comme le résultat d'une accumulation d'évènements génétiques complexes altérant l'expression de certaines familles spécifiques de gènes et les recherches se sont orientées vers la caractérisation et la détection *in situ* de leur produit de transcription.

Bien que nos connaissances sur les rôles tenus par ces gènes et les protéines qu'ils codent dans le développement et la progression du cancer sont loin d'être complètes, un certain nombre de mécanismes généraux ont ainsi pu être élucidés. Leurs implications directes ou indirectes dans le cycle cellulaire et dans les mécanismes de sa régulation sont ainsi de mieux en mieux caractérisées. Une des conséquences majeures de ces altérations géniques est ainsi une dérégulation de la prolifération cellulaire, dont la signification biologique dans l'évolution du processus tumoral est indiscutée.

L'analyse moléculaire des tumeurs a ainsi montré que le cancer est principalement une maladie due à quatre catégories de gènes : les proto-oncogènes, les anti-oncogènes, les gènes de l'apoptose et les

gènes de réparation de l'ADN. Fortement conservés au cours de l'évolution, ces gènes exercent par l'intermédiaire de leurs produits un rôle primordial au niveau du métabolisme de la cellule normale, tout particulièrement dans les processus de prolifération cellulaire, de différenciation après sortie du cycle, et, plus récemment caractérisé mais de plus en plus d'actualité, d'apoptose cellulaires.

Trois classes de gènes régulateurs normaux sont ainsi susceptibles de provoquer ou d'accélérer le processus cancéreux lorsque leur structure ou la régulation de leur expression sont altérées :

- les proto-oncogènes, promoteurs de la prolifération cellulaire (Tableau II)
- les anti-oncogènes, aussi appelés gènes suppresseurs du cancer, régulateurs négatifs de la prolifération (Tableau III)
- les gènes régulateurs de la mort cellulaire programmée ou apoptose, assurant en particulier l'élimination des cellules présentant des lésions irréparables de l'ADN, potentiellement responsables d'une transformation cellulaire (Tableau IV).

A ces trois catégories principales, peut être ajoutée une quatrième classe de gènes potentiellement impliqués dans la transformation néoplasique, les gènes régulant la réparation de l'ADN (Tableau IV). Ces gènes interviennent indirectement dans la prolifération et la survie cellulaire en influençant la capacité d'une cellule à réparer et donc corriger des dommages non-léthaux survenant dans d'autres gènes, tels que les protooncogènes, les antioncogènes ou les gènes régulateurs de l'apoptose. Ainsi, un défaut d'activité de ces gènes de réparation de l'ADN est susceptible de prédisposer à l'installation de mutation génomique augmentant ainsi les risques de transformation cellulaire cancéreuse.

Pour leur grande majorité donc, ces différents gènes codent pour des produits intervenant directement ou indirectement dans le cycle de prolifération cellulaire. Quelques-uns de ces produits, fréquemment impliqués dans la transformation tumorale, sont représentés dans leur localisation cellulaire dans la Figure 7.

II.A.3 La croissance tumorale

II.A.3.a. Les paramètres de la croissance tumorale

L'étude des bases moléculaires de la cancérogénèse révèle ainsi l'importance, à l'échelle cellulaire, des processus biologiques liés à la prolifération cellulaire dans la transformation et la progression tumorale. De la même façon et à l'échelle de l'organisme malade, les paramètres de la croissance tumorale sont fondamentaux dans l'étude de la biologie et de l'évolution d'un cancer. Comme pour tout tissu, les principaux paramètres de la croissance tumorale sont représentés par la durée du cycle cellulaire néoplasique, la proportion de cellules tumorales en prolifération et celle des cellules tumorales au repos et enfin la proportion des pertes cellulaires tumorales.

Du fait des perturbations dans les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire, observées couramment dans les tissus néoplasiques, le recrutement de cellules tumorales dans le cycle cellulaire est souvent facilité et échappe aux contraintes et restrictions observées pour les cellules normales. Les cellules tumorales, cependant, ne parcourent pas le cycle cellulaire plus rapidement que les cellules normales. En effet, de nombreuses données expérimentales ont montré que la durée totale du cycle cellulaire au sein de nombreux tissus néoplasiques était équivalente, voire plus longue, que celle du cycle des tissus normaux correspondants (Cotran et coll., 1999). Aussi la croissance tumorale anormalement excessive n'est pas le plus souvent associée à un raccourcissement du cycle de prolifération cellulaire.

Par contre la proportion de cellules en prolifération est, elle, nettement différente entre les tissus cancéreux et les tissus normaux dont ils procèdent. La proportion de cellules en prolifération au sein d'une population néoplasique est appelée la fraction de croissance ou fraction proliférative. Elle se définit comme le pourcentage de cellules tumorales présentes au sein des différentes phases du cycle cellulaire (G1, S, G2 ou M) par rapport à la population néoplasique totale (Mendelsohn, 1963). Cette fraction proliférative varie au cours de l'évolution de la maladie cancéreuse dans l'organisme. Durant les phases précoces de la croissance néoplasique, la grande majorité des cellules transformées sont dans la fraction cellulaire proliférative. Puis lors de la progression de la tumeur, les cellules néoplasiques quittent progressivement cette population proliférative en nombre de plus en plus important du fait des pertes cellulaires tumorales, d'entrée en phase de quiescence G0, en particulier par manque en nutriments, ou plus rarement par différenciation (Figure 8).

Ainsi en phase clinique du cancer, la plupart des cellules tumorales sont en phase G0 ou G1 et même pour les tumeurs présentant une croissance rapide, la fraction proliférative a été estimée comme rarement supérieure à 25% (Cotran et coll., 1999).

Finalement, le taux de croissance des tumeurs est déterminé par le solde restant entre l'excès de production de cellules par activité proliférative et les pertes cellulaires tumorales, survenant régulièrement dans les tissus néoplasiques. Dans certaines tumeurs, en particulier celles qui sont caractérisées par une fraction proliférative élevée, l'excès de production dépasse largement les pertes, résultant en une croissance tumorale rapide par rapport aux tumeurs où la production de cellules tumorales excède de peu les pertes cellulaires. Ces pertes de cellules tumorales peuvent survenir par différents mécanismes. Les cellules peuvent nécroser par manque d'oxygène ou de nutriments, en particulier du fait d'un déficit de vascularisation. Les pertes cellulaires peuvent également survenir par exfoliation en particulier dans le cas de tumeurs ulcérées ou érodées.

Les cellules peuvent également quitter la masse tumorale primitive en gagnant le système circulatoire. Si, par ce mécanisme, les cellules peuvent réaliser une dissémination métastatique en d'autres localisations de l'organisme, la plupart des cellules tumorales entrant dans la circulation meurent et sont définitivement perdues. Les cellules néoplasiques peuvent également être éliminées par le système immunitaire. Enfin, les pertes cellulaires tumorales peuvent survenir par mort cellulaire par apoptose (Dewhirst et coll., 1995).

La définition de ces différents paramètres est indispensable à l'évaluation de la cinétique de croissance d'un tissu néoplasique, facteur déterminant dans la prédiction de l'évolution biologique de la maladie tumorale mais aussi dans le choix des méthodes thérapeutiques anticancéreuses adaptées.

II.A.3.b. Le temps de doublement : intérêt en clinique oncologique

La croissance des tissus cancéreux est ainsi définie, en clinique oncologique, par le temps de doublement, correspondant par définition au temps nécessaire pour que la masse tumorale double de volume. Ce temps de doublement dépend de l'importance relative des trois fractions cellulaires présentes dans la tumeur, la fraction proliférative, la fraction des cellules quiescentes et la fraction des pertes cellulaires tumorales. Sa durée, variable en fonction des types tumoraux, est un marqueur

fiable de l'agressivité potentielle néoplasique. Le temps de doublement varie au cours des différentes phases de l'évolution d'un cancer donné (phase pré-clinique, phase clinique) mais globalement il a tendance après l'émergence clinique de la maladie d'augmenter avec le temps, du fait principalement de la réduction de la fraction proliférative qui accompagne la période clinique de la maladie tumorale.

L'étude de la cinétique de croissance des tumeurs présente au moins deux intérêts majeurs en clinique oncologique. Le premier concerne la prédiction de l'évolution biologique spontanée des tumeurs puisque les tumeurs caractérisées par une fraction proliférative élevée, dépassant largement les pertes en cellules tumorales, ont une vitesse de croissance rapide et une évolution clinique le plus souvent fulgurante. Le second intérêt est que le niveau de la fraction proliférative d'une tumeur influence directement sa sensibilité aux traitements anticancéreux, tout particulièrement chimiothérapeutiques. En effet, la plupart des substances médicamenteuses anticancéreuses agissent sur les cellules présentes dans une ou plusieurs des phases du cycle cellulaire.

Aussi, les tumeurs présentant une faible fraction proliférative auront une croissance lente mais seront relativement réfractaires aux traitements utilisant des drogues agissant sur les cellules en prolifération. A l'inverse, les tumeurs agressives d'évolution rapide, qui contiennent une fraction importante de cellules en prolifération, sont extrêmement sensibles à l'action de la chimiothérapie, avec de fréquentes rémissions à la suite des traitements voire, parfois, de complètes guérisons.

Ces données sont fondamentales dans le choix des conduites thérapeutiques adaptées à chaque type tumoral. Ainsi, une des stratégies employées dans le cas de tumeurs présentant une faible fraction de prolifération consiste à provoquer l'entrée synchronisée du plus grand nombre possible de cellules tumorales de la phase de quiescence G₀ vers le cycle cellulaire. Ceci peut être réalisé, en particulier, par une réduction de la masse tumorale par chirurgie et/ou radiothérapie. Les cellules tumorales survivantes et rémanentes tendent alors à entrer spontanément dans le cycle cellulaire et deviennent ainsi sensibles à l'action d'une chimiothérapie adjuvante. De telles considérations sont à la base des stratégies d'associations et de combinaisons raisonnées de différentes modalités thérapeutiques, employées couramment dans le traitement des cancers.

II.B. Techniques d'étude de la prolifération : applications en clinique oncologique

L'étude princeps de laquelle a émané le concept de cycle cellulaire a ouvert la voie à une approche expérimentale d'évaluation de la prolifération cellulaire. Elle mettait en effet en oeuvre une technique d'incorporation d'un élément radioactif, le phosphore 32 et observait une variation cyclique de la quantité relative de ce radioélément à l'échelle cellulaire, qui fut mise en relation avec une variation parallèle de la quantité d'ADN présent dans la population cellulaire étudiée au cours du temps (Howard et coll., 1951).

Depuis, plusieurs techniques d'étude complémentaires de la prolifération ont été développées. Par définition ces techniques autorisent une évaluation quantitative objective de l'activité proliférative d'une population cellulaire donnée. Bien que globalement non spécifique de la prolifération néoplasique, c'est assurément dans le cadre de l'étude de l'activité de prolifération et donc de croissance tumorale en clinique oncologique, du fait de son importance pronostique, que ces techniques ont été massivement utilisées (Quinn et coll., 1990). Nous présenterons ici une revue des principales techniques d'étude de la prolifération cellulaire disponibles et les intérêts mais aussi les limites de leurs applications en clinique oncologique vétérinaire.

II.B.1. Techniques d'incorporation

II.B.1.a. Principe général

Ces techniques sont basées sur l'incorporation *in vivo* ou *in vitro* d'analogues de nucléotides, comme la thymidine tritiée (^3H) ou la bromodeoxyuridine (BrdU), lors de la réplication de l'ADN précédant la division cellulaire (phase S). L'incorporation de thymidine tritiée peut être visualisée par des techniques histoautoradiographiques, et celle de bromodeoxyuridine peut être révélée par des techniques immunohistochimiques, à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre cette molécule.

Ces techniques d'incorporation sont considérées comme les méthodes d'évaluation standard des cellules en phase S du cycle cellulaire (Lamerton et coll., 1968). Historiquement, ces techniques, en particulier l'incorporation de thymidine radioactive, sont de mises en oeuvre ancienne (Taylor et coll., 1957) et leur intérêt potentiel dans l'étude de la prolifération néoplasique a très vite été pressenti (Johnson et coll., 1961). L'utilisation d'analogues non radioactifs est intervenue plus

récemment (Gratzner, 1982). Elles sont encore aujourd'hui considérées comme les techniques de référence, auxquelles les autres techniques d'études doivent être comparées et corrélées pour confirmer leur validité dans l'évaluation de la prolifération cellulaire .

La détermination de la quantité de cellules tumorales ayant incorporé ces analogues nucléotidiques permet la définition d'un index d'incorporation, correspondant à l'évaluation quantitative des cellules ayant parcouru une phase de duplication d'ADN (phase S du cycle cellulaire) par rapport à la population cellulaire totale. La détermination de ces index d'incorporation permet de calculer le temps de doublement potentiel théorique, c'est à dire le temps nécessaire à une population tumorale pour être multipliée par deux si l'on considère les pertes cellulaires tumorales comme nulle.

II.B.1.b. Intérêts et limites en clinique oncologique vétérinaire

L'intérêt de ces techniques appliquées à la détermination de la cinétique de croissance tumorale des tumeurs animales spontanées a été confirmé depuis de nombreuses années (Owen et coll., 1969). Cependant si ces techniques sont d'utilisation courante en pathologie expérimentale, du fait de leur grande spécificité et sensibilité, leur utilisation en pathologie clinique spontanée est en pratique très limitée. Leur principal inconvénient correspond au fait que leur mise en application nécessite un prétraitement des animaux cancéreux ou de leurs tissus tumoraux à analyser.

L'administration *in vivo* de ces analogues nucléotidiques, du fait de leur toxicité, est en pratique clinique peu concevable. Par ailleurs, l'emploi de substances radioactives nécessite la mise en œuvre de précautions spécifiques drastiques (isolement et confinement de l'animal traité, récupération de toutes les matières biologiques...) hors de portée de la pratique vétérinaire conventionnelle. Cependant, quelques études expérimentales ont montré quelques applications possibles de l'administration *in vivo* de BrdU, d'utilisation biologique plus simple, dans l'étude de la prolifération de différentes tumeurs animales spontanées (Theon et coll., 1994 ; Schwyn et coll., 1998). Cette technique a en particulier été utilisée dans le cas des lymphomes canins (Teske et coll., 1993 ; Vail et coll., 1996), ainsi que des tumeurs buccales du chien (Yoshida et coll., 1999).

Leur utilisation *in vitro*, après prélèvement et mise en culture de cellules néoplasiques, si elle est moralement acceptable, nécessite des installations et une technicité réservée à un nombre très limité de structures. Leur coût financier et humain rendent par ailleurs l'utilisation de ces techniques

difficile en pratique clinique vétérinaire. Enfin, leur mise en oeuvre nécessite l'utilisation et donc la disponibilité de tissus tumoraux frais et viables, et ne permettent donc pas de réaliser des études rétrospectives.

II.B.2. Analyse du contenu cellulaire en ADN

II.B.2.a. Principe général

Du fait de la variation de la quantité d'ADN présente dans les cellules lors de leur progression au cours du cycle cellulaire (2N en phase G0 ou G1 : cellules diploïdes ; 4N en phase G2 et M : cellules quadriploïdes ; entre 2N et 4N en phase S), l'analyse quantitative du contenu en ADN d'une population cellulaire (aussi appelée détermination de la ploïdie de l'ADN) a été proposée pour déterminer le taux de prolifération d'un tissu. Cette analyse a été rendue possible par l'essor ces dernières années des techniques de cytométrie en flux, dont l'intérêt potentiel en pathologie tumorale spontanée a été très vite pressenti (Quirke et coll., 1986).

La cytométrie en flux est, très généralement, une technique d'analyse et de tri des cellules dérivée des appareils de numération et formule leucocytaires. Appliquée à l'étude du cycle cellulaire, cette technique consiste en la détermination du contenu en ADN cellulaire, par l'intermédiaire de la mesure d'une fluorescence, obtenue grâce à l'incorporation de fluorochromes se fixant spécifiquement sur l'ADN (iodure de propidium, acridine orange ou bromure d'éthidium).

Ces marqueurs fluorescents étant employés en dose saturante, l'intensité de la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN présent dans la cellule. Grâce à des logiciels spécifiques, des histogrammes de répartition de l'ADN sont ainsi déterminés à partir desquels les pourcentages des cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire et donc leur index de prolifération peuvent être calculés (Coon et coll., 1987).

II.B.2.b. Intérêts et limites en clinique oncologique vétérinaire

En oncologie humaine, les applications cliniques sont essentiellement de trois types : étude de la prolifération des tumeurs malignes (tumeurs solides mais surtout hémopathies malignes) ; étude de

l'action de drogues antinéoplasiques (évaluation de l'efficacité ou de l'existence d'éventuelle chimiorésistance des drogues agissant sur la prolifération cellulaire) ; étude de l'aneuploïdie (détection d'anomalies chromosomiques clonales dans différents types tumoraux).

Du fait de résultats encourageants obtenus en médecine humaine, l'utilisation de la cytométrie en flux pour étudier la prolifération cellulaire néoplasique, par analyse de la distribution de la quantité d'ADN cellulaire dans la population néoplasique, a également été proposée en pathologie vétérinaire (Johnson et coll., 1981).

L'analyse de la ploïdie de l'ADN fut ainsi réalisée pour un grand nombre de types tumoraux animaux spontanés différents, avec des résultats variables en termes d'intérêt pronostique potentiel. Des résultats intéressants en terme de prédiction du comportement biologique néoplasique ont été rapportés pour les tumeurs mammaires du chien (Hellmen et coll., 1988 ; Rutteman et coll., 1988), les lymphomes (Teske et coll., 1993) et plasmocytomes du chien (Frazier et coll., 1993). Par contre l'intérêt de cette technique semble plus limité pour d'autres types tumoraux, tels que les mélanomes où sa supériorité par rapport à l'examen histopathologique conventionnel n'est pas clairement démontrée (Bolon et coll., 1990 ; Roels et coll., 2000), les mastocytomes cutanés canins (Ayl et coll., 1992) ou les carcinomes transitionnels de la vessie chez le chien (Clemo et coll., 1994).

L'intérêt de ces techniques est cependant limité en pratique médicale oncologique courante du fait de la nécessité de disposer de prélèvements tissulaires frais pour leur mise en œuvre, et, évidemment, de l'appareil et de la technicité nécessaires. Des techniques ont été cependant proposées pour pouvoir appliquer la cytométrie en flux sur du matériel cellulaire récupéré à partir de prélèvements fixés au formol et inclus en paraffine (Hedley et coll., 1985).

Cependant dans ces cas, l'analyse nécessite une désagrégation du prélèvement et s'effectue sans préservation de l'architecture tissulaire, avec la possibilité d'inclure, dans la population analysée, des cellules non tumorales présentes au sein du tissu néoplasique. Par ailleurs, l'analyse monoparamétrique de l'ADN est parfois à l'origine de résultats imprécis et ou ambigus, en particulier du fait des erreurs de mesure propres au cytomètre et des approximations effectuées par les logiciels de calcul des phases du cycle. Utilisée seule, cette technique d'analyse ne permet pas d'individualiser les cellules G₀ du bloc des cellules diploïdes, ni les cellules en mitose du bloc quadriploïde. Des techniques d'analyse multiparamétrique, associant des marqueurs de l'ADN à un autre marqueur cellulaire couplé à un fluorochrome, ont alors été développées pour palier ces insuffisances. Il s'agit par exemple de doubles marquages BrdU/ADN, ARN/ADN, voire protéines/ADN, dont en particulier les protéines marqueurs de prolifération (Alison et coll., 1995).

II.B.3. Index mitotique

II.B.3.a. Principe général

La détermination par comptage du nombre de figures de mitose représente la méthode la plus ancienne d'évaluation de la prolifération cellulaire. Et bien qu'aujourd'hui de très nombreuses techniques d'évaluation de la prolifération cellulaire sont disponibles, la facilité d'utilisation de cette technique est en grande partie responsable de son utilisation de routine en pratique histopathologique, en particulier vétérinaire, comme critère diagnostique et surtout pronostique.

Ainsi, la quantification de l'activité mitotique tumorale intervient dans tous les systèmes de grading histopathologique et dans l'évaluation du degré d'agressivité potentielle de la quasi-totalité des néoplasmes des carnivores domestiques. Malgré quelques exceptions notables, c'est à dire des types tumoraux chez lesquels une activité mitotique élevée n'est pas associée à un comportement biologique agressif (i.e. histiocytome cutané canin, sarcome de Sticker, séminome du chien), la détermination de l'activité mitotique est considérée, pour l'immense majorité des néoplasmes du chien et du chat, comme l'un si ce n'est le critère pronostique déterminant.

II.B.3.b. Intérêts et limites en clinique oncologique vétérinaire

L'un des problèmes majeurs, cependant, de l'évaluation de l'activité mitotique réside dans la standardisation de la quantification de ce paramètre, entre laboratoires, voire entre pathologistes, indispensable à son utilisation en pratique clinique quotidienne.

En premier lieu se pose le problème de la reconnaissance morphologique formelle des figures de mitose, source de subjectivité et donc de potentielles variations entre observateurs différents. Plusieurs critères d'identification microscopique ont ainsi été proposés dans un souci de standardisation. Ces critères incluent l'absence de membrane nucléaire, l'absence d'une zone claire centrale, la présence de projections hérissées, correspondant aux chromosomes condensés, et non de projections de forme triangulaires ou pointues et la présence d'un cytoplasme périphérique d'affinité tinctoriale plutôt basophile qu'éosinophile (Elias, 1996).

Cependant, ces critères, bien qu'acceptés par la majorité des auteurs, ne sont pas universellement reconnus, et s'avèrent d'application pratique parfois malaisée. Ainsi, en cas en particulier de fixation

différée ou inappropriée du prélèvement à analyser, la distinction formelle entre une figure de mitose et un noyau pycnotique est parfois difficile. Aussi est-il habituellement considéré qu'en cas de doute dans l'identification formelle d'une figure de mitose, celle-ci ne doit pas être comptée.

Ensuite doivent être évoquées les différentes méthodes d'évaluation de cette activité mitotique, qui peut ainsi être exprimée, par exemple, sous la forme d'un nombre de figures de mitose compté sur un nombre défini de champs microscopiques de tissu tumoral (le plus souvent 10 champs au grandissement x400), ou par le nombre moyen de figures de mitose par unité de surface tumorale, ou enfin par l'index mitotique, c'est-à-dire le pourcentage de cellules tumorales mitotiques par rapport à la population tumorale globale. Parmi toutes ces méthodes, du fait en particulier de la variation de la taille réelle des champs entre équipements microscopiques différents et de l'hétérogénéité de la répartition de l'activité mitotique au sein d'un tissu néoplasique, la détermination de l'index mitotique est apparue comme la plus fiable et la plus reproductible dans la détermination de l'activité proliférative tumorale (Sarli et coll., 1999).

Par ailleurs, seul l'index mitotique peut permettre de comparer l'activité proliférative entre des types tumoraux différents puisque du fait d'une taille variable des cellules tumorales selon le type néoplasique, le nombre de cellules tumorales, éventuellement en mitose, présentes dans un champ microscopique est variable selon l'histogénèse néoplasique.

Cependant, en particulier parce qu'il est plus couteux temporellement et de mise en oeuvre fastidieuse en pratique courante, la détermination d'un index mitotique sur un prélèvement tissulaire néoplasique n'est que très rarement effectuée et une évaluation semi-quantitative de l'activité mitotique lui est régulièrement préférée.

Enfin, d'un point de vue théorique, la mitose, seule phase du cycle cellulaire morphologiquement identifiable sur coupes tissulaires, ne représente qu'une très faible proportion par rapport à la durée totale du cycle de prolifération. Aussi la détermination de la prolifération par l'index mitotique dans une population conduit à une sous-estimation de l'activité proliférative réelle, puisque ne prenant pas en compte les cellules présentes dans les autres phases du cycle (G1, S et G2), impossible à identifier et à discerner sur des seuls critères d'observation microscopique.

II.B.4. Organiseurs nucléolaires (AgNORs)

II.B.4.a. Principe général

Le nucléole est un organite nucléaire jouant un rôle essentiel dans le contrôle de la prolifération et des synthèses protéiques cellulaires. Les régions des organisateurs nucléolaires (ou Nucleolar Organizer Regions : NORs) sont les régions des chromosomes, étroitement associées au nucléole, correspondant à des segments d'ADN contenant les gènes codant pour les ADN ribosomiaux. C'est là que s'effectuent la transcription des ARN ribosomiaux, les modifications post transcriptionnelles des ARN transcrits et leur assemblage en ribosomes fonctionnels. Les NORs actifs sont associés à un certain nombre de protéines spécifiques impliquées dans la régulation de la transcription ou dans les modifications post-transcriptionnelles des ARN transcrits. Ces régions ont donc un rôle majeur dans la régulation des synthèses protéiques (Renaudon et coll., 1988).

Les organisateurs nucléolaires peuvent être révélés en microscopie photonique en mettant à profit la forte argyrophilie des protéines non histones qu'ils contiennent, rendant possible leur mise en évidence par des techniques de coloration à l'argent (Goodpasture et coll., 1975). Ces techniques d'imprégnation argentique, qui ont conduit à la création du terme "AgNORs", permettent de mettre en évidence les NORs, aussi bien dans les chromosomes métaphasiques (pour les études de cytogénétique) que dans les cellules interphasiques où les AgNORs apparaissent sous la forme de grains noirs localisés dans les nucléoles.

L'utilisation sur matériel histopathologique a été rapidement proposée. En effet, la mise en évidence des organisateurs nucléolaires par l'argent est apparue comme un moyen simple d'apprécier l'activité cellulaire sur des préparations histologiques faites à partir de prélèvements fixés, inclus et coupés selon les techniques de routine de l'anatomie pathologique (Ploton et coll., 1986). L'intensité de la coloration dépend de l'activité transcriptionnelle des cellules et le nombre, la taille et la surface de NORs observés dans un tissu dépendraient du taux de prolifération et de différenciation cellulaire ainsi que d'une éventuelle transformation néoplasique (Ploton et coll., 1988).

II.B.4.b. Intérêts et limites en clinique oncologique vétérinaire

Plusieurs études ont montré l'existence d'une corrélation entre la détermination des AgNOR et d'autres méthodes d'évaluation de la prolifération cellulaire, suggérant l'existence d'une relation entre les organisateurs nucléolaires et l'activité mitotique cellulaire. Cette corrélation a été confortée, en pathologie humaine, par la confirmation d'une valeur pronostique de l'estimation des AgNOR pour plusieurs types tumoraux (Hall et coll., 1990).

En pathologie vétérinaire, cette technique a été utilisée principalement dans l'évaluation pronostique de trois types néoplasiques. Tout d'abord les lymphomes pour lesquels des résultats variables en fonction des espèces ont été rapportés. Chez le chien, cette technique aurait ainsi une valeur pronostique intéressante (Vail et coll., 1996 ; Kiupel et coll., 1998 ; Kiupel et coll., 1999) mais pas pour les lymphomes du chat (Vail et coll., 1998 ; Rassnick et coll., 1999). Puis, la détermination des AgNOR a été proposée pour constituer une approche, complémentaire au grading histopathologique, dans l'évaluation de l'évolution post-chirurgicale des mastocytomes cutanés canins. Plusieurs études ont ainsi montré l'intérêt pronostique potentiel de cette technique, susceptible d'être mise en oeuvre sur coupes tissulaires histologiques classiques (Bostock et coll., 1989 ; Simoes et coll., 1994) ou sur frottis de cytoponction (Kravis et coll., 1996). Enfin pour les tumeurs mammaires chez le chien, les premières études semblaient indiquer que la quantification des AgNOR constituerait une approche prometteuse pour discriminer les tumeurs en fonction de leur malignité potentielle (Destexhe et coll., 1995 ; Bratulic et coll., 1996) mais une étude ultérieure ne confirme pas cet intérêt pronostique (Lohr et coll., 1997).

Cependant de nombreuses questions sur les modalités d'application de cette méthode restent posées, tant d'un point de vue pratique que théorique. La technique en elle-même doit être parfaitement maîtrisée (épaisseur de coupe homogène, distinction entre les AgNOR et les précipitations non spécifiques des sels d'argent...). Par ailleurs les modalités de quantification des AgNOR qui ont été proposées diffèrent selon les auteurs, rendant les comparaisons des résultats obtenus très difficiles entre les études. La nécessité d'une standardisation dans les méthodes d'évaluation des AgNOR est donc très précocement apparue indispensable à l'utilisation en routine de cette technique (Crocker et coll., 1989).

La plupart des études propose d'utiliser le nombre moyen d'organismes nucléaires par noyau, comptés sur 50 ou 100 cellules tumorales, comme méthode de quantification. D'autres auteurs ont

cependant proposé de considérer d'autres paramètres de quantification, comme la mesure des surfaces occupées par les AgNOR, selon eux plus représentatifs de l'activité cellulaire de transcription ribosomale (Öfner et coll., 1995). Ces controverses dans les méthodes de quantification sont toujours aujourd'hui d'actualité. Très récemment un système de quantification a été proposé répondant à cette volonté de standardisation de la technique de détection et de la quantification des AgNORs en pathologie tumorale vétérinaire (Hung et coll., 2000). Quoi qu'il en soit, que l'on s'intéresse au nombre d'AgNOR par noyau, ou a fortiori à la surface occupée par ceux-ci, la quantification des AgNOR apparaît toutefois de réalisation fastidieuse, si elle doit être effectuée sans l'assistance d'un système d'analyse d'image. Si la détermination du nombre d'AgNOR a montré une corrélation significative avec les techniques de référence d'évaluation de la prolifération cellulaire, telles que les techniques d'incorporation, la spécificité des AgNOR dans la détermination de l'activité proliférative a été discutée puisque leur nombre serait essentiellement lié à l'activité transcriptionnelle de la cellule. Par ailleurs, si le nombre moyen d'AgNOR tend à être supérieur dans les tissus tumoraux que dans les tissus normaux correspondants, il n'a pas encore été démontré si ce paramètre représentait un indicateur pronostique indépendant.

II.B.5. Détection immunohistochimique des marqueurs de proliférations

II.B.5.a. Principe général

Le terme de marqueur de prolifération désigne une molécule dont l'expression est exclusivement associée ou au moins significativement augmentée lors du cycle cellulaire et susceptible de ce fait d'être détectée uniquement dans les cellules en phase active de prolifération.

Ce terme s'applique donc à un ensemble de molécules, de nature quasi exclusivement protéique, dont la présence détectée au sein d'une cellule signe, en théorie, la présence de celle-ci dans le cycle de prolifération cellulaire. Pour pouvoir donc représenter un marqueur de prolifération, une molécule doit présenter nécessairement deux propriétés : elle doit être continuellement présente durant toutes les phases du cycle cellulaire et ce pour tout type cellulaire ; la transition entre le cycle de prolifération et tout état non prolifératif doit s'accompagner d'une disparition rapide de la molécule (Van Dierendonck et coll., 1989). Plusieurs molécules ont ainsi été proposées, susceptibles de répondre à ces exigences requises.

Certaines d'entre elles représentent des protéines parfaitement identifiées et connues pour leur activité durant le cycle de prolifération cellulaire. Il peut s'agir, par exemple, des ADN polymérase ou de protéines, telles que l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire ou PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), agissant comme cofacteur de ces enzymes ; des CDK ou des cyclines intervenant directement dans le contrôle des différentes phases du cycle ; des topoisomérases de l'ADN permettant l'action des enzymes de réplication durant la phase S...

D'autres molécules utilisées comme marqueurs de prolifération, bien que spécifiquement exprimées durant les différentes phases du cycle et donc probablement directement impliquées dans le déroulement ou le contrôle de celui-ci, n'ont pas jusqu'à aujourd'hui de fonction identifiée. Il s'agit en particulier de l'antigène Ki-67 ; de la mitosine, phosphoprotéine nucléaire de 350 kD ; et d'un ensemble de protéines, désignées, en l'absence de fonction identifiée, par la lettre "p" (pour protéine) suivie de la valeur de leur poids moléculaire, telles que p34, p105, p120, p145 et p330d aussi appelée CENPF (Hall et coll., 1990 ; Linden et coll., 1992 ; Bolton et coll., 1992 ; Bacchi et coll., 1993).

La détection de ces marqueurs de prolifération peut être effectuée, grâce au développement des techniques immunohistochimiques, à l'aide d'anticorps permettant leur reconnaissance spécifique et leur mise en évidence par différents moyens de révélation (fluorescence ou révélation enzymatique). Les préparations utilisées peuvent être des suspensions cellulaires, des frottis, des étalements ou empreintes, mais surtout des coupes tissulaires effectuées et techniques selon les règles classiques de l'histopathologie.

II.B.5.b. Intérêts et limites en clinique oncologique vétérinaire

L'utilisation des techniques immunohistochimiques pour évaluer la prolifération cellulaire apparaît comme une méthode attractive, en particulier puisqu'elle peut être effectuée directement sur des prélèvements tissulaires effectués à visée de réalisation d'un examen histopathologique conventionnel (Linden et coll., 1992). Elle permet de ce fait d'étudier l'activité proliférative dans un contexte de préservation morphologique de l'architecture tissulaire et de la cytologie. Elles ne nécessitent pas par ailleurs, contrairement aux techniques d'incorporation, une administration préalable de substances au patient.

L'utilisation des marqueurs de prolifération permet l'estimation objective de la fraction de croissance tumorale. Celle-ci se définit comme la proportion des cellules tumorales présentes au

sein du cycle de prolifération cellulaire par rapport à la population néoplasique totale. Les index de marquage pour les marqueurs de prolifération, c'est-à-dire le nombre de cellules tumorales positives exprimé en pourcentage par rapport à la population tumorale totale, représentent les index de prolifération cellulaire (Alison, 1995). La valeur pronostique de la détermination de ces index de marquage a été étudiée et déterminée pour un grand nombre de types tumoraux différents en oncologie humaine (Van Diest et coll., 1998).

Comme pour toutes les autres techniques d'évaluation de la prolifération cellulaire, l'utilisation en routine de la détection immunohistochimique des marqueurs de prolifération nécessite la mise en oeuvre de protocoles parfaitement standardisés à la fois en ce qui concerne la réalisation technique immunohistochimique elle-même, et les modalités de quantification des marquages obtenus. De nombreux contrôles de qualité des différents paramètres techniques ont ainsi été répertoriés (Linden et coll., 1992). Les questions de quantification ont été souvent évoquées. Plusieurs éléments ont ainsi été considérés, tels que, par exemple, le nombre de cellules tumorales à examiner, l'intérêt comparé entre des comptages manuels ou par systèmes d'analyse d'image, les problèmes d'hétérogénéité de marquage en fonction des territoires néoplasiques examinés (Hall et coll., 1990). La méthode de quantification à privilégier doit concilier la validité et la fiabilité de l'estimation de la prolifération et la possibilité d'une utilisation compatible avec une pratique de laboratoire .

III. LES MARQUEURS DE PROLIFERATION CELLULAIRE PCNA (PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN) ET KI-67

III.A. L'antigène nucléaire de prolifération cellulaire ou Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) : biologie et utilisation comme marqueur de prolifération

III.A.1. Historique et découverte

L'antigène nucléaire de prolifération cellulaire ou Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) a été primitivement identifié et mis en évidence comme représentant l'une des cibles potentielles de certains auto-anticorps présents dans le sérum de patients atteints de LED ou Lupus Erythémateux

Systémique (Miyachi et coll., 1978). Ces anticorps reconnaissaient en effet un antigène nucléaire présent uniquement dans les cellules en prolifération active, c'est à dire qu'ils ne réagissaient pas avec les noyaux des néphrocytes et des hépatocytes mais marquaient les noyaux des lymphocytes présents dans les centres germinatifs des follicules lymphoïdes. Egalement les lymphocytes normaux périphériques ne réagissaient pas avec ces serums mais 20% d'entre eux devenaient positifs après stimulation avec un mitogène, la phytohémagglutinine. Indépendamment, une autre équipe décrivit et caractérisa une protéine qui fut dénommée "cycline" et dont l'expression était associée avec le cycle de prolifération cellulaire (Celis et coll., 1983). Il fut peu de temps après démontré que le PCNA et la " cycline" était la même protéine nucléaire (Mathews et coll., 1984). Avec l'expansion des connaissances sur les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire en général et le rôle de la famille des protéines appelées cyclines en particulier, le terme de PCNA fut préféré à celui de cycline, et a été conservé.

La production d'anticorps monoclonaux murins spécifiques du PCNA a permis le développement de nombreuses études expérimentales, en particulier cliniques, consacrées à ce marqueur (Ogata et coll., 1987). Aussi l'utilisation possible sur coupes tissulaires de la détection de l'antigène PCNA, comme technique d'étude de la prolifération alternative aux techniques d'incorporation, a été proposée dès la fin des années 80 (Galand et coll., 1989). La disponibilité d'anticorps commerciaux permettant une détection du marqueur PCNA sur prélèvements fixés au formol et inclus en paraffine, selon les règles classiques de l'histopathologie, a très vite contribué à son large développement, en particulier par rapport aux marqueurs uniquement détectables sur prélèvements congelés (Dervan et coll., 1992).

III.A.2. De la structure à la fonction

L'antigène nucléaire de prolifération cellulaire est une protéine, de poids moléculaire de 36kDa, de localisation nucléaire agissant comme cofacteur de l'ADN polymérase (Bravo et coll., 1987a). Il s'agit d'une protéine acide non-histone de 261 acides aminés auxiliaire de la polymérase jouant un rôle essentiel dans l'initiation de la réplication de l'ADN et dans la progression de l'enzyme (Prelich et coll., 1987b). Ce rôle fondamental du PCNA dans la fonction de synthèse de l'ADN a été confirmé par son implication indispensable *in vitro* à la réplication de l'ADN du virus simien SV40 (Prelich et coll., 1987a). Le PCNA est une protéine hautement conservée dans l'évolution,

présentant un grand degré d'homologie depuis la levure jusqu'aux cellules de mammifères. De grandes similarités structurales ont même été mises en évidence entre le PCNA et des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN chez les procaryotes (Prosperi, 1997).

Des études biochimiques et structurales ont suggéré que la forme biologiquement active du PCNA correspondrait à un homotrimère, de forme globalement annulaire entourant l'ADN et se fixant aux sites de réplication. Cette fixation à l'ADN nécessiterait l'interaction avec une autre protéine auxiliaire à la réplication, le facteur de réplication de type C ou RF-C (pour Replication Factor C). La forme monomérique non fixé à l'ADN constituerait un pool de réserve nucléoplasmique de la molécule. Seul l'homotrimère serait capable d'interagir avec l'ADN polymérase et serait indispensable à l'interaction de l'enzyme avec la chaîne nucléotidique à dupliquer. Ainsi a-t-il été montré que l'inhibition spécifique de la synthèse de la protéine PCNA, par utilisation d'oligonucléotides anti-sens, ou son inactivation fonctionnelle, par microinjection intracellulaire d'anticorps spécifiques, inhibe l'entrée des cellules en phase S et bloque la progression du cycle cellulaire (Prosperi, 1997).

Le gène du PCNA est localisé chez l'homme sur le bras court du chromosome 20. Il est composé de 6 exons séparés par 5 introns et son expression est régulée par les voies de transduction du signal classiquement induites par la fixation des facteurs de croissance sur leur récepteur cellulaire (Prosperi, 1997). Cette induction de la synthèse du PCNA par le serum ou par des facteurs de croissance purifiés passe par une activation dose-dépendante du promoteur du gène PCNA par l'intermédiaire de facteurs de transcription nucléaire (Prosperi, 1997). Le promoteur du gène présente également une séquence consensus pour la protéine p53. Ainsi l'activation du promoteur PCNA peut-elle être régulée par les niveaux d'expression de la protéine p53, permettant une modulation de l'expression du PCNA en réponse à la présence de lésions détectées sur l'ADN (Morris et coll., 1989).

Cependant la régulation de l'expression du PCNA a lieu également à un niveau post-transcriptionnel, puisque dans des cellules sénescentes la transcription du gène PCNA en ARN messagers se produit en l'absence d'un niveau d'expression détectable de la protéine.

Par ailleurs et du fait de la participation des ADN polymérases δ et ϵ dans les mécanismes de réparation de l'ADN, la protéine PCNA a été également démontrée comme étant impliquée dans les phases de correction des erreurs de réplication de l'ADN (Toschi et coll., 1988). Le PCNA serait

ainsi mobilisé rapidement lors des phases d'excision/réparation nucléotidique par relocalisation de la fraction associée à la chromatine et sans que sa synthèse n'ait besoin d'être induite. Cette fonction mettrait en jeu des interactions moléculaires complexes, assurant simultanément l'arrêt de la progression du cycle, donc en particulier l'inhibition de la fonction d'auxiliaire de réplication du PCNA, et l'activation de sa fonction de cofacteur des enzymes de réparation de l'ADN. Serait en particulier impliquée dans ces mécanismes l'interaction du PCNA avec la protéine GADD45 (pour Growth Arrest and DNA Damage), qui dirigerait le PCNA sur les sites où des lésions de l'ADN sont présentes (Prosperi, 1997).

Enfin le PCNA est également considéré comme un facteur important de contrôle du cycle cellulaire par l'intermédiaire de ses interactions directes possibles avec les cyclines ainsi qu'avec la protéine p21, inhibitrice des CDK (Cayrol et coll. 1998). Cette fonction du PCNA a été de mise en évidence récente et passe par la formation de complexe macromoléculaire associant le PCNA à une cycline et à une CDK, ainsi qu'éventuellement à un inhibiteur du complexe, de type CKI. Ce système d'interaction fournirait un niveau de contrôle supplémentaire du cycle cellulaire, sous la forme d'une séquestration ou d'une libération conditionnée de ces différents facteurs de progression du cycle, régulée par l'intermédiaire de signaux extra- ou intracellulaires modulant la stabilité du complexe macromoléculaire (Xiong et coll., 1992).

III.A.3. Expression durant le cycle cellulaire

La protéine PCNA, présente une expression différentielle durant le cycle cellulaire et son niveau de synthèse a été corrélé avec le taux de prolifération cellulaire (Celis et coll., 1987). Du fait de sa fonction de cofacteur de l'enzyme de réplication de l'ADN, le PCNA atteint son niveau maximal d'expression lors de la phase S du cycle cellulaire. Pour des cellules entrant dans le cycle cellulaire, elle n'est pas ou peu détectable lors de la phase G1 précoce et commence à être observée en milieu et fin de G1 où débiterait sa synthèse. Après donc avoir culminé en phase S, où son niveau d'expression atteindrait 2 à 3 fois celui observé durant la phase G1, le PCNA présente un niveau d'expression intermédiaire, déclinant progressivement, au cours des phases G2 et M du cycle cellulaire (Bolton et coll., 1992). Pour certains auteurs toutefois, le PCNA présenterait un plateau d'expression en G2 et sa décroissance ne se produirait que durant la phase de mitose (Kurki et coll., 1986). Au cours de ces différentes phases du cycle, le niveau d'expression de la protéine est corrélé

au niveau de transcription des ARN messagers. Par ailleurs, la protéine PCNA possède une stabilité importante. En effet, la transition entre la sortie du cycle cellulaire et la phase de quiescence ne s'accompagne pas d'une dégradation rapide de cette molécule. La demi-vie de ce marqueur a été ainsi estimée à au moins 20 heures lors d'études *in vivo*, rendant de ce fait sa détection encore possible durant les phases G0 voire G1 des cellules filles issues d'une division cellulaire préalable (Bravo et coll., 1987b).

La régulation de l'expression du PCNA s'effectue à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Au niveau transcriptionnel, la régulation s'effectue par l'intermédiaire de facteurs de transcription, dont le facteur E2F, activés lors de la transduction du signal de prolifération et déclenchant l'expression du gène PCNA après fixation et activation de son promoteur.

La régulation, au niveau post-transcriptionnel, semble également d'une grande importance. Elle met en jeu la stabilisation des ARN messagers codant pour cette protéine. En effet, le gène, bien que principalement exprimé lors des phases de synthèse de l'ADN, serait transcrit à la fois dans les cellules quiescentes, à un faible niveau, et dans les cellules en division. Cependant, l'ARNm serait stabilisé dans les cellules en prolifération, par l'intermédiaire de l'action positive de différents facteurs de croissance cellulaire. Cette stabilité permettrait l'accumulation à un niveau significatif des molécules d'ARNm, permettant la synthèse d'une quantité suffisante de protéines, pour assurer sa fonction biologique. Dans les cellules quiescentes, cet ARNm serait rendu instable, en l'absence de l'action positive des facteurs de croissance, par épissage d'un intron, en position 4 (Prosperi, 1997).

Par ailleurs, plusieurs produits d'oncogènes et d'anti-oncogènes réguleraient également, respectivement de façon positive et négative, l'expression de la protéine PCNA. L'altération de l'expression de certains oncogènes, au sein de populations cellulaires néoplasiques, a été montrée comme associée à une dérégulation de l'expression du PCNA (Hall et coll., 1990). A contrario, l'expression du PCNA est aussi liée à celles de produits de gènes suppresseurs de tumeurs, dont, par exemple, le gène p53. La protéine p53 agit par l'intermédiaire de l'induction de la protéine inhibitrice p21. Cette dernière est capable de former avec la protéine PCNA, une CDK et une cycline, un complexe quaternaire stable, inhibant ainsi simultanément à la fois l'activité du couple CDK-cycline et celle du PCNA, exerçant ainsi une activité anti-proliférative (Prosperi, 1997).

III.A.4. Significations biologiques et utilisations comme marqueur de prolifération

Le développement d'anticorps, d'abord expérimentaux (Robbins et coll., 1987) puis commerciaux (Garcia et coll., 1989) permettant la détection de l'antigène PCNA sur prélèvements tissulaires fixés, inclus et coupés selon les règles classiques de l'anatomie pathologique ont permis d'envisager l'utilisation de ce marqueur en pratique quotidienne de laboratoire de diagnostic histopathologique en médecine humaine. L'utilisation possible de ces mêmes techniques et anticorps sur tissus animaux a rapidement été démontrée (Sarli et coll., 1995).

Parmi les anticorps monoclonaux développés contre le PCNA, reconnaissant des formes antigéniquement distinctes de la protéine localisées dans différents compartiments nucléaires, deux anticorps ont été principalement utilisés dans la plupart des études publiées : les anticorps PC10 et 19A2. Leurs caractéristiques diffèrent quelque peu. Aussi faut-il interpréter et comparer prudemment les résultats entre études utilisant des anticorps anti-PCNA différents. Ainsi la technique de fixation affecte de façon importante la réactivité du clone 19A2 et beaucoup moins celle du clone PC10 (Waseem et coll., 1990). Cependant une altération de la détection a été rapportée pour les deux anticorps en cas de fixation supérieure à 30 heures, qui induirait une forte diminution de la réactivité. Par ailleurs des variations importantes dans l'intensité du marquage sont observées entre cellules d'un même prélèvement lors de l'utilisation du clone PC10. Il a été proposé que ces variations d'intensité pourrait être mise en relation avec des niveaux d'expression différents de la protéine : une forte réactivité pourrait correspondre aux cellules présentes spécifiquement en phase S du cycle tandis qu'une faible positivité serait associée à la persistance de l'antigène dans les autres phases du cycle voire dans des cellules non prolifératives venant de quitter le cycle (Dervan et coll., 1992). Ceci conduirait à la détermination d'un index qui ne serait pas systématiquement corrélé aux autres méthodes d'estimation de la prolifération cellulaire.

L'expression du marqueur PCNA est apparue en première intention comme hautement dépendante du cycle cellulaire, du fait de son implication au cours de la phase de réplication de l'ADN, et a été corrélée aux autres techniques d'évaluation de la prolifération cellulaire (Garcia et coll., 1989). Cependant il faut noter que cette expression peut être détectée à la fois dans les cellules normales et dans les cellules tumorales prolifératives. En effet du fait de son rôle auxiliaire dans la synthèse de l'ADN, cette protéine est également synthétisée et donc détectable lors des phases de réparation de l'ADN, qui sont fréquentes dans une population néoplasique (Fairman, 1990 ; Shivji et coll., 1992).

De plus, si l'expression du marqueur PCNA apparaît significativement corrélée aux indices de prolifération déterminés par les autres techniques d'analyse lorsqu'on étudie des tissus normaux (Wijsman et coll., 1992), une telle corrélation serait fréquemment absente dans des tissus néoplasiques, du fait d'une probable dérégulation de son expression dans et au voisinage des tumeurs, induites par la sécrétion autocrine et paracrine de facteurs de croissance par les cellules tumorales (Hall et coll., 1990).

Enfin, l'antigène PCNA se caractérise par une demi-vie très longue, interférant avec la détermination de l'index de prolifération : 40% de la quantité de la protéine synthétisée durant le cycle cellulaire serait encore détectable pendant 48 heures après la sortie du cycle et l'entrée en phase de quiescence G0. Il y aurait ainsi en fait deux formes de l'antigène PCNA : une forme nucléosomale dont l'expression serait spécifique de l'entrée en phase S, associée aux sites de réplication de l'ADN, et une forme nucléoplasmique, qui persisterait dans les cellules qui ne seraient plus en phase active de prolifération (Bravo et coll., 1987). Ceci pourrait expliquer la valeur systématiquement supérieure de l'index PCNA par rapport à ceux déterminés sur les mêmes prélèvements par d'autres marqueurs de prolifération, dont l'antigène Ki-67 (Dervan et coll., 1992). Et la détermination de l'index PCNA serait ainsi potentiellement à l'origine d'une surestimation de l'activité proliférative néoplasique véritable.

Aussi du fait des fonctions biologiques multiples et variés de la protéine PCNA, des difficultés d'interprétation du marquage, en particulier de ses potentielles variations d'intensité et de localisation, et de l'ambiguïté induite par la longue demi-vie de ce marqueur, certains auteurs ont conseillé d'utiliser avec précaution la quantification de l'expression de l'antigène PCNA et son interprétation en pathologie tumorale (Scott et coll., 1991).

III.B. L'antigène Ki-67 : biologie et utilisation comme marqueur de prolifération

III.B.1. Historique et découverte

L'antigène Ki-67 a été découvert par Gerdes au début des années 80 (Gerdes et coll., 1983), au cours de travaux visant à produire des anticorps monoclonaux reconnaissant des antigènes nucléaires spécifiques de cellules de lymphome hodgkinien, les cellules d'Hodgkin et de Sternberg-Reed, par l'immunisation de souris avec des noyaux de cellules de la lignée de lymphome

hodgkinien humain L428. La plupart des anticorps obtenus lors de ces travaux réagissait avec toutes les cellules tumorales ; l'un ne réagissait qu'avec les cellules en cycle cellulaire et jamais avec les cellules temporairement ou définitivement hors cycle. La protéine fut ainsi définie originellement par l'anticorps monoclonal prototype Ki-67 ainsi obtenu, dont le nom provient de l'association de "Ki", abréviation issue du nom de la ville où furent réalisés les travaux de Gerdes (Kiel) et du nombre "67", correspondant à la localisation du clone originel sur la plaque 96-puits dans laquelle il a été isolé. Comme l'antigène ne fut pas initialement caractérisé, le nom Ki-67 fut donné pour désigner également la protéine reconnu par cet anticorps. Ce nom initial a été jusqu'à aujourd'hui conservé, les études ultérieures sur sa structure primaire n'ayant révélé aucune homologie avec un polypeptide connu et sa fonction précise demeurant jusqu'à présent encore en grande partie non déterminée.

La caractérisation du profil de marquage obtenu avec l'anticorps monoclonal Ki-67, étudié peu après sa découverte, s'est révélée particulièrement intéressante. L'anticorps réagit avec une structure nucléaire présente exclusivement dans les cellules en prolifération. Une analyse détaillée du marquage obtenu au cours du cycle cellulaire a ainsi montré que l'antigène était présent dans le noyau des cellules au cours des phases G1, S, et G2 du cycle cellulaire, ainsi que durant la phase M de mitose. Les cellules quiescentes en phase G0 n'exprimaient pas l'antigène Ki-67 (Gerdes et coll., 1984). Il fut rapidement montré que l'expression du Ki-67 s'appliquait à la fois aux cultures de cellules normales mais également aux tissus tumoraux.

III.B.2. De la structure à la fonction

Les premiers essais d'isolement et de purification de l'antigène Ki-67 se sont avérés infructueux, en raison probablement de l'altération de l'épitope que les procédures biochimiques entraînaient (Verheijen et coll., 1989a). La nature de l'antigène Ki-67 demeura inconnue jusqu'en 1991, année où le premier isolement par immunoblot de l'antigène fut réalisé et où le gène Ki-67 a été cloné (Gerdes et coll., 1991). L'isolement de l'antigène a été rendu possible par l'utilisation d'une technique d'extraction rapide suivie d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, adaptée pour la séparation de très volumineuses protéines. C'est ainsi que fut déterminé que l'anticorps Ki-67 reconnaissait un volumineux complexe macromoléculaire qui l'on pensait originellement composé de deux sous-unités (Seigneurin et coll., 1991). La nature protéique de l'antigène fut déterminée par comparaison avec des banques d'expression d'ADN complémentaire (ADNc). Il fut ainsi identifié

un clone partiel de 1095 paires de bases codant pour la séquence protéique correspondant à l'épitope reconnu par l'anticorps Ki-67 (Gerdes et coll., 1991). L'étude de la séquence de ce clone n'a révélé la présence d'aucune homologie avec d'autres gènes connus. Cette séquence comportait trois motifs nucléotidiques répétés, constitués chacun d'environ 366 nucléotides. Au sein de ces motifs se trouvent des régions centrales hautement conservées d'environ 62 paires de bases codant pour des motifs polypeptiques caractéristiques et spécifiques de la molécule.

La structure polypeptidique primaire complète de la protéine a été publiée deux ans plus tard, soit dix ans après la description initiale de l'antigène Ki-67, après clonage et séquençage de la totalité de son ADNc (Schluter et coll., 1993). Cette séquence correspond à un ARN messager de 11,5 kilobases qui n'est retrouvé par analyse Northern blot qu'au sein des cellules en cycle (Gerdes et coll., 1991). La séquence complète de l'ADNc montre que les motifs nucléotidiques répétés observés sur le clone partiel sont en fait au nombre de 16, constituant un exon de 6845 paires de bases. Cette séquence d'ADNc a également permis de confirmer la localisation du gène Ki-67 sur le bras long du chromosome 10 humain (10q25ter), position qui avait déjà été préalablement déterminée (Schonk et coll., 1989). Le gène aurait une longueur totale d'environ 30000 paires de bases (Duchrow et coll., 1996).

L'antigène Ki-67 correspond donc à une molécule protéique non-histone, dont deux isoformes respectivement de 320 et 359 kD ont été isolées. D'un point de vue structural, les deux isoformes protéiques posséderaient plusieurs sites potentiels de phosphorylation ainsi qu'un site de liaison éventuel au GTP (guanoside triphosphate) ou à l'ATP (adénoside triphosphate), à son extrémité carboxy-terminale. Par ailleurs la protéine porte également deux signaux de translocation nucléaire. Les deux isoformes, différant par un segment d'environ 40 kD, sont issues d'un épissage alternatif de l'ARNm issu du gène Ki-67. Toutes deux présentent également une partie centrale très grande, constituée d'un motif 16 fois répété, qui devrait pouvoir former une hélice de type α (Guinebretière et coll., 1997). Ces motifs sont riches en résidus aminés cystéine, responsables du caractère fortement basique de ces sites. La séquence de ce motif est phylogénétiquement très conservée dans les différentes espèces, témoin de l'importance de son rôle fonctionnel. Ce motif central correspond au site de reconnaissance de la plupart des anticorps reconnaissant spécifiquement le Ki-67 (Kubbutat et coll., 1994). L'antigène Ki-67 n'est ainsi pas spécifique de l'espèce humaine, puisque sa présence a été rapportée dans des lignées cellulaires et des tissus de nombreuses espèces

animales (Verheijen et coll., 1989a ; Falini et coll., 1993). Il ne paraît pas par ailleurs exister de spécificité d'organe ou de tissus, les cellules épithéliales et mésenchymateuses prolifératives exprimant le Ki-67 (Seigneurin et coll., 1991). Une étude a toutefois rapporté de manière surprenante la négativité d'un tissu fortement prolifératif, la moelle hématopoïétique normale (Van Bockstaele et coll., 1991).

La fonction précise de l'antigène Ki-67 n'est pas encore aujourd'hui totalement élucidée. Les premières études visant à préciser le rôle de cette protéine ont suggéré que l'antigène Ki-67, n'étant pas physiquement lié à l'ARN mais semblant associé à l'ADN et aux protéines non histones, pourrait faire partie de l'enveloppe chromosomique et serait impliqué dans la structuration des chromosomes (Seigneurin et coll., 1991). Plusieurs arguments sont ainsi en faveur d'une activité de liaison à l'ADN : présence de 16 motifs polypeptidiques répétés et hautement conservés, présence de nombreux résidus basiques, distribution topographique au cours du cycle (Sawhney et coll., 1992). Pour certains auteurs toutefois, le Ki-67 ne serait pas directement associé aux acides nucléiques (Littleton et coll., 1991). Il a été également suggéré que l'antigène Ki-67 pourrait être un facteur de régulation de l'activité transcriptionnelle de gènes liés à la prolifération, jouant un rôle de régulateur, mais pas d'initiateur, de la division cellulaire (Sasaki et coll., 1987). Quoiqu'il en soit l'expression de la protéine Ki-67 est indispensable à la progression du cycle de prolifération, puisque des expériences d'incubation avec des oligodeoxynucléotides complémentaires de l'ARN messager Ki-67 ou de microinjections intracellulaires d'anticorps anti-Ki-67, inhibent le déroulement de la phase S du cycle (Scholzen et coll., 2000).

III.B.3. Expression durant le cycle cellulaire

Par définition pour un marqueur de prolifération, l'antigène Ki-67 n'est pas détecté dans des cellules quiescentes ou en phase G₀, mais sa présence peut être mise en évidence au cours des différentes phases du cycle cellulaire. Quantitativement, son expression augmente de la phase G₁ à la phase M avec un maximum, selon les auteurs, atteint soit dès la fin de la phase S (Seigneurin et coll., 1991), soit lors des phases G₂ et M (Landberg et coll., 1991 ; Sawhney et coll., 1992). Sa quantité est de toute façon maximale en début de mitose pour décroître ensuite.

L'expression du Ki-67 est variable durant la phase G₁. En effet, lors de la transition du stade G₀ à G₁, c'est-à-dire lors de l'entrée dans le cycle cellulaire, les cellules n'expriment pas le Ki-67, alors

qu'il est détectable dans les cellules en phase G1 qui enchaînent un nouveau cycle dès la sortie du précédent. Lorsqu'il n'est pas présent au début de la phase G1, l'antigène Ki-67 apparaît sensiblement au milieu de cette phase, ce qui pourrait correspondre au début de sa synthèse (Linden et coll., 1992). L'antigène est ensuite constamment détecté lors des phases S, G2 et M du cycle. A noter toutefois que certains auteurs ont rapporté l'existence de rares cellules, classées en S ou G2 par leur contenu en ADN, et qui sont Ki-67 négatives : il s'agirait de cellules arrêtées ou bloquées au cours du déroulement du cycle en S ou G2 et dans lesquelles l'antigène Ki-67 aurait été dégradé (Baisch et coll., 1987).

L'expression de l'antigène Ki-67 détectée par immunohistochimie présente par contre des variations topographiques au cours des différentes phases du cycle. D'une manière générale, le marquage observé sur des cellules en interphase est strictement nucléaire sans qu'aucun marquage cytoplasmique ne soit observé dans quelque phase du cycle que ce soit, y compris durant la mitose. Le marquage apparaît régulièrement intense en région nucléolaire et globalement hétérogène pour le nucléoplasme (Van Dierendonck et coll., 1989).

En phase G1, le marquage apparaît d'abord nucléoplasmique puis il devient rapidement nucléolaire ou périnucléolaire. En phase S, le marquage s'étend à l'ensemble du nucléoplasme, bien que demeurant jusqu'à la fin de cette phase majoritairement nucléolaire. En phase G2, le marquage se répartit à l'ensemble du noyau cellulaire, sans prédominance nucléolaire perceptible (Verheijen et coll., 1989a). Au cours de la mitose, la coloration varie. Le marquage est nucléoplasmique, comme en phase G2, lors de la prophase. Puis, les chromosomes condensés en métaphase apparaissent fortement colorés. Ensuite, durant l'anaphase et le début de la télophase, la coloration devient multifocale et plus granuleuse. En fin de télophase, le nucléole commence à se former et l'antigène Ki-67 s'exprime sous forme ponctuée. Il s'ensuit une agrégation de ces points jusqu'à une localisation nucléolaire distincte, après sa reconstitution au sein des deux cellules filles issues de la division. Dans le nucléole, des études en microscopie confocale et électronique ont montré que le marquage était localisé dans le composant nucléolaire fibrillaire dense, alors que le composant granulaire et le centre fibrillaire sont négatifs (Verheijen et coll., 1989b).

Du fait de ces variations des taux et des répartitions topographiques de l'antigène Ki-67, il a été proposé d'utiliser son expression pour définir précisément la place qu'occupe dans le cycle chaque cellule d'une population. Ainsi l'estimation de la répartition des cellules dans chacune des phases du cycle (G1, S, G2), réalisée par la détection du Ki-67, a été rapportée comme en accord avec les

autres méthodes, telles que la quantification de l'ADN et l'incorporation de BrdU (Guillaud et coll., 1991). A noter toutefois que cette évaluation ne peut être mise en oeuvre que par analyse cytométrique, limitant donc les possibilités de son utilisation en pratique clinique.

III.B.4. Significations biologiques et utilisations comme marqueur de prolifération

Pour justifier son utilisation comme marqueur fiable de la prolifération cellulaire, la détection immunohistochimique de l'antigène Ki-67 fut comparée aux autres techniques d'évaluation de l'activité proliférative. Plusieurs études ont ainsi montré une corrélation forte entre l'index de marquage Ki-67 et les index de prolifération, calculés par les techniques d'incorporation de thymidine tritiée et de BrdU, justifiant l'utilisation de ce marqueur dans la quantification de la prolifération néoplasique (Silvestrini et coll., 1988 ; Deshmukh et coll., 1990). A noter toutefois que dans des conditions de privation nutritionnelle, susceptibles d'être présentes dans une population cellulaire néoplasique, une divergence entre l'activité proliférative déterminée par l'index Ki-67 et par les autres techniques d'évaluation de la prolifération a été rapportée (Van Dierendonck et coll., 1989).

L'anticorps princeps développé par Gerdes pour détecter l'expression de l'antigène Ki-67 n'était utilisable que sur coupes de tissus congelés, limitant ses possibilités d'application à la pratique expérimentale ou à de rares structures dans un cadre de diagnostic clinique. Cependant le développement d'anticorps permettant de reconnaître des épitopes de l'antigène Ki-67 résistants à la fixation et à l'inclusion, dont l'anticorps commercial le plus utilisé MIB1 (pour Molecular Immunology Borstel), a permis d'étendre le domaine d'application de la détection de ce marqueur de prolifération en pratique anatomo-pathologique clinique courante de routine ou pour des études rétrospectives (Gerdes et coll., 1992 ; McCormick et coll., 1993). Ces nouveaux anticorps ont été obtenus par immunisation contre des protéines de fusion obtenues à partir de l'antigène Ki-67 et produites par des bactéries (Key et coll., 1993a). Ils sont utilisables sur coupes tissulaires de prélèvements inclus en paraffine, nécessitant éventuellement un pré-traitement par la chaleur, en particulier à l'aide des micro-ondes (Shi et coll., 1991 ; Key et coll., 1993b). L'utilisation de ces anticorps, dont le clone MIB1 représente le chef de file, a fourni l'opportunité de réaliser des études rétrospectives sur du matériel archivé parfois durant plusieurs décennies (Guinebretière et coll., 1997).

Comme l'expression de l'antigène Ki-67 est spécifique des cellules en cycle et que la population tumorale positive peut être déterminée, pour ce marqueur, avec une grande reproductibilité sur des coupes de prélèvements standards, la détermination de l'index de marquage Ki-67 a été généralement acceptée par la communauté des anatomopathologistes comme une technique fiable d'évaluation de la prolifération cellulaire tumorale. Contrairement à la demi-vie prolongée de la protéine PCNA qui compromet la validité de l'index de prolifération déterminé à l'aide de ce marqueur, l'antigène Ki-67 a une demi-vie très brève, estimée à environ 20 minutes ; il est ainsi très vite et totalement catabolisé après la fin de la mitose. Cette demi-vie courte tient principalement à sa sensibilité aux protéases, induisant sa dégradation métabolique rapide lorsque les cellules quittent le cycle. L'élimination rapide de cette protéine serait liée à la présence de sites PEST (séquences d'acides aminés riches en résidus de type Proline, acide glutamique, Sérine et Thréonine). Les molécules possédant ces sites, telles que les cyclines et de nombreuses protéines à fonctions régulatrices, sont connues pour être soumises à une dégradation rapide en fin de mitose (Chevallier, 1993). Aussi, les cellules dans lesquelles l'antigène Ki-67 est détecté sont pour leur immense majorité des cellules présentes dans le cycle de prolifération ou de très rares cellules venant tout juste de le quitter (Ross et coll., 1995).

Pour une utilisation de routine en laboratoire de diagnostic, l'antigène Ki-67, détecté à l'aide de l'anticorps MIB1, est ainsi considéré comme le meilleur marqueur de prolifération pour une application sur coupes de prélèvements réalisés selon les techniques conventionnelles (Rose et coll., 1994). Du fait de ces propriétés et de la facilité de réalisation des techniques immunohistochimiques, l'antigène Ki-67 occupe une place importante dans l'évaluation pronostique des tumeurs humaines. Son intérêt a été ainsi étudié dans un grand nombre de types tumoraux différents (tumeurs mammaires, lymphomes malins, tumeurs cérébrales, hémopathies malignes, sarcomes des tissus mous, mélanomes, tumeurs pulmonaires, coliques, utérines, ovariennes, testiculaires, prostatiques, vésicales...) (Guinebretière et coll., 1997). La valeur de la détection de l'antigène Ki-67 a été confrontée aux différents éléments cliniques et aux paramètres histologiques connus pour chacun des types tumoraux. Il n'existe généralement pas de relation avec les éléments cliniques (âge, localisation, taille de la tumeur etc...) mais en revanche, l'index mitotique, les différents grades histopronostiques et la présence de métastases ont été trouvés fortement liés au Ki-67 (Guinebretière et coll., 1997). L'index Ki-67 a ainsi été proposé pour entrer dans le calcul de nouveaux indices pronostiques ou de préciser les indices déjà existants d'un nombre considérable de types néoplasiques, tout particulièrement ceux pour lesquels l'évolution biologique spontanée et difficile à prédire par les seuls critères de l'examen histopathologique (Seigneurin et coll., 1991).

III.C. Utilisations de la détection des marqueurs de prolifération PCNA et Ki-67 en oncologie vétérinaire

L'utilisation de la détection immunohistochimique des marqueurs de prolifération sur tissus animaux normaux et pathologiques appartient à l'histoire récente de l'anatomie pathologique vétérinaire. Les premières études, datant d'une dizaine d'années, ont d'abord démontré que cette détection était techniquement possible à l'aide des anticorps primitivement développés pour la cancérologie humaine, mais reconnaissant des épitopes des antigènes PCNA et Ki-67 phylogénétiquement conservés, au moins chez les mammifères.

Puis plusieurs études se sont ensuite tout naturellement intéressées à l'intérêt pronostique de la détection de ces marqueurs en pathologie tumorale vétérinaire spontanée. Deux types tumoraux ont, du fait de leur fréquence et leur importance clinique, particulièrement retenu l'attention : les tumeurs mammaires des carnivores domestiques et les lymphomes du chien. La revue bibliographique que nous présentons ici, consacrée à la pathologie tumorale vétérinaire spontanée, sera exclusivement limitée à une revue des travaux intéressant les tumeurs des carnivores domestiques, à l'exclusion des applications, pourtant nombreuses, des études de cancérologie expérimentale ou toxicologique appliquées principalement aux rongeurs de laboratoire, ainsi que les travaux jusqu'ici anecdotiques concernant les autres espèces animales domestiques que canine et féline.

III.C.1. Détection immunohistochimique des marqueurs de prolifération PCNA et Ki-67 sur tissus animaux

La première étude rapportant la possibilité de la détection in situ du marqueur de prolifération PCNA en oncologie vétérinaire date de 1993 (Zeman et coll., 1993). Cette étude princeps visait à caractériser la prévalence et la distribution spatiale des cellules prolifératives et des cellules en situation d'hypoxie au sein de prélèvements biopsiques de différentes tumeurs spontanées chez le chien. Ces deux facteurs, niveau de prolifération et degré d'oxygénation cellulaire, sont en effet impliqués dans l'efficacité des traitements radiothérapeutiques et chimiothérapeutiques pour le contrôle local des tumeurs chez l'homme. Plus que la mise en évidence d'une relation géographique avérée existant entre le degré d'oxygénation et la prolifération cellulaire, cette étude a pour la

première fois montré la possibilité de l'utilisation de ces techniques immunohistochimiques de détection des marqueurs de prolifération en pathologie vétérinaire. Elle a été complétée en 1995 par une étude visant à évaluer l'évolution pré- et post-radiothérapeutique de l'expression des marqueurs d'hypoxie et de prolifération sur des tumeurs superficielles canines. Cette seconde étude, également pionnière, représentait une première approche d'utilisation de la détection des marqueurs de prolifération à l'évaluation de la réponse thérapeutique en oncologie vétérinaire (Raleigh et coll., 1995).

S'intercalant entre ces deux études, des auteurs ont montré la détection possible du marqueur PCNA sur des prélèvements de tumeurs félines et équinnes, en plus des tissus canins (Theon et coll., 1994). Leur étude décrit une corrélation entre les évaluations de la prolifération cellulaire déterminée soit par incorporation *in vitro* de BrdU, considérée comme technique de référence, soit définie par l'index de marquage PCNA. Cette étude justifiait ainsi la détection *in situ* de ce marqueur comme une technique fiable d'évaluation de la prolifération sur tissus animaux.

La possibilité de la détection immunohistochimique du marqueur de prolifération Ki-67 sur tissus animaux a été déterminé dès 1989 (Falini et coll., 1989). Ce n'est cependant qu'en 1994 que son utilisation sur prélèvements de tissus tumoraux canins a été pour la première fois proposée (Sarli et coll., 1994). Par la suite, une étude de l'expression de l'antigène Ki-67 sur tissus normaux de chien a été publiée (Laprie et coll., 1998). Une telle étude, qui autorise la détermination et la quantification de la fraction tissulaire proliférative physiologique de la plupart des tissus et organes du chien, apparaît indispensable comme base de données de référence permettant ainsi la mise en évidence de la dérégulation de l'activité proliférative tissulaire au cours de phénomènes pathologiques, en particulier néoplasiques. A notre connaissance, des travaux comparables, consacrées à l'étude de l'expression de ce marqueur de prolifération dans des tissus normaux (non-néoplasiques) chez d'autres espèces animales que le chien n'ont pas été à ce jour publiés.

III.C.2. Applications à l'évaluation pronostique et thérapeutique en oncologie vétérinaire spontanée

A la suite de ces travaux pionniers, l'utilisation de la détection des marqueurs de prolifération a été très rapidement pressentie et proposée comme potentiellement intéressante dans l'évaluation du

comportement biologique des tumeurs animales. La cancérologie vétérinaire a en cela suivi de près l'évolution observée en anatomie pathologique oncologique humaine. Au cours de ces 10 dernières années en effet, le nombre d'études consacrées à l'évaluation de la valeur pronostique de la détermination de la prolifération à l'aide de la détection des marqueurs PCNA et Ki-67 a connu une croissance exponentielle en cancérologie humaine. Une revue de la bibliographie consacrée à l'expression de ces marqueurs en oncologie humaine montre qu'il n'existe en fait que très peu de types tumoraux pour lesquels une telle évaluation n'a pas été conduite. Pour des raisons évidentes, les travaux comparables réalisés chez l'animal sont considérablement plus limités. Les principales études ont concerné deux tumeurs d'importance clinique majeure en pratique vétérinaire: les tumeurs mammaires et les lymphomes. Les différentes études réalisées sur des tumeurs spontanées canines et félines, dont les résultats apparaissent d'ailleurs parfois contradictoires, sont présentés ci-dessous.

III.C.2.a. Tumeurs mammaires

La première étude consacrée à l'évaluation de l'intérêt de la détection des marqueurs de prolifération dans l'étude pronostique des tumeurs mammaires canines et félines s'intéressait exclusivement au marqueur PCNA (Preziosi et coll., 1995). Elle décrit des différences significatives entre les index de prolifération (définis par le pourcentage de cellules tumorales positives pour le marqueur PCNA par rapport à la population tumorale totale) entre les tumeurs mammaires bénignes et malignes dans les deux espèces. De manière tout à fait intéressante, les auteurs ont défini deux index de marquage PCNA, en fonction de l'intensité de marquage observé : un index prenant exclusivement en compte les cellules les plus intensément positives, pressenti comme correspondant à la population cellulaire présente en phase S du cycle, au cours de laquelle l'expression de ce marqueur est rapportée comme la plus forte ; un second index prenant en compte l'ensemble de la population cellulaire tumorale positive, et ce quelle que soit l'intensité du marquage observé, susceptible de représenter la totalité de la fraction proliférative, c'est-à-dire la population néoplasique présente dans l'ensemble des différentes phases du cycle cellulaire. Ils ont observé une corrélation positive entre ces deux index, souhaitable voire indispensable dans un souci de standardisation de la technique entre laboratoires et donc à sa diffusion et à son utilisation.

Une étude ultérieure a comparé la valeur pronostique de la détermination de la fraction proliférative dans le cadre de la pathologie tumorale mammaire chez le chien, à l'aide de trois techniques

utilisées sur les mêmes prélèvements (détermination des AgNOR et des index Ki-67 et PCNA). En plus de l'examen histopathologique, facteur pronostique confirmé par cette étude, seul l'index PCNA est apparu significativement corrélé avec les risques de récurrence tumorale (Lohr et coll., 1997). Cette valeur pronostique du marqueur PCNA pour les tumeurs mammaires du chien a été confirmée dans une étude récente où l'activité télomérase fut également proposée comme marqueur significatif de malignité (Funasoki et coll., 2000).

Des résultats contradictoires ont cependant été publiés par d'autres auteurs. Plusieurs études ont en effet mis l'accent sur la valeur pronostique de la détection de l'antigène Ki-67 et tout particulièrement sur sa supériorité par rapport à celle de l'antigène PCNA, à la fois pour les tumeurs mammaires dans l'espèce canine (Pena et coll., 1998 ; Perez Alenza et al, 2000) que dans l'espèce féline (Castagnaro et coll., 1998). Dans les deux espèces, l'index Ki-67 apparaît corrélé significativement avec le comportement biologique et clinique des tumeurs, tel que les taux de survie, les temps de survie sans récurrences ou le potentiel métastatique. Dans ces études toutefois, la supériorité de l'utilisation de la détection des marqueurs de prolifération par rapport à la mise en œuvre des systèmes de grading histopathologiques conventionnels n'est pas démontrée de façon évidente. En effet, dans la plupart des cas, un examen histopathologique standard permet, avec une bonne fiabilité, de prévoir l'évolution, favorable ou défavorable, des néoplasies mammaires du chien et du chat. Pour ces types tumoraux, ce serait potentiellement dans une approche de sélection des tumeurs redevables de thérapies adjuvantes à la chirurgie que l'estimation de la prolifération cellulaire à l'aide des marqueurs Ki-67 ou PCNA pourrait s'avérer pertinente. Aucune étude à ce jour n'a été cependant, à notre connaissance, conduite pour évaluer cet intérêt potentiel dans le cadre de la cancérologie mammaire vétérinaire.

III.C.2.b. Lymphomes malins

Le second type tumoral, après les tumeurs mammaires, à avoir suscité le plus d'études dédiées à l'expression des marqueurs de prolifération correspond aux lymphomes malins.

A l'instar de l'oncologie humaine, où la détermination de la fraction proliférative par l'index Ki-67 dans les lymphomes non hodgkiniens a une forte valeur pronostique, l'évaluation de l'expression de l'antigène Ki-67, à la fois sur coupes tissulaires et frottis de cytoponction ganglionnaire, a été montrée comme d'un grand intérêt dans l'évaluation du comportement biologique des lymphomes

canins. Une valeur seuil de l'index fixée à 21% a ainsi été proposée, permettant de discriminer les lymphomes de bas et de haut grade de malignité (Fournel-Fleury et coll., 1997). La détermination de cet index permettrait en outre de prendre en compte les variations individuelles dans l'intensité de la prolifération tumorale, parfois importantes, observées au sein d'une même sous-classe histopathologique de lymphome canin. Par contre, une étude de peu ultérieure a montré que l'index PCNA ne présentait pas de valeur pronostique en termes de durée de survie, avec ou sans traitement, pour les chiens atteints de lymphomes malins, contrairement à la détermination du nombre moyen d'AgNOR par cellule tumorale, qui différencierait significativement selon le degré de malignité des lymphomes (Kiupel et coll., 1998).

Enfin, dans l'espèce féline, une étude réalisée sur 90 cas de lymphomes n'a pas montré de valeur pronostique significative dans la détermination de la fraction proliférative, du moins déterminée par l'index PCNA ou l'évaluation des AgNOR (Vail et coll., 1998).

De manière particulièrement intéressante, le lymphome malin du chien est également le seul type tumoral pour lequel des études, visant à évaluer l'intérêt de la détection des marqueurs de prolifération dans une perspective d'évaluation thérapeutique, ont été conduites. La première étude en ce sens semblait indiquer que l'index de marquage PCNA n'était pas un critère prédictif de la réponse des lymphomes canins à la chimiothérapie anti-cancéreuse, contrairement à l'évaluation des AgNOR et à la détermination du temps de doublement de la population tumorale, calculé par l'incorporation *in vitro* de BrdU (Vail et coll., 1996). Les résultats de cette étude ont été corroborés par d'autres auteurs, qui ont confirmé l'intérêt de l'évaluation des AgNOR (i.e. nombre moyen, surface totale moyenne ou surface maximale des AgNOR par noyau), et non celle des marqueurs PCNA ou Ki-67, dans la prédiction de la réponse à la chimiothérapie des lymphomes du chiens (Kiupel et coll., 1999). Plus récemment toutefois, la détermination de l'index Ki-67 avant initiation de traitement a été montré comme corrélé au temps de survie sans récurrence après chimiothérapie (Philipps et coll., 2000). Dans cette étude, l'évaluation quantitative du processus apoptotique sur les mêmes prélèvements de lymphome canin, s'est révélé également prédictive de la durée séparant la rechute avec l'initiation du traitement. Pour la première fois en oncologie vétérinaire, ces deux paramètres, prolifération et apoptose, ont dans cette étude été associés pour définir un index de "turnover" de la population lymphomateuse, apparaissant comme un paramètre objectif de réponse tumorale au traitement anti-cancéreux.

III.C.2.c Autres types tumoraux

A l'exception notable de celles consacrées au mastocytome cutané canin, et, dans une moindre mesure, au mélanome cutané, les études consacrées aux autres tumeurs spontanées animales sont d'intérêt clinique potentiellement plus limité, parce que consacrées à des types tumoraux moins fréquents ou pour lesquels d'autres facteurs pronostiques établis existent. Il n'en demeure pas moins qu'elles démontrent, à l'instar de ce qui fut réalisé en cancérologie humaine, que le champ d'application de la détection des marqueurs de prolifération en oncologie vétérinaire est probablement immense et à l'heure actuelle largement sous-estimé.

L'une des toutes premières applications de la détection des marqueurs de prolifération en oncologie vétérinaire fut ainsi consacrée aux tumeurs testiculaires du chien (Sarli et coll., 1994). Cette étude, non rétrospective, n'avait cependant aucune visée pronostique. Elle concluait toutefois que la progression de la forme tubulaire vers la forme diffuse des séminomes et des sertolinomes du chien était associée à une augmentation significative de l'activité de prolifération cellulaire, cette dernière forme étant considérée pour les deux types tumoraux comme potentiellement plus agressive.

De la même façon, une étude non rétrospective consacrée à l'expression du marqueur PCNA dans les carcinomes basocellulaires et spinocellulaires du chien montrait que des index de marquage élevés étaient corrélés avec de forts index mitotiques et des critères histologiques de plus grande agressivité (i.e. architecture trabéculaire, cytologie peu différenciée), sans que des informations pronostiques significatives soient apportées (Maiolino et coll., 1995).

Deux études rétrospectives, consacrées à deux types tumoraux d'incidence importante en cancérologie vétérinaire, méritent une attention particulière.

La plus ancienne est consacrée à une tumeur majeure du chien, par sa fréquence, sa variabilité d'évolution et sa gravité potentielle, le mastocytome cutané canin. Pour la première fois, les auteurs proposent la mise en oeuvre de techniques alternatives au grading histopathologique conventionnel, pour préciser l'évolution biologique souvent incertaine de ce type néoplasique (Simoes et coll., 1994). Par contre, si les trois paramètres étudiés (i.e. le grading histopathologique, la détermination du nombre moyen d'AgNOR par mastocytes tumoraux, et l'index de prolifération PCNA) diffèrent significativement entre mastocytomes de malignité différente, seule l'utilisation combinée des trois méthodes d'évaluation pronostique permettrait de déterminer, avec une fiabilité de 80%, le risque de récurrence tumorale et de métastases après exérèse à 3, 6 et 9 mois après chirurgie. Aussi et même s'ils

sont prometteurs, ces résultats, par le coût temporel et financier qu'implique la multiplication des techniques nécessaires, ne semblent pas directement utilisables en pratique de laboratoire de diagnostic.

La seconde étude est consacrée au mélanome du chien et du chat. Elle montre que l'index de prolifération Ki-67, mais pas l'index PCNA, représente un facteur pronostic indépendant significatif, en terme de prédiction de la durée de survie, pour ce type tumoral dans les deux espèces (Roels et coll., 1999). A noter toutefois que, pour les mélanomes, la valeur pronostique de l'examen histopathologique conventionnel est forte, limitant de ce fait potentiellement l'intérêt et l'application de la détection de l'antigène Ki-67 à quelques cas individuels d'interprétation douteuse ou difficile à l'examen microscopique conventionnel.

Enfin et de façon peut-être plus anecdotique du fait de leur faible fréquence spontanée en oncologie vétérinaire, la valeur pronostique de l'expression des marqueurs de prolifération a été évaluée pour les plasmocytomes extramédullaires du chien (Platz et coll., 1999) et les tumeurs pulmonaires canines (Griffey et coll., 1999). Pour ces différents types néoplasiques, l'évaluation de la prolifération à l'aide du marqueur Ki-67 apparaît prometteuse en tant que facteur de prédiction de l'évolution tumorale.

CONCLUSION

La revue bibliographique que nous avons menée nous permet de confirmer l'importance théorique et pratique de l'étude de la prolifération cellulaire en oncologie. Elle révèle également la complexité des mécanismes, loin d'être d'ailleurs tous totalement élucidés, opérant à l'échelle de la cellule et a fortiori de l'organisme entier pour réguler ce processus et maintenir l'homéostasie tissulaire. Elle permet de dégager l'unité biologique des mécanismes mis en jeu dans le processus de prolifération cellulaire normal ou néoplasique, et les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la dérégulation de ce processus observée au cours de la transformation et de la progression tumorale (Cordon-Cardo, 1995). Les événements et facteurs moléculaires intervenant dans l'induction ou la répression de la prolifération cellulaire sont complexes et impliquent des champs de communication moléculaire inter- et intracellulaires dont l'étude est en constante expansion. La compréhension de ces mécanismes est cependant fondamentale car il apparaît clairement que des anomalies dans les mécanismes de contrôle de la prolifération cellulaire ont des implications considérables dans différents processus pathologiques, et tout particulièrement dans la croissance incontrôlée des tissus cancéreux (Dictor et coll., 1999).

Si ces connaissances sont fondamentales d'un point de vue théorique, elles le sont également sur un plan pratique, comme le montre le nombre considérable d'études consacrées à l'évaluation de l'intérêt pronostique de l'estimation de l'activité proliférative en pathologie oncologique humaine. Et, bien que de plus en plus d'actualité en pratique oncologique vétérinaire, les techniques d'évaluation de la prolifération cellulaire ont incontestablement un vaste champ d'application clinique encore inexploré en pathologie tumorale animale. La méthode idéale d'évaluation de la prolifération cellulaire doit présenter plusieurs qualités. Elle doit être simple, fiable, reproductible, utilisable sur des prélèvements histologiques ou cytologiques réalisés et techniqués de façon classique, peu coûteuse, et de réalisation et d'interprétation la plus aisée possible. Aussi, les techniques basées sur la détection immunohistochimique des marqueurs de prolifération paraissent prometteuses. Et parmi ces marqueurs, l'antigène Ki-67 semble mériter une attention toute particulière.

Leur intérêt nous semble devoir être exploré dans l'amélioration de notre capacité à prévoir le comportement biologique de tumeurs animales, pour lesquelles les techniques d'examen

conventionnelles, principalement histopathologiques, ne permettent pas systématiquement et de façon incontestable de prédire l'évolution clinique. Aussi évaluer la valeur pronostique potentielle de la détection de ce marqueur Ki-67 dans l'étude d'un type tumoral aussi fréquent et régulièrement imprévisible que le mastocytome cutané canin nous est apparu d'un grand intérêt. Cette évaluation a fait l'objet de notre étude expérimentale.

Etude expérimentale

**Application de la détection
immunohistochimique
des marqueurs de prolifération
PCNA et Ki-67 à l'étude
pronostique du mastocytome
cutané canin**

INTRODUCTION

La peau et le tissu sous cutané sont le siège des tumeurs primitives les plus couramment rencontrées chez les carnivores domestiques en général, et chez le chien en particulier (Moulton, 1990 ; Goldschmidt et Shofer, 1992). Parmi elles, le mastocytome canin représente l'une, si ce n'est la tumeur cutanée la plus fréquente. Ce type néoplasique est issu de la prolifération tumorale au sein du derme, de l'hypoderme et/ou du tissu conjonctivo-adipeux sous-cutané, de mastocytes, cellules conjonctives d'origine médullaire intervenant directement dans un grand nombre de mécanismes immunologiques, humoraux et cellulaires de défense de l'organisme. Selon les études, le mastocytome représente de 16 à 21 % de l'ensemble des tumeurs cutanées du chien et de 11 à 27 % des cancers cutanés canins (Macy, 1985 ; O'Keefe, 1990 ; Goldschmidt et Shofer, 1992).

Malgré son incidence élevée, le mastocytome cutané canin constitue, par la diversité de ses aspects cliniques et anatomopathologiques, une affection déroutante pour le praticien comme pour l'histopathologiste. Se présentant sous un grand polymorphisme clinique (nodule tégumentaire circonscrit unique ou multicentrique, empâtement cutané œdémateux diffus, ou infiltration mal délimitée des plans profonds), le mastocytome cutané se caractérise également par sa grande variabilité d'évolution : il peut constituer une tumeur de croissance lente demeurant localisée à son site d'apparition pour une longue période (si ce n'est définitivement), ou infiltrer largement les tissus périphériques et profonds. Ce néoplasme est par ailleurs susceptible de récidiver localement, en dépit d'une exérèse chirurgicale a priori complète, et ces récurrences se caractérisent souvent par une agressivité majorée par rapport à la tumeur initiale. Enfin, et dans un nombre important de cas (10 à 40 % selon les auteurs), le mastocytome est capable de dissémination métastatique par voie lymphatique et hématogène aux nœuds lymphatiques loco-régionaux et/ou aux viscères internes, tels que la rate, le foie, la moelle osseuse préférentiellement, et beaucoup plus rarement aux poumons (Macy, 1985 ; O'Keefe, 1990).

Afin de mieux caractériser des facteurs capables de prédire le comportement et l'évolution des mastocytomes cutanés, différents éléments épidémiologiques et cliniques ont été évoqués, permettant une orientation pronostique (Macy, 1985). C'est cependant l'examen histopathologique mis en œuvre sur pièce d'exérèse qui permet, outre de poser un diagnostic de certitude de

mastocytome, d'apporter les informations pronostiques les plus significatives. Trois études ont proposé des gradings histologiques des mastocytomes du chien (Hottendorf et Nielsen, 1967 ; Bostock, 1973 ; Patnaik et coll., 1984). La plus récente, celle de Patnaik et coll., est celle qui, à l'heure actuelle, est de loin la plus utilisée par les histopathologistes au détriment des deux autres. Prenant en compte le degré de l'envahissement tumoral, la densité cellulaire de la tumeur, la morphologie des mastocytes néoplasiques, l'index mitotique et la nature et l'importance de la stroma réaction, ce grading conduit à une répartition des mastocytomes en trois grades différents, correspondant à des types histologiques distincts : les tumeurs de grade 1, bien différenciées, celles de grade 2 moyennement différenciées et celles de grade 3, peu différenciées. La valeur de l'histopronostic des mastocytomes a été confirmée par de multiples études ultérieures, avec des taux de survie, observés après exérèse chirurgicale, significativement différents entre grades (Magnol et Toulemonde, 1987 ; Simoes et coll., 1994). Toutefois dans certains cas, l'analyse histopathologique se révèle incapable de prédire le comportement individuel de certains mastocytomes cutanés du chien (Bostock, 1973 ; Patnaik et coll., 1984 ; O'Keefe, 1990).

Aussi, afin de déterminer des critères objectifs d'intérêt pronostique utilisables pour ce type tumoral, nous avons évalué l'expression des marqueurs de prolifération PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et Ki-67 dans une étude rétrospective consacrée au mastocytome cutané du chien. Le terme de marqueurs de prolifération s'applique à un ensemble de molécules exprimées spécifiquement dans les cellules en multiplication. La détection immunohistochimique de ces marqueurs peut être effectuée sur coupes tissulaires de prélèvements fixés au formol et inclus en paraffine, en vue de la réalisation d'un examen histopathologique standard. De nombreuses études en oncologie humaine ont montré une corrélation entre l'activité de prolifération cellulaire, quantifiée par la détection de ces marqueurs, et le comportement biologique pour un grand nombre de types tumoraux humaine (Van Diest et coll., 1998). L'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) est une protéine nucléaire agissant comme cofacteur de l'ADN-polymérase, enzyme intervenant dans la duplication de l'ADN précédant la mitose. L'antigène Ki-67 est exprimé durant les différentes phases du cycle cellulaire, et absent des cellules quiescentes, mais sa fonction n'a pas encore été précisément déterminée.

L'évaluation de la valeur pronostique de la détection de ces marqueurs de prolifération dans le mastocytome cutané canin se justifie par plusieurs aspects :

- fréquence de ce type tumoral dans l'espèce considérée et malignité biologique potentielle,
- limite de l'examen histopathologique conventionnel, en particulier pour les tumeurs de différenciation intermédiaire (grade 2 de Patnaik) pour lesquelles l'évolution clinique se répartit quasi équitablement entre la bénignité et la malignité (respectivement 43 % versus 57 %)
- importance pronostique avérée de la prolifération tumorale pour ce type néoplasique, la détermination de l'index mitotique représentant le seul critère objectif discriminant entre tumeurs de grades histologiques différents (Bostock, 1973 ; Patnaik et coll., 1984 ; Bostock et coll., 1989 ; Simoes et coll., 1994).

Nous présenterons dans une première partie les caractéristiques de notre matériel d'étude et les techniques expérimentales que nous avons utilisées.

Une seconde partie sera consacrée aux résultats, tout d'abord concernant les caractéristiques épidémiologiques et clinicopathologiques de notre population d'étude, puis seront détaillés les résultats des examens histopathologiques et de l'étude immunohistochimique de la détection des marqueurs de prolifération Ki-67 et PCNA. L'analyse de ces résultats histologiques et immunohistochimiques sera orientée vers l'évaluation de leur valeur pronostique, en termes de taux et durées de survie comparés.

Enfin, une discussion comparera les résultats de notre étude avec les données rapportées dans la littérature et mettra en perspective l'intérêt de la détection de l'expression des marqueurs de prolifération, tout particulièrement du marqueur Ki-67, dans la détermination du comportement biologique des mastocytomes cutanés du chien.

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIEL TUMORAL

L'étude rétrospective a été réalisée à partir de 120 cas de mastocytomes cutanés canins, ayant fait l'objet d'une exérèse chirurgicale entre le 1er janvier 1991 et le 31 décembre 1994. Ces tumeurs, après fixation dans du formol à 10 % et conditionnement approprié, ont toutes été soumises au Laboratoire d'Anatomie Pathologique Vétérinaire du Sud-Ouest (LAPVSO, Toulouse, France) au cours de cette période, en vue d'une analyse histopathologique. C'est dans les archives de ce Laboratoire que nous avons obtenu la totalité des prélèvements utilisés dans cette étude, sous la forme de blocs inclus en paraffine.

II. FICHE DE RENSEIGNEMENTS

Les données nécessaires à la réalisation de cette étude rétrospective ont été obtenues par le biais d'un questionnaire envoyé à chaque vétérinaire ayant réalisé l'intervention chirurgicale d'exérèse. La fiche de renseignements concerne l'identification précise de l'animal porteur du mastocytome (race, âge, sexe), les caractéristiques de la tumeur (aspect macroscopique, localisation), les données cliniques pré-chirurgicales (bilan d'extension local et à distance du processus néoplasique, examens et traitements complémentaires éventuels) et le devenir de l'animal après l'exérèse (récidive tumorale et/ou extension métastatique, état de santé à la dernière visite, date et cause précise de la mort si celle-ci est survenue durant la période d'étude). Un modèle type de ce questionnaire est présenté en annexe (Annexe 1 : Fiche de renseignements clinico-pathologiques des mastocytomes cutanés canins).

Pour les 120 cas de notre d'étude, l'intégralité de ces données anamnestiques et cliniques est disponible. Aussi, et dans un souci de la plus grande homogénéité possible de la population d'étude retenue, les tumeurs sélectionnées pour l'étude expérimentale se caractérisaient par une présentation clinique semblable au moment du diagnostic et par la mise en place d'un traitement anti-tumoral comparable. L'ensemble des tumeurs se présentait au moment de l'intervention chirurgicale sous la

forme d'une néoformation de localisation cutanée, solitaire.

Aucune évidence de métastases loco-régionales (en particulier au niveau des nœuds lymphatiques de drainage) ou à distance n'était présente au moment du diagnostic, déterminée par examen clinique, cytologique et/ou radiologique.

Aucune thérapie adjuvante, radiothérapie ou chimiothérapie, n'a été mise en place sur les animaux de cette étude : seule l'exérèse chirurgicale large du néoplasme a été effectuée. En cas toutefois d'évidence histologique d'excision tumorale incomplète, révélée lors du premier examen microscopique effectué sur le prélèvement, une exérèse chirurgicale complémentaire élargie a été réalisée dans le mois suivant la première intervention.

III. ANALYSE HISTOPATHOLOGIQUE

Les 120 prélèvements de mastocytomes cutanés, inclus en paraffine, ont fait l'objet de sections fraîches sériées d'environ 4 µm d'épaisseur, destinées à la réalisation de lames histologiques observables en microscopie photonique. Deux colorations ont été réalisées : la coloration à l'hémalum-éosine, coloration histologique topographique de routine, et la réaction au bleu de toluidine, permettant de révéler la présence de granules cytoplasmiques métachromatiques, caractéristiques des mastocytes normaux et néoplasiques. Les protocoles expérimentaux de réalisation technique de ces deux colorations histologiques sont indiqués en annexes (Annexe 2 : coloration par l'hémalum-éosine sur coupes tissulaires de prélèvements fixés au formol à 10% et inclus en paraffine ; Annexe 3 : Réaction au bleu de toluidine sur coupes tissulaires de prélèvements fixés au formol à 10% et inclus en paraffine).

L'examen histologique permet tout d'abord la confirmation de la nature tumorale de la néoformation et la caractérisation de sa nature mastocytaire. Il a été ensuite orienté vers la répartition des 120 néoplasmes en trois grades histologiques différents, selon les critères définis par Patnaik et coll. Les différents critères de ce grading sont rappelés dans le Tableau I. Des images microscopiques représentatives des aspects histologiques des trois grades tumoraux sont représentés Figure 1. Les caractéristiques prises en compte à l'examen en microscopie photonique sur sections colorées à l'hémalum-éosine sont : le degré d'extension et d'infiltration cellulaire du néoplasme, le mode de distribution et d'organisation des mastocytes tumoraux, différents éléments d'appréciations

cytologiques (taille et forme des cellules, abondance et aspect du cytoplasme, caractéristiques nucléaires), l'index mitotique, la présence et l'abondance des polynucléaires éosinophiles, les caractéristiques du stroma, les modifications vasculaires et hémodynamiques (vascularite, œdème et hémorragie) et le degré de dommage tissulaire (nécrose). Les résultats de l'examen microscopique des 120 prélèvements ont été consignés sur une fiche critériée d'examen microscopique. Un modèle de cette fiche d'examen histologique standardisée est présent en annexe (Annexe 4 : Fiche d'examen histologique des mastocytomes cutanés canins).

IV. IMMUNOHISTOCHEMIE

IV.A. Modes opératoires

L'analyse immunohistochimique a été réalisée sur des sections issues de coupes sériées et adjacentes de celles qui sont utilisées pour l'examen histopathologique. Elle a concerné la détection immunohistochimique des marqueurs de prolifération Ki-67 et PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) sur coupes tissulaires en paraffine. Le protocole d'immunodétection de ces deux antigènes a été établi après des essais méthodologiques préliminaires permettant l'obtention de techniques standardisées parfaitement reproductibles.

Les protocoles détaillés de deux techniques immunohistochimiques sont indiqués en annexes (Annexe 5 : Détection immunohistochimique du marqueur de prolifération Ki-67 sur coupes tissulaires de prélèvements fixés au formol à 10% et inclus en paraffine à l'aide de l'anticorps MIB1 ; Annexe 6 : Détection immunohistochimique du marqueur de prolifération PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) sur coupes tissulaires de prélèvements fixés au formol à 10% et inclus en paraffine à l'aide de l'anticorps PC10).

IV.B. Quantifications des marquages

L'évaluation quantitative du marquage obtenu pour ces deux anticorps a été effectuée par analyse des coupes tissulaires à l'aide d'un système d'analyse d'image informatique semi-automatique (V.I.D.S., Analytical Measuring Systems, London Road, Pampisford, Cambridge CB2 4EF, Royaume, uni). Le système est composé d'un ordinateur Tandon équipé du logiciel V.I.D.S., d'un

moniteur couleur à haute résolution Sony, d'une tablette graphique Summagraphics munie d'un crayon optique, d'une caméra vidéo Pulnix T.M.C. 56, montée sur un microscope Leitz dialux 20.

Le comptage est effectué par un opérateur par observation des coupes tissulaires à fort grossissement (x400), avec détermination du nombre de mastocytes tumoraux positifs par rapport au nombre total de mastocytes tumoraux présents sur le même champ d'observation microscopique. En fonction de la cellularité variable des prélèvements tumoraux, de 10 à 15 champs d'observation, sélectionnés au hasard, sont nécessaires.

Tout cellule de morphologie compatible avec une nature mastocytaire tumorale et présentant un marquage nucléaire, même faible, a été considérée comme positive. Pour les deux marqueurs, les résultats ont été évalués par comptage du nombre de noyaux positifs à l'immunomarquage sur 500 et 1000 noyaux de mastocytes tumoraux. Ils ont été également évalués par le nombre de noyaux positifs par unité de surface de tissu néoplasique, soit le mm².

IV.C. Déterminations des index de prolifération Ki-67 et PCNA

Les résultats des comptages sont aisément convertis en index de marquage (index Ki-67 et index PCNA) correspondant aux pourcentages de cellules positives par rapport à la population tumorale globale, selon la formule :

$$\text{Index de marquage} = \frac{(\text{nombre de cellules immunopositives}/1000 \text{ cellules tumorales}) \times 100}{1000}$$

V. ANALYSE STATISTIQUE

V.A. Généralités

Les différents tests et analyses statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Statview (Survival Tools for Statview, Abacus Concepts, Inc., Berkeley, Californie, USA, 1994).

Pour les analyses de survie, l'origine est fixée dans tous les cas au jour de l'exérèse. La date de sortie de l'étude et donc la durée du suivi est variable selon les chiens et leur devenir : elle correspond à la date de la mort pour les animaux morts ou euthanasiés des suites de leur mastocytome ou pour les animaux morts d'une autre cause parfaitement identifiée ; elle correspond au jour de la dernière visite pour les animaux perdus de vue, qui sont inclus dans l'étude de survie jusqu'à cette date. En moyenne la durée du suivi est de 18 mois et varie de 1 à 42 mois.

Tous les résultats des comptages et des index calculés sont exprimés sous la forme: moyenne \pm écart type. Pour toutes les analyses, une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

V.B. Tests statistiques

V.B.1. Applications aux résultats de l'analyse histologique

Pour les résultats concernant l'analyse histopathologique des tumeurs, les différences de survie entre grades ont été comparées à 12, 18 et 24 mois après chirurgie par le test de t. L'analyse de survie a été effectuée par la méthode de Kaplan Meier. Cette méthode consiste en l'établissement et à la comparaison de plusieurs courbes de survie, définies en répartissant la population d'étude en différents groupes, correspondant ici aux trois grades histologiques.

Pour chaque groupe, les courbes correspondent à l'évolution du taux de survie au cours de temps, le taux de survie se définissant comme le nombre de sujets encore vivants à un temps donné, comparé au nombre total de sujets considérés au temps zéro (origine) de l'étude. Les courbes se composent de paliers successifs, correspondant à l'abaissement progressif du taux de survie (de 100 % à l'origine) lors de la survenue d'un ou plusieurs décès. La comparaison des courbes de survie est réalisée par le test du logrank. Il correspond à la comparaison, dans chaque groupe, du nombre de décès observés sur l'ensemble de la période étudiée par rapport au nombre estimé de décès que l'on devrait observer si la mortalité était la même dans tous les groupes.

V.B.2. Applications aux résultats de l'analyse immunohistochimique

Pour les résultats concernant la détection des marqueurs de prolifération Ki-67 et PCNA, les différentes méthodes d'évaluation quantitative (comptage du nombre de noyaux positifs sur 500

noyaux de mastocytes tumoraux ; comptage du nombre de noyaux positifs sur 1000 noyaux de

mastocytes tumoraux et nombre de noyaux positifs par unité de surface de tissu néoplasique) ont été comparées par analyse de régression linéaire et analyse de la variance (ANOVA). La comparaison des résultats des comptages entre les deux marqueurs a été effectuée de la même façon.

Les différences de comptage, pour les deux marqueurs, entre populations (c'est-à-dire la population de chiens ayant survécu à leur mastocytome et la population de chiens morts ou euthanasiés des suites de leur mastocytome) ont été comparées par le test de Fisher.

Notre population d'étude a été répartie en groupes définis par rapport aux index de prolifération Ki-67 et PCNA, calculés à partir des comptages du nombre de noyaux positifs sur 1000 noyaux de mastocytes tumoraux. Une valeur seuil a été fixée pour chaque marqueur correspondant à la valeur moyenne observée dans l'ensemble de la population. Ce seuil correspond à 10 % pour l'index Ki-67 et à 50 % pour l'index PCNA. Pour chaque marqueur, l'analyse de survie a été effectuée par la méthode de Kaplan Meier, en répartissant la population d'étude en deux groupes :

- les tumeurs dont l'index de prolifération est inférieur à la valeur seuil de l'index (<10 % pour l'index Ki-67 ; <50 % pour l'index PCNA)
- les tumeurs dont l'index de prolifération est supérieur à la valeur seuil de l'index (10 % pour l'index Ki-67 ; 50 % pour l'index PCNA).

Pour l'étude particulière des tumeurs de différenciation intermédiaire (grade 2 de Patnaik), la comparaison des taux de survie entre les groupes de chiens, définis par la valeur de leurs index de prolifération par rapport à la valeur seuil (<10 % et 10 % pour l'index Ki-67 ; <50 % et 50 % pour l'index PCNA), a été réalisée par le test du Chi 2. Une analyse de survie restreinte à la population des chiens porteurs des tumeurs de ce grade (soit 62 chiens/120) a été effectuée par la méthode de Kaplan Meier en utilisant les mêmes valeurs seuils que celles précédemment définies pour les index de prolifération Ki-67 et PCNA.

RESULTATS

I. CARACTERISTIQUES EPIDEMIOLOGIQUES DE LA POPULATION

I.A. Répartition selon l'âge

L'âge moyen des chiens porteurs d'un mastocytome cutané dans notre étude est de 8,5 ans avec un écart type de 3,1 ans. L'animal atteint le plus jeune avait 1 an au moment du diagnostic clinique ; le plus âgé 16 ans.

La répartition complète par âge au moment du diagnostic tumoral est représentée sur la Figure 2.

I.B. Répartition selon le sexe

Dans notre population, 64 chiens sur 120, soit 53,3 %, sont de sexe mâle ; 56 sur 120, soit 46,7 % sont des femelles. Les pourcentages de répartition en fonction du sexe, observés dans notre étude, montrent une répartition équivalente entre les mâles et les femelles dans notre population.

Par ailleurs, l'étude de l'âge au moment du diagnostic tumoral en fonction du sexe ne montre pas de différence entre les mâles et les femelles dans notre population, ni pour l'âge moyen d'apparition, ni pour les valeurs d'âge minimal et maximal rapportées (Tableau II).

I.C. Répartition selon la race

Trente deux races sont répertoriées dans notre population de chiens porteurs de mastocytome. Cent sept chiens sur 120 étaient de race pure ; les 13 chiens restants soit 11 % de la population étaient de race croisée.

Les races canines les plus représentées sont :

- BOXER (n=36 chiens ; 30 % des cas)
- BERGER ALLEMAND (n=9 ; 8 %)
- EPAGNEUL BRETON (n=9 ; 8 %)
- LABRADOR (n=7 ; 6 %).
- SETTER ANGLAIS (n=7 ; 6 %)

L'ensemble des races représentées dans notre étude, avec pour chacune précisé le nombre d'animaux affectés, est indiqué dans la Figure 3.

À noter que la race Boxer représente à elle seule près du tiers des chiens porteurs d'un mastocytome dans notre population.

I.D. Répartition selon la localisation tumorale

La répartition des localisations tumorales répertoriées dans notre étude est indiquée sur la Figure 4 et le Tableau III. Les localisations ont été regroupées en prenant en compte les différentes zones topographiques habituellement utilisées dans la littérature, soit par ordre de fréquence décroissant :

- ZONE ABDOMINALE ET MEMBRE POSTERIEUR : 54 cas sur 120 soit 46%
- ZONE THORACIQUE ET MEMBRE ANTERIEUR : 29 cas sur 120 soit 24%
- ZONE ANOGENITALE : 21 cas sur 120 soit 17%
- ZONE TETE ET COU : 16 cas sur 120 soit 13%

Bien que les mastocytomes cutanés soient susceptibles d'être observés en toute localisation tégumentaire, la localisation au membre postérieur (cuisse, jambe et patte) est la plus fréquemment observée dans notre étude, représentant à elle seule près d'un tiers des cas (36/120, 30 %).

II. RESULTATS CLINICO-PATHOLOGIQUES

II.A. Taux et durée de survie

Soixante-quinze chiens sur les 120 porteurs de mastocytome (63 %) sont encore vivants à la fin de l'étude, soit plus de deux ans après l'intervention chirurgicale d'exérèse tumorale. Trente-cinq chiens (29 %) sont morts spontanément ou ont été euthanasiés durant la période d'étude à cause de leur tumeur mastocytaire ; 10 chiens (8 %) sont morts durant la période d'étude d'autres causes parfaitement identifiées, et ne présentaient au moment de leur mort aucune évidence de mastocytome.

Pour 32 des 35 chiens morts ou euthanasiés à cause de leur mastocytome, soit 91 %, le temps de survie après exérèse a été inférieur à 12 mois ; pour 34 d'entre eux, soit 97 %, la mort ou l'euthanasie des suites de leur maladie tumorale s'est produite dans les 24 mois suivant le diagnostic. La très grande majorité des décès associés à la maladie tumorale surviennent dans notre étude dans l'année suivant l'exérèse et la quasi-totalité dans un délai de deux ans.

II.B. Comportement biologique et évolution

II.B.1. Récidive locale

Chez 27 chiens (23 %), une récidive locale du mastocytome a été observée en moyenne 5 mois et demi après chirurgie (délai de récidive variant de 1 mois jusqu'à 18 mois). Pour 18 de ces 27 chiens (67 %), cette récidive locale était associée à une résection tumorale incomplète à l'examen histopathologique des marges de la pièce chirurgicale, soit du fait du volume et de l'extension de la tumeur primitive, soit du fait de sa localisation. Pour les 9 autres chiens (33 %), une récidive tumorale au site d'exérèse est intervenue malgré une chirurgie jugée complète à l'examen microscopique.

Dans 41 % de cas de récidive (11 cas sur 27), elle évolue sous la forme d'une tumeur isolée dont une seconde exérèse aboutit à la guérison clinique : les chiens concernés sont demeurés exempts de nouvelle récidive ou d'une généralisation de la maladie tumorale pour une durée de suivi allant de 12 à 42 mois (moyenne de 25 mois). Toutefois, dans 59 % des cas de récidive (16/27), elle

s'accompagne d'une progression rapide vers la généralisation tumorale maligne (i.e. éclosion multicentrique et/ou dissémination métastatique), et la durée moyenne de survie après récurrence est dans ces cas seulement de 3 mois et demi (variant de 0 à 10 mois).

II.B.2. Éclosion multicentrique

Une éclosion tumorale tégumentaire multicentrique a été observée chez 12 % des chiens de notre étude (15/120), en moyenne 10 mois après la première exérèse (de 1 à 15 mois). Dans environ la moitié des cas (8/15), cette éclosion cutanée multicentrique a été associée à une progression vers un comportement malin avec dissémination métastatique locorégionale ganglionnaire et parfois métastases viscérales. Dans l'autre moitié des cas (7/15), la forme cutanée multicentrique ne s'est pas accompagnée d'une progression évidente vers un comportement d'agressivité majorée, les mastocytomes demeurant localisée en localisation tégumentaire avec un suivi clinique de 15 à 36 mois, sans évidence d'évolution en maladie cancéreuse détectée ultérieurement chez ces chiens.

II.B.3. Dissémination métastatique

Une dissémination métastatique du mastocytome a été mise en évidence avec certitude chez 15 % des chiens de notre étude (18/120), par examen clinique, examen cytologique d'un frottis sanguin ou de cytoponction ganglionnaire et/ou médullaire, examen radiologique ou échographique ou autopsie. Dans tous ces cas, une dissémination métastatique au nœud lymphatique locorégional de drainage du territoire tégumentaire affecté, était présente. Cette activité de dissémination est observée en moyenne 4 mois et demi après la chirurgie d'exérèse (variant de 6 à 13 mois). Pour 5 de ces 15 chiens, une extension métastatique viscérale, hépatique et/ou splénique, a pu être mise en évidence.

Il est cependant probable que ce pourcentage de 15 % représente une valeur minimale de l'incidence métastatique véritable de ce type tumoral, la plupart des chiens de notre étude n'ayant pas été soumis à examen nécropsique après leur mort ou leur euthanasie.

III. RESULTATS DE L'ANALYSE HISTOLOGIQUE (GRADING)

III.A. Répartition en fonction du grade histologique

La répartition des 120 tumeurs incluses dans notre étude en fonction de leur grade histologique s'effectue comme suit :

- 41 tumeurs soit 34 % des cas ont été classées dans le grade 1
- 62 tumeurs soit 52 % des cas ont été classées dans le grade 2
- 17 tumeurs soit 14 % des cas ont été classées dans le grade 3

Ces pourcentages de répartition ne diffèrent pas de façon statistiquement significative avec ceux qui sont obtenus par Patnaik lors de son étude, soit 36 % de tumeurs de grade 1 ; 43 % de grade 2 ; 20 % de grade 3 (Tableau I ; Chi2 ; $p>0,05$). Cette répartition justifie le fait de considérer notre population d'étude comme représentative pour l'évaluation de critères pronostiques, car tout à fait comparable aux populations utilisées dans les études préalables consacrées à ce type tumoral.

III.B. Étude de survie en fonction du grade histologique

Les taux de survie à 12, 18 et 24 mois après l'intervention d'exérèse chirurgicale tumorale en fonction du grade histologique sont rapportés dans le Tableau IV. Ils présentent des différences statistiquement significatives entre grades (test de t ; $p<0,001$). Par ailleurs les taux de survie que nous observons 2 ans après chirurgie ne diffèrent pas de façon statistiquement significative de ceux qui sont observés par Patnaik à 1500 jours après chirurgie, et rappelés dans le Tableau I, soit 93 % de survie pour le grade 1; 44 % de survie pour le grade 2 ; 6 % de survie pour le grade 3 (Chi2 ; $p>0,05$).

Les durées moyennes de survie après exérèse en fonction du grade histologique de la tumeur sont également statistiquement différentes, ainsi que les résultats de comparaison des courbes de survie en fonction des grades (Tableau V ; Figure 5 ; test du logrank ; $p<0,001$).

IV. RESULTATS DE L'ANALYSE IMMUNOHISTOCHIMIQUE (DETECTION DES MARQUEURS DE PROLIFERATION)

IV.A. L'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA)

IV.A.1. Caractéristiques du marquage

La réactivité obtenue lors de la détection de l'antigène PCNA correspond à un marquage quasi-exclusivement localisé au noyau cellulaire, ce dernier présentant selon les cas un marquage homogène diffus du nucléoplasme, parfois un marquage hétérogène granuleux, voire une association de ces deux types de marquage pour un même noyau.

Pour quelques cellules toutefois, une légère réactivité cytoplasmique est observée, en particulier pour les cellules en cours de mitose.

À noter que quel que soit le type de réactivité observée, une grande variabilité d'intensité de marquage est notée entre les cellules présentes sur une même coupe tissulaire, variant d'une coloration très pâle des noyaux, à une très forte immunoréactivité. Par ailleurs pour certains prélèvements, une relative hétérogénéité dans la répartition de la réactivité en fonction des territoires tumoraux sur coupes histologiques est présente.

Quelques aspects morphologiques du marquage obtenu lors de la détection de l'antigène PCNA sont illustrés dans la Figure 6.

IV.A.2. Corrélations des marquages

Le nombre de noyaux PCNA-positifs évalué pour 500 noyaux de cellules tumorales présente une forte corrélation avec le nombre de noyaux PCNA-positifs évalué pour 1000 noyaux de cellules tumorales ($r=0,993$) (Figure 7). Cette forte corrélation signe une faible variabilité des mesures effectuées par l'observateur et une bonne répétabilité des résultats d'évaluation.

En revanche, le nombre de noyaux PCNA-positifs par unité de surface tumorale (mm^2) montre une corrélation plus faible avec le nombre de noyaux PCNA-positifs évalué pour 1000 noyaux de cellules tumorales ($r=0,726$) (Figure 8). Ce résultat peut être mis en relation avec les variations du nombre de cellules PCNA-positives en fonction des territoires néoplasiques, observées sur un certain nombre de coupes tissulaires.

IV.A.3. Statistique descriptive

L'étude statistique descriptive du nombre de noyaux PCNA-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales et des index de prolifération PCNA calculés, pour les 120 mastocytomes constituant notre population d'étude correspond à :

Valeur moyenne (\pm écart type) du nombre de noyaux PCNA-positifs-1000 noyaux de cellules tumorales	492 \pm 232
Valeur moyenne de l'index de prolifération PCNA (en %)	49 % \pm 23
Valeur minimale observée de l'index PCNA (en %)	2 %
Valeur maximale observée de l'index PCNA (en %)	88 %

Cette statistique descriptive permet la définition d'une valeur seuil moyenne arrondie de 50 % pour ce marqueur.

IV.A.4. Signification pronostique

Le nombre moyen de noyaux PCNA-positifs évalué pour 1000 noyaux de cellules tumorales est significativement plus élevé pour les tumeurs provenant des chiens morts de leur mastocytome (n=35 ; 618 \pm 169 noyaux PCNA-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales) que pour les tumeurs provenant des chiens vivants à la fin de l'étude (n=75 ; 426 \pm 235 noyaux PCNA-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales). Convertis en indice PCNA de prolifération, ces résultats correspondent à : 62% \pm 17 pour les mastocytomes à comportement post chirurgical "malin" et 43% \pm 24 pour les mastocytomes à comportement post chirurgical "bénin" (Tableau VI).

Bien que les indices moyens diffèrent de façon statistiquement significative, ces indices présentent un chevauchement net des valeurs entre tumeurs de comportements différents.

Par ailleurs lorsqu'on étudie le nombre moyen de noyaux PCNA-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales en fonction du grade histologique des tumeurs, ce nombre moyen ne diffère pas de façon

statistiquement significative entre les groupes de tumeurs : grade 1 : 427 ± 238 noyaux PCNA-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales ; grade 2 : 507 ± 237 noyaux PCNA-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales ; grade 3 : 590 ± 148 noyaux PCNA-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales (Figure 9).

L'étude descriptive de la valeur moyenne de l'index de prolifération PCNA observée dans notre population a permis la sélection de la valeur seuil de 50 % autorisant la répartition de notre population en trois groupes :

1^{er} groupe : tumeurs à index de prolifération PCNA < 50 %

2^{ème} groupe : tumeurs à index de prolifération PCNA \geq 50 %

L'étude et la comparaison des courbes de survie obtenues pour ces deux groupes montrent des différences statistiquement significatives entre elles (Figure 10 ; test de logrank ; $p=0,023$). La valeur seuil d'index de 50 % de cellules tumorales positives permet de répartir les tumeurs de notre population en deux :

INDEX PCNA < 50 % (55 tumeurs/120 ; 46 %) : 85 % de survie (47/55)

INDEX PCNA \geq 50 % (65 tumeurs/120 ; 54 %) : 59 % de survie (38/65)

Même si les différences des taux de survie entre ces deux groupes de tumeurs sont statistiquement significatives (χ^2 ; $P < 0,001$), pour plus de la moitié des chiens de notre population (54%) l'index PCNA ne permet pas de prédire de façon pertinente le comportement biologique de la tumeur (59 % de survie versus 41 % de mortalité associée à la progression du mastocytome).

IV.B. L'antigène Ki-67

IV.B.1. Caractéristiques du marquage

La réactivité observée lors de la détection immunohistochimique de l'antigène Ki-67 est strictement localisée au noyau cellulaire. Elle apparaît particulièrement nette à proximité ou au sein du ou des nucléoles, lorsque celui-ci est observable, associée à un marquage plus ou moins intense du nucléoplasme. Les chromosomes sont très intensément positifs au niveau des figures de mitose.

La plupart des tumeurs présentent par ailleurs une répartition globalement homogène du marquage au sein des différents territoires de tissu tumoral, conduisant à une dispersion régulière du marquage au niveau de l'ensemble de la coupe.

Quelques aspects morphologiques du marquage obtenu lors de la détection de l'antigène Ki-67 sont illustrés dans la Figure 11.

IV.B.2. Corrélations des marquages

Le nombre de noyaux Ki-67-positifs sur 500 noyaux de cellules tumorales présente une forte corrélation avec le nombre de noyaux Ki-67-positifs évalué pour 1000 noyaux de cellules tumorales ($r=0,990$) (Figure 12).

Par ailleurs le nombre de noyaux Ki-67-positifs par unité de surface tumorale (mm^2) montre bonne une corrélation avec le nombre de noyaux Ki-67-positifs évalué pour 1000 noyaux de cellules tumorales ($r=0,833$) (Figure 13).

IV.B.3. Statistique descriptive

L'étude statistique descriptive du nombre de noyaux Ki-67-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales et des index de prolifération Ki-67 calculés, pour les 120 mastocytomes constituant notre population d'étude correspond à :

Valeur moyenne (\pm écart type) du nombre de noyaux Ki-67-positifs / 1000 noyaux de cellules tumorales	88 ± 83
Valeur moyenne de l'index de prolifération Ki-67 (en %)	$9 \% \pm 8$
Valeur minimale observée de l'index Ki-67 (en %)	0,5 %
Valeur maximale observée de l'index Ki-67 (en %)	46 %

Cette statistique descriptive permet la définition d'une valeur seuil moyenne arrondie de 10 % pour ce marqueur.

IV.B.4. Signification pronostique

Le nombre moyen de noyaux Ki-67-positifs évalué pour 1000 noyaux de cellules tumorales est significativement plus élevé pour les tumeurs provenant des chiens morts de leur mastocytome (n=35 ; 173 ± 84 noyaux Ki-67-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales) que pour les tumeurs provenant des chiens vivants à la fin de l'étude (n=75 ; 54 ± 54 noyaux Ki-67-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales).

Convertis en index Ki-67 de prolifération, ces résultats correspondent à : $17\% \pm 8$ pour les mastocytomes à comportement post chirurgical "malin" et $5\% \pm 5$ pour les mastocytomes à comportement post chirurgical "bénin" (Tableau VII).

Ces index de prolifération sont nettement différents entre les tumeurs en fonction de leur comportement biologique et ne présentent pas de recouvrement de leur valeur entre les deux groupes.

Ces valeurs d'index de prolifération Ki-67 (5% versus 17 %), variables selon le comportement tumoral, sont comparables selon le devenir des chiens (survie versus mort suite au mastocytome) à 12, 18 et 24 mois après chirurgie (Tableau VIII). Les index de prolifération Ki-67 observés pour les tumeurs « bénignes » (portés par les chiens qui survivent à 12, 18 et 24 mois après chirurgie) diffèrent de façon statistiquement significative des index de prolifération observés sur les tumeurs « malignes » (portés par les chiens morts ou euthanasiés à 12, 18 et 24 mois après chirurgie des suites de leur mastocytome) (test de t ; $p < 0,001$).

L'étude du nombre moyen de noyaux Ki-67-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales en fonction du grade histologique des tumeurs montre des différences statistiquement significatives entre les groupes de tumeurs : grade 1 : 31 ± 16 noyaux Ki-67-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales ; grade 2 : 93 ± 67 noyaux Ki-67-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales ; grade 3 : 204 ± 95 noyaux Ki-67-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales (Figure 14).

L'étude descriptive de la distribution du nombre de noyaux Ki-67-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales et des index de prolifération Ki-67 calculés a permis la sélection de la valeur moyenne limite de 10 % de cellules tumorales positives, autorisant la répartition de notre population en deux groupes :

1^{er} groupe : tumeurs à index de prolifération Ki-67 < 10 %

2^{ième} groupe : tumeurs à index de prolifération Ki-67 ≥ 10 %

L'étude et la comparaison des courbes de survie obtenues pour ces deux groupes montrent des différences statistiquement significatives entre elles (Figure 15 ; test du logrank ; $p < 0,001$). Cette valeur seuil de l'index de marquage Ki-67, fixée à 10 % de prolifération, permet de répartir les tumeurs de notre population en deux groupes exhibant un comportement biologique très différent :

INDEX Ki-67 < 10 % (79 tumeurs/120 ; 65 %) : 92 % de survie (73/79)

INDEX Ki-67 10 % (41 tumeurs/120 ; 35 %) : 27 % de survie (11/41)

Les différences des taux de survie entre ces deux groupes de tumeurs sont statistiquement significatives (χ^2 ; $p < 0,001$).

IV.C. Corrélation des marquages Ki-67 et PCNA

Lorsque les résultats obtenus par les deux marqueurs de prolifération pour une même tumeur sont comparés, on observe que le nombre de noyaux Ki-67-positifs évalué pour 1000 noyaux de cellules tumorales n'est pas corrélé de façon statistiquement significative avec le nombre de noyaux PCNA-positifs évalué pour 1000 noyaux de cellules tumorales ($r=0,430$; $p=0,089$) (Figure 16). Cette absence de corrélation semble indiquer que, pour le type tumoral considéré et dans notre population d'étude, ces deux marqueurs n'évaluent pas strictement le même phénomène biologique de prolifération cellulaire.

V. ETUDE PARTICULIERE DES TUMEURS DE DIFFERENCIATION INTERMEDIAIRE (GRADE 2 DE PATNAIK)

V.A. Population d'étude

Notre population de chiens porteurs de mastocytomes de grade 2 est constituée à l'origine de 62 individus. Deux chiens de cette population sont morts peu de temps après l'exérèse (dans un délai inférieur à 12 mois après la chirurgie), de causes identifiées comme non liées à leur tumeur mastocytaire. L'étude des caractéristiques des tumeurs de ce grade intermédiaire a de ce fait porté sur 60 tumeurs.

Parmi ces 60 chiens, 21 sont morts ou ont été euthanasiés à cause de leur mastocytome (35 %) ; 39 ont survécu jusqu'à la fin de l'étude (65 %).

V.B. Caractéristiques descriptives des immunomarquages PCNA et Ki-67

Nous avons étudié particulièrement sur cette population des tumeurs de différenciation intermédiaire (grade 2) les résultats de détection des marqueurs de prolifération Ki-67 et PCNA et les caractéristiques des index de prolifération qui en découlent. Les statistiques descriptives des résultats obtenus en fonction du devenir post-chirurgical des chiens sont détaillées dans le Tableau IX (marqueur PCNA) et le Tableau X (marqueur Ki-67), exprimées en index de prolifération, calculés à partir du nombre de noyaux positifs/1000 noyaux de cellules tumorales.

De ces résultats émanent deux valeurs d'index de prolifération, une pour chaque marqueur, correspondant à la valeur moyenne observée dans la population : il s'agit d'un index Ki-67 de 10 % et d'un index PCNA de 50 %. Ces valeurs limites autorisent la définition pour chaque marqueur de deux populations, caractérisées respectivement par des valeurs d'index inférieure ou supérieure à la valeur seuil.

V.C. Valeur pronostique du marqueur de prolifération PCNA

En ce qui concerne le marqueur PCNA, la comparaison des taux et des courbes de survie après exérèse entre les deux populations tumorales définies par la valeur seuil de 50 % de l'index, montre des différences statistiquement significatives (Figure 17). La valeur seuil d'index de 50 % de cellules tumorales positives permet de répartir les tumeurs de grade 2 en deux populations :

INDEX PCNA < 50 % (28 tumeurs/60 ; 47 %) : 86 % de survie (20/24)

INDEX PCNA 50 % (32 tumeurs/60 ; 53 %) : 47 % de survie (15/32)

Même si les différences de taux de survie entre ces deux populations sont statistiquement significatives (χ^2 ; $p < 0,001$), l'index de prolifération PCNA ne permet pas de trancher sur le devenir de plus de la moitié des chiens porteurs d'une tumeur de grade 2 (population à index PCNA 50%), pour lesquels les taux de survie et de mortalité après exérèse sont équivalents (47% versus 53%).

V.D. Valeur pronostique du marqueur de prolifération Ki-67

De la même façon, les taux de survie et courbes de survie des deux populations, définies par rapport à la valeur seuil de l'index de prolifération Ki-67 (fixée à 10 %), présentent des différences statistiquement significatives (Figure 18). Par ailleurs, pour le marqueur Ki-67, les différences observées entre les courbes sont plus importantes que celles qui sont observées pour le marqueur PCNA.

De la même façon que pour la population générale de notre étude, la valeur seuil de l'index de marquage Ki-67, fixée à 10 % de prolifération, permet de répartir les tumeurs de grade 2 en deux groupes exhibant un comportement biologique très différent :

INDEX Ki-67 < 10 % (34 tumeurs/60 ; 57 %) : 88 % de survie (30/34)

INDEX Ki-67 10 % (26 tumeurs/60 ; 43 %) : 34 % de survie (9/26)

Les différences des taux de survie entre ces deux groupes de tumeurs sont statistiquement significatives (χ^2 ; $p < 0,001$).

Dans l'étude particulière des tumeurs de grade intermédiaire, l'index Ki-67 apparaît ainsi plus discriminant que l'index PCNA, entre les tumeurs exhibant des comportements biologiques différents.

V.E. Valeur pronostique de la détection associée des marqueurs de prolifération Ki-67 et PCNA

Enfin l'association des index de marquage obtenus pour les deux marqueurs permet avantagement de prédire de façon très performante le devenir des chiens porteurs de tumeurs de grade 2. Parmi l'ensemble des tumeurs de grade 2, deux populations ont été définies :

- la première regroupe les tumeurs associant des index de prolifération supérieurs pour les deux marqueurs à la valeur seuil ; cette population est constituée de 21 tumeurs/60, soit 35 % de l'ensemble des tumeurs de grade 2 dans notre étude.
- la seconde population est constituée de tous les autres cas de figure, c'est-à-dire les tumeurs pour lesquelles l'index Ki-67 < 10 % ET l'index PCNA < 50 % (22 tumeurs sur 39), celles où l'index Ki-67 < 10 % ET l'index PCNA 50 % (11 tumeurs sur 39) et enfin celles où l'index Ki-67 10 % ET l'index PCNA < 50 % (6 tumeurs sur 39) ; cette seconde population ainsi définie rassemble donc 39 tumeurs/60 et représente donc 65 % des tumeurs de grade 2 de notre étude

Les taux de survie pour ces deux populations sont :

INDEX Ki-67 10 % ET INDEX PCNA 50 % : 24 % de survie (5/21)

TOUS LES AUTRES CAS : 87 % de survie (34/39)

Les différences des taux de survie entre ces deux groupes de tumeurs sont statistiquement significatives (χ^2 ; $p < 0,001$).

V.F. Protocole d'immunomarquage proposé pour les tumeurs de grade 2

A partir des différents résultats obtenus par la détermination des index de prolifération Ki-67 et PCNA décrits ci-dessus, nous proposons face à une tumeur de grade histologique intermédiaire de Patnaik (grade 2), ou a fortiori pour toute tumeur où la détermination objective du grade histologique s'avère problématique, le protocole d'immunomarquage suivant :

- Détermination de l'INDEX DE PROLIFERATION Ki-67.
- Comparaison de l'INDEX Ki-67 obtenu pour la tumeur considérée avec la valeur seuil de 10 %.

2.1 INDEX Ki-67 < 10 % : la tumeur peut être considérée comme bénigne, avec un taux de survie après exérèse de 88 %.

2.2 INDEX Ki-67 10 % : la tumeur doit être considérée comme potentiellement maligne, avec un taux de survie après exérèse limitée à 35 %. Dans ces cas la détermination de l'INDEX DE PROLIFERATION PCNA observé pour la tumeur considérée et sa comparaison avec la valeur seuil de 50 % peut être effectuée :

2.2.1 INDEX PCNA < 50 % : la tumeur peut être considérée comme de faible malignité : 80 % de survie observé pour 5 cas. À noter toutefois que le faible nombre de tumeurs correspondant à ce cas de figure dans notre population d'étude n'autorise pas une validation statistique stricte de ce résultat.

2.2.2 INDEX PCNA 50 % : la tumeur doit être considérée comme très probablement maligne, avec un taux de survie après exérèse de seulement 24 %.

Ce protocole pourrait ainsi permettre de prédire de façon objective et avec une forte probabilité le comportement biologique de la plupart des mastocytomes cutanés canins.

DISCUSSION

Notre étude rétrospective a porté sur une population constituée de 120 cas de mastocytomes cutanés canins. Ce nombre de cas est comparable voire supérieur à celui rapporté dans les différentes études consacrées à l'évaluation pronostique du mastocytome cutané canin (Hottendorf et Nielsen, 1967 ; Bostock, 1973 ; Patnaik et coll., 1984). Les critères de sélection de cette population, définis préalablement, ont été :

- prélèvements de tumeurs de nature mastocytaire, soumises à exérèse chirurgicale entre le 1er janvier 1991 et le 31 décembre 1994, et disponibles dans les archives du Laboratoire d'Anatomie Pathologique Vétérinaire du Sud-Ouest (LAPVSO, Dr Agnès Poujade), duquel proviennent la totalité des tumeurs utilisées dans cette étude.
- prélèvements pour lesquels l'ensemble des données épidémiologiques, clinicopathologiques et le suivi précis du cas étaient disponibles rétrospectivement, par l'intermédiaire d'une fiche de renseignements complétée de façon précise et totale par le praticien référent.
- prélèvements de tumeurs cutanés solitaires, évoluant sous forme isolée et à bilan d'extension a priori négatif au moment du diagnostic.
- tumeurs soumises exclusivement à traitement chirurgical, sous la forme d'une exérèse unique, éventuellement complétée, si nécessaire, par une réintervention chirurgicale élargie (dans le mois suivant la première chirurgie) en cas d'évidence microscopique d'excision incomplète de la totalité du tissu néoplasique.

La sélection de ces cas a été effectuée de façon préalable, avant leur inclusion dans le protocole expérimental d'étude. Ces critères ont été choisis dans un souci de standardisation objective des cas inclus dans l'étude. Ils nous permettent de disposer d'un ensemble de cas pour lequel les renseignements disponibles autorisent la réalisation d'une étude de survie, et pour lequel la présentation clinique au moment du diagnostic est tout à fait comparable. Par ailleurs, l'homogénéité du traitement anti-tumoral effectué, exclusivement chirurgical, nous permet d'évaluer le comportement propre de chacune des tumeurs, indépendamment d'une modulation engendrée par

des modalités thérapeutiques différentes. Aucun des critères choisis ne nous semble, a priori, représenter un biais susceptible de rendre notre population non représentative par rapport à la population globale des chiens porteurs de mastocytomes.

Cependant, nous ne disposons pas des données épidémiologiques précises et complètes relatives à une population canine de référence, à laquelle la population de chiens inclus dans notre étude pourrait être comparée. Cette population de référence pourrait correspondre à la population canine globale française, ou à une population constituée de l'ensemble des chiens présents dans les archives du laboratoire d'histopathologie vétérinaire, d'où les prélèvements traités lors de cette étude proviennent, et pour lesquels une analyse a été effectuée durant la période de l'étude. Aussi les résultats épidémiologiques ici rapportés représentent-ils des données brutes non corrigées, à partir desquelles aucune interprétation en termes de prédisposition ne peut être formellement et rigoureusement réalisée. Nous nous limiterons à constater que les caractéristiques épidémiologiques de notre population, c'est-à-dire en particulier l'âge moyen des animaux atteints, l'absence de prédisposition sexuelle et les races les plus communément affectées, correspondent aux données disponibles dans la littérature traitant de ce type néoplasique (Macy, 1985 ; O'Keefe, 1990). Aussi, pensons-nous que notre population canine peut être considérée comme valable et satisfaisante pour l'étude comparative de méthodes d'évaluation pronostique du comportement biologique des mastocytomes cutanés chez le chien.

Les résultats de notre étude anatomoclinique confirment la grande variabilité d'expression clinique et d'évolution biologique de ce type tumoral. Comparables également aux données disponibles dans la littérature (Moulton, 1990 ; Goldschmidt et Shofer, 1992), ces résultats montrent en particulier le potentiel d'agressivité locale de ce type néoplasique, à l'origine de récurrence précoce (en moyenne dans les 5 à 6 mois qui suivent l'exérèse), associée dans deux tiers des cas à une progression vers la malignité. A noter par ailleurs que ces récurrences locales sont parfois observées (30 % des cas environ) dans des sites où l'examen histologique de la pièce opératoire était en faveur d'une résection tumorale large et complète. L'incidence métastatique a été déterminée avec certitude chez 15 % des chiens de notre étude (36/120). Il est cependant probable que ce pourcentage représente une sous-estimation de l'incidence métastatique véritable de ce type tumoral, la plupart des chiens de notre étude n'ayant pas été soumis à examen nécropsique et à prélèvements histopathologiques systématiques, après leur mort ou leur euthanasie, même lorsque ces dernières étaient associées à leur maladie tumorale. Ces deux manifestations, locales et à distance, de l'agressivité potentielle de

ce type néoplasique sont, quoi qu'il en soit, à l'origine de la mort ou de l'euthanasie de près d'un tiers (29 %) des chiens porteurs de mastocytomes de notre population. Devant la gravité potentielle de ce type tumoral, ces résultats incitent à la plus grande vigilance face à un diagnostic de tumeur à mastocytes, et à considérer comme au moins potentiellement malin tout mastocytome cutané chez le chien.

Plusieurs facteurs pronostiques ont été utilisés pour tenter de prédire le comportement biologique et l'évolution à terme des mastocytomes cutanés du chien, parmi lesquels le stade clinique de l'affection, la rapidité d'évolution et de croissance locale de la tumeur, l'existence de signes systémiques généraux éventuellement paranéoplasiques, la localisation anatomique de la tumeur, la race du chien affectée et le grade histologique de la tumeur (Nielsen et Cole, 1958 ; Macy, 1985 ; O'Keefe, 1990 ; Rogers, 1996). Parmi ces nombreux facteurs, l'examen histopathologique, à visée de détermination d'un grade à valeur pronostique, représente à l'heure actuelle la technique d'évaluation la plus accessible et fiable du comportement biologique de ce type tumoral. Trois études ont proposé des gradings histologiques des mastocytomes cutanés du chien : Hottendorf en 1967, Bostock en 1973 et Patnaik et coll. en 1984. La classification la plus usitée à l'heure actuelle est celle de Patnaik, qui semble la mieux corrélée avec le pronostic et l'évolution post opératoire des tumeurs, et dont la valeur histopronostique a été confirmée par plusieurs études ultérieurement menées par d'autres auteurs (Magnol et Toulemonde, 1987 ; Simoes et coll., 1994).

Notre étude confirme la valeur pronostique de l'examen histopathologique. Les taux de survie observés à 12, 18 et 24 mois présentent des différences statistiquement significatives entre grades et ceux que nous observons à 2 ans après exérèse sont équivalents aux taux de survie rapportés par Patnaik à 1500 jours après chirurgie. Par ailleurs, la répartition des tumeurs dans notre étude entre les 3 grades histologiques apparaît tout à fait comparable à celles, rapportées dans la littérature, qui utilisent les critères de ce grading, y compris l'étude princeps de Patnaik (Patnaik et coll., 1984 ; Magnol et Toulemonde, 1987 ; Simoes et coll., 1994).

Cependant, notre étude rétrospective en confirme également les limites. En effet, le grading histologique se révèle très performant dans la prédiction du comportement des tumeurs très bien différenciées (grade 1 histologique), qui présentent systématiquement un comportement clinique bénin. Il est, de la même façon, très utile pour prédire le comportement des tumeurs très mal différenciées voire anaplasiques, à l'opposé (grade 3), qui exhibent quasi systématiquement un comportement malin. Cependant, la majorité des tumeurs que nous avons analysées (52 % ; 62/120)

appartiennent au grade histologique de différenciation intermédiaire (grade 2 de Patnaik). Pour ce grade, présentant ce que l'on qualifie par abus de langage un comportement de malignité "intermédiaire", la valeur pronostique de l'histologie est beaucoup plus limitée : en effet, environ 50 % des tumeurs de ce grade auront un comportement biologique bénin (semblable aux tumeurs de grade 1) et l'autre moitié des tumeurs de grade 2 se comportera comme des tumeurs malignes, comparables aux tumeurs de grade 3. Il est ainsi probable qu'au sein de ce grade hétérogène sont regroupées deux sous-populations tumorales, l'une bénigne et l'autre maligne ou potentiellement maligne, indistinguables objectivement par de seuls critères morphologiques. Il apparaît donc clairement que ce terme de "malignité intermédiaire" ne fait que révéler la nature imprévisible du comportement des tumeurs de ce grade lors d'évaluation histopathologique morphologique exclusive.

De plus, plusieurs études ont mis l'accent sur la subjectivité latente de ce grading histopathologique, inhérente à tout système d'évaluation qualitatif (Bostock et coll., 1989 ; Simoes et coll., 1984). Cette subjectivité est, dans le cas du grading histologique des mastocytomes, d'autant plus présente que les critères d'évaluation stricts et rigoureux définis par Patnaik et ses collaborateurs se révèlent d'utilisation pratique difficile. En effet, la plupart des tumeurs présentent, à l'examen histologique, des critères microscopiques ne correspondant pas de manière absolue à l'ensemble des critères utilisés pour définir un grade précis. Aussi, en pratique courante, est-il probable que différents histopathologistes assignent à la même tumeur des grades différents, selon les critères morphologiques qu'ils privilégient (par exemple, le degré d'infiltration tissulaire ou la cytologie des mastocytes tumoraux ou l'activité proliférative, évaluée par l'intermédiaire de l'index mitotique...). Par ailleurs, face à des critères d'évaluation microscopique divergents, la tentation existe pour les histopathologistes d'utiliser des grades intermédiaires, de type grade 1-2, ou grade 2-3. Bien que compréhensible, cette tentation est incontestablement à proscrire, puisqu'elle induit une perte complète de toute information pronostique. Renforçant la subjectivité du système de grading histologique (puisque aucune étude n'a précisément défini leurs critères d'évaluation), l'utilisation de ces grades intermédiaires complique également et surtout l'interprétation pratique par le praticien : en effet, aucune évaluation de leur signification pronostique n'a été à ce jour réalisée.

Dans ces cas incertains, qui se révèlent en pratique très fréquents, l'utilisation de critères discriminatifs les plus objectifs possibles est souhaitable. Parmi les critères utilisés pour la répartition des mastocytomes cutanés dans les différents grades histologiques, le seul élément

objectif est la détermination du nombre de figures de mitose. En effet dans son article fondateur, Patnaik observe, pour les tumeurs de grade 1, une absence de figure de mitose au sein de la population néoplasique ; pour les tumeurs de grade 2, de 0 à 2 figures de mitose par champ à fort grossissement (High Power Field ou HPF), soit un grossissement x 400 ; pour les tumeurs de grade 3, de 3 à 6 figures par HPF. Si cette estimation par champ microscopique est discutable, car la surface tissulaire correspondant à un champ x 400 est variable d'un microscope à l'autre, le nombre de figures de mitose observé par unité de surface tissulaire dans une tumeur donnée apparaît clairement corrélé avec le comportement biologique du néoplasme (Bostock, 1973 ; Patnaik et coll., 1984 ; Simoes et coll, 1994). Ainsi la détermination de l'activité proliférative dans les mastocytomes cutanés du chien semble représenter un si ce n'est le critère de choix dans l'optique d'une évaluation pronostique objective de ce type tumoral.

Le comptage des figures de mitose représente la méthode traditionnelle la plus ancienne et la plus aisément mise en œuvre d'évaluation morphologique de la prolifération cellulaire (Linden et coll, 1992). Elle peut être réalisée sur coupe tissulaire soumise à une coloration histologique de routine, comme la coloration à l'hémalum-éosine communément utilisée. Cependant, cette technique n'autorise qu'une évaluation, dans un tissu donné et à un moment précis, du nombre de cellules présentes en phase M du cycle cellulaire, seule phase morphologiquement identifiable par les modifications structurales de l'ADN (condensation de la chromatine en chromosomes) qui la caractérisent. Or cette phase représente la plus brève période du cycle cellulaire et la détermination de l'index mitotique peut être de ce fait considérée comme une méthode d'évaluation à l'origine d'une forte sous-estimation de l'activité et du potentiel de prolifération véritable d'une tumeur donnée (Hall et Levison, 1990). Par ailleurs, l'identification sans équivoque des figures de mitose sur coupes tissulaires est parfois difficile et leur distinction d'avec des images d'hyperchromatisme nucléaire, de condensation, pycnotique voire avec des figures d'apoptose peut s'avérer impossible. Dans ces cas c'est une surévaluation de l'activité proliférative véritable qui est à craindre (Linden et coll, 1992). Enfin, une standardisation des techniques d'évaluation quantitative du nombre de figures de mitose présentes dans un tissu donné est nécessaire (Ellis et Whitehead, 1981). Comme nous l'avons précédemment évoquée, la quantification par champ microscopique n'est pas recommandée, du fait de la variation de surface tissulaire observée en fonction des microscopes. Sa détermination, par unité de surface de tissu tumoral (par exemple le mm²) voire mieux sous la forme d'un index, exprimant le pourcentage de cellules en mitose par rapport à la population tumorale totale semblerait préférable, dans un souci de standardisation objective de cette évaluation entre observateurs différents (Quinn et Wright, 1990).

Les avancées récentes dans la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans le processus biologique de prolifération cellulaire, ainsi que les progrès réalisés dans les techniques d'analyse et de détection moléculaire *in situ* ont permis à des méthodes de détermination de l'activité proliférative, alternatives au simple comptage des figures de mitose, de voir le jour. Ces techniques ont permis de pallier les principaux inconvénients reprochés au comptage des figures de mitose, soit la brièveté de la phase du cycle de prolifération ainsi détectée, et la difficulté potentielle de son identification certaine. Ainsi, en anatomie pathologique oncologique humaine, la détection immunohistochimique des marqueurs de prolifération Ki-67 et PCNA a été utilisée dans de très nombreuses études à visée pronostique (Hall et Levison, 1990 ; Gerdes, 1990). Comme beaucoup de protéines intervenant dans des processus biologiques aussi fondamentaux que la prolifération cellulaire, ces deux marqueurs ont été très conservés dans le processus de l'évolution des espèces et leur détection est en particulier possible sur tissus animaux, dont canins (Zeman et coll., 1993 ; Theon et coll., 1994 ; Falini et coll., 1989).

En comparaison avec les autres techniques d'évaluation de la prolifération cellulaire (dont en particulier l'incorporation de nucléotides marqués à la thymidine tritiée, d'analogues de nucléotides de type Bromodéoxyuridine (BrdU), ou l'étude du contenu en ADN des cellules par cytométrie en flux), la détection immunohistochimique des marqueurs de prolifération sur coupes tissulaires est une méthode de réalisation technique relativement simple, et dont l'application peut être aisément réalisable en pratique de laboratoire de diagnostic (Linden et coll., 1992). Elle peut être en particulier effectuée sur des prélèvements ayant subis des protocoles standard de fixation et d'inclusion, tels qu'ils peuvent être mis en œuvre en routine sur des pièces destinées à la réalisation de coupes histologiques en vue d'examen microscopique standard (Garcia et coll., 1989 ; McCormick et coll., 1993). De plus, cette détection peut être réalisée dans un contexte tissulaire avec préservation de l'architecture et de la cytologie, et donc des caractéristiques morphologiques du tissu et des cellules tumorales.

Comme toute procédure technique toutefois, la réalisation de réactions immunohistochimiques sur coupes tissulaires doit toutefois suivre des protocoles dont les différents paramètres doivent impérativement être parfaitement standardisés, dans un souci de qualité et de reproductibilité. Plusieurs facteurs en effet sont susceptibles d'intervenir dans la réactivité immunohistochimique et dans ses variations techniques (Hall et coll., 1990 ; Shi et coll., 1991 ; Linden et coll., 1992). Cela est en particulier le cas du type de fixateur et de la durée de fixation des prélèvements, des techniques de traitement utilisées lors de l'inclusion, des méthodes de prétraitements des lames

préalablement à la technique immunohistochimique (digestion protéolytique, traitement par la chaleur...), et du mode opératoire de la technique immunohistochimique elle-même (anticorps utilisés, conditions d'incubation, utilisation de techniques d'amplification...). Les techniques expérimentales d'immunodétection que nous avons mises au point, détaillées en annexe, ont ainsi nécessité plusieurs essais préalables avant de conduire à des résultats d'immunomarquages satisfaisants. Les modes opératoires que nous proposons nous ont donné toutes les garanties de qualité et de reproductibilité souhaitables.

Dans la présente étude, le nombre moyen de cellules à noyau PCNA positif/1000 cellules mastocytaires tumorales est significativement supérieur pour les tumeurs des chiens qui meurent suite à leur mastocytome que pour les tumeurs des chiens qui survivent. Exprimé sous la forme d'un index de marquage, en pourcentage, les mastocytomes malins se caractérisent par un taux de prolifération évalué par l'expression de l'antigène PCNA, de 45 à 79 % avec une valeur moyenne de 62%. Les mastocytomes cliniquement bénins se caractérisent par un index de PCNA de 19 à 66 % avec une valeur moyenne de 43 %. Même si les valeurs moyennes de cet index diffèrent de façon statistiquement significative entre les tumeurs malignes et bénignes, les fourchettes d'index obtenues présentent un chevauchement important des valeurs minimales et maximales obtenues pour ces deux populations. Corrélativement, la détermination du nombre moyen de noyaux PCNA-positifs/1000 noyaux de cellules tumorales en fonction du grade histologique des tumeurs, ne met pas en évidence de différence significative entre les groupes de tumeurs. Ce recouvrement des valeurs d'index compromet l'intérêt de l'utilisation exclusive de ce marqueur pour discriminer les tumeurs de comportement biologique opposé.

Plusieurs facteurs peuvent permettre d'expliquer au moins partiellement ces résultats. Ainsi, l'antigène PCNA, comme toute protéine cellulaire structurale ou fonctionnelle à expression inductible et donc variable au cours de la vie de la cellule, est caractérisé par son temps de demi-vie. Celui-ci se définit comme la période propre à chaque protéine cellulaire séparant le début de la synthèse de la dégradation de la moitié du stock protéique produit. Dans le cas du marqueur protéique PCNA, ce temps de demi-vie est très long, estimé à environ 20 heures (Hall et coll., 1990). Ce temps de demi-vie important conduit à la présence résiduelle d'une quantité non négligeable de l'antigène PCNA dans les cellules filles issues d'une récente mitose préalable, et ce alors que ces cellules post-mitotiques ne sont pas encore entrées dans un nouveau cycle prolifératif. Ce stock protéique non dégradé de marqueur peut ainsi être détecté par les techniques

immunohistochimiques de grande sensibilité. Dans le cas de cycle de cellules cancéreuses, dont la durée de la phase G1, est parfois raccourcie, il est même presque concevable, au moins pour certains types tumoraux à forte activité proliférative, de détecter la présence de ce marqueur de façon permanente, le temps nécessaire à la dégradation de l'antigène PCNA étant supérieur à la durée de retour dans le cycle cellulaire prolifératif (Wijsman et coll., 1992). Ce paramètre biologique a conduit de nombreux auteurs à considérer avec précaution la détection de la protéine PCNA comme un marqueur fiable de la prolifération cellulaire au moins en oncologie (McCormick et Hall, 1991 ; Linden et coll., 1992).

De plus, l'expression de quantités variables, mais non négligeables, du marqueur PCNA a été rapportée dans des cellules non prolifératives au sein de tissus néoplasiques et dans les tissus sains périphériques (Harrison et coll., 1993). Cette surexpression du PCNA a été attribuée soit à un mécanisme de dérégulation et d'amplification génique accompagnant la transformation cancéreuse, soit à l'action de facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales et agissant sur un mode paracrine sur les cellules voisines, néoplasiques ou saines, soit enfin à la synthèse du PCNA au cours des mécanismes mis en jeu lors de la réparation de l'ADN (Hall et coll., 1990). Quelles qu'en soient la ou les raisons, l'évaluation quantitative de la détection du marqueur PCNA sur les prélèvements de tissus néoplasiques conduit, probablement de façon inévitable, à une surévaluation de l'activité proliférative véritable. Nos résultats obtenus dans cette étude, avec des valeurs moyennes de l'index PCNA estimés à environ 50 % sont en faveur également d'une telle surestimation, les mastocytomes cutanés canins étant généralement considérés comme des tumeurs faiblement à modérément prolifératives, par rapport aux autres cancers canins.

Pour prévenir cette surestimation, certains auteurs ont proposé d'utiliser les variations d'intensité des marquages observées sur les coupes tissulaires pour distinguer ainsi les cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire : ils ont proposé de considérer les cellules à noyaux fortement positifs, donc exprimant une forte quantité du marqueur PCNA, comme spécifiques de la phase S du cycle cellulaire, et celles dont les noyaux sont faiblement positifs comme des cellules présentes dans les autres phases du cycle cellulaire voire sorties du cycle et contenant un stock d'antigène non dégradé (Hall et coll., 1990 ; Mc Cormick et Hall, 1991). Ainsi, seules les cellules à noyaux fortement positifs pour la détection du marqueur PCNA devraient être prises en compte pour la détermination de la véritable activité proliférative d'un tissu tumoral donné. Cependant, plusieurs études, réalisées à la fois en médecine oncologique humaine et vétérinaire, ont montré qu'il existait une forte corrélation entre le nombre de cellules tumorales en phase S du cycle cellulaire (déterminé

par des techniques d'incorporation de thymidine tritiée et de bromodeoxyuridine, spécifiques de cette phase) et le pourcentage de cellules positives pour le marqueur PCNA, et ce indépendamment de l'intensité de la positivité de cette réaction (Garcia et coll., 1989 ; Scott et coll., 1991 ; Wijsman et coll., 1992 ; Theon et coll., 1994). De plus, les index de prolifération PCNA déterminés par comptage exclusif des cellules fortement positives à la réaction ont été rapportés par plusieurs auteurs comme corrélés significativement aux index obtenus en comptant la totalité des cellules positives, et ce dans différents types tumoraux étudiés (Sarli et coll., 1994 ; Sarli et coll., 1995 ; Preziosi et coll., 1995). L'ensemble de ces résultats, pour le moins contradictoires, suggère que des investigations supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la signification biologique, si elle existe, de ces variations d'intensité du marquage PCNA observées entre différentes cellules d'un même tissu.

Nous avons, dans notre étude, constaté que de telles variations d'intensité du marquage PCNA entre cellules mastocytaires tumorales étaient présentes sur nos coupes tissulaires. Nous nous limiterons ici volontairement à signaler que, dans l'optique de la détermination et de l'utilisation d'une méthode objective d'évaluation de la prolifération cellulaire, l'introduction d'une discrimination entre des intensités de marquage variables, forcément subjective et de signification biologique douteuse, nous semble contestable. En plus de son coût temporel et de son caractère fastidieux, une telle procédure n'est pas souhaitable dans l'optique d'une application à une procédure de diagnostic rigoureuse et standardisée, puisque nécessairement plusieurs observateurs pourraient prendre en compte ses variations d'intensité de façon divergente et assigner de ce fait à la même tumeur des index de marquage différents.

Dans la présente étude, le nombre moyen de cellules à noyau Ki-67 positif / 1000 cellules tumorales est significativement supérieur pour les tumeurs des chiens qui meurent suite à leur mastocytome que pour les tumeurs des chiens qui survivent. Exprimé sous la forme d'un index de marquage, en pourcentage, les mastocytomes malins se caractérisent par un taux de prolifération évalué par l'expression de l'antigène Ki-67, de 9 à 25 % avec une valeur moyenne de 17 %. Les mastocytomes cliniquement bénins se caractérisent par un index de prolifération Ki-67 de 0 à 10 % avec une valeur moyenne de 5 %. Il n'y a par ailleurs quasiment aucun chevauchement des valeurs entre ces deux populations.

Ainsi, la forte corrélation existant entre le nombre moyen de cellules Ki-67 positives/1000 cellules tumorales et la répartition en grades histologiques pourrait suggérer que la valeur pronostique de ces deux techniques est dépendante du même événement biologique, c'est-à-dire de la prolifération

cellulaire. Et que de ce fait pour ce type tumoral, une part importante de l'évolution biologique serait associée au potentiel de prolifération des cellules tumorales. La valeur pronostique du grading histologique pourrait de ce fait être directement dépendante de ce potentiel prolifératif évalué selon des critères morphologiques comme l'architecture, la densité cellulaire tumorale, la différenciation cytologique des mastocytes tumoraux et évidemment l'index mitotique. Mais ces critères d'évaluation strictement morphologiques peuvent s'avérer insuffisants. C'est le cas en particulier pour les tumeurs de grade 2 ou pour certaines tumeurs où les critères histologiques, architecturaux et/ou cytologiques ne sont pas en agrément et conduisent à situer le néoplasme à la frontière entre deux grades histologiques (entre le grade 1 et le grade 2 ou entre le grade 2 et le grade 3). Dans ces cas, en pratique les plus fréquents, l'évaluation objective de la prolifération cellulaire par la détection immunohistochimique de l'antigène Ki-67 pourrait être d'un grand secours. Elle autorise de reconnaître dans la population hétérogène des tumeurs de grade de différenciation intermédiaire (grade 2), deux sous-populations à taux de survie significativement distincts et de comportement clinique nettement différents : les tumeurs bénignes qui se comporteront comme celles de grade 1 et dont l'exérèse chirurgicale complète pourra être curative ; les tumeurs malignes ou au moins potentiellement malignes (pour lesquelles le stade d'évolution clinique au moment de l'exérèse devra être soigneusement déterminé) et potentiellement redevables d'une thérapeutique adjuvante à la chirurgie seule. De la même façon, cette détection immunohistochimique de l'antigène Ki-67 pourrait fournir un critère objectif complétant l'évaluation morphologique et aidant le pathologiste à trancher définitivement sur les tumeurs histologiquement à la frontière entre deux grades.

Comme nous venons de l'évoquer, cette évaluation immunohistochimique de la prolifération cellulaire, pourrait en plus de sa signification pronostique mais de façon en fait probablement dépendante, permettre une détermination objective des modalités thérapeutiques à mettre en œuvre face à une tumeur donnée. En effet, notre étude a volontairement été restreinte, dans un souci d'homogénéité de cas, à l'évaluation pronostique des mastocytomes soumis exclusivement à exérèse chirurgicale, à l'exclusion de tout traitement complémentaire. Elle a par ailleurs montré que la chirurgie large représente la modalité thérapeutique de choix à visée curative de ce type tumoral, sous réserve du caractère complet de l'exérèse. Cependant, elle ne permet pas seule de guérir des tumeurs biologiquement agressives, et est ainsi à l'évidence insuffisante en particulier face à des tumeurs dont le développement local ou la localisation rend toute tentative d'exérèse complète illusoire ou dans le cas de tumeurs en cours de dissémination et de généralisation cancéreuse au moment du diagnostic.

Les traitements proposés en complément de la chirurgie dans le cas du mastocytome cutané canin sont globalement de même nature que pour tout cancer, relevant de protocoles de radiothérapie et/ou de chimiothérapie adjuvants. Plusieurs études ont montré l'intérêt de ces thérapeutiques, seules ou le plus souvent en complément de la chirurgie, dans le traitement du mastocytome cutané canin (Macy, 1985 ; O'Keefe, 1990). La radiothérapie est ainsi tout particulièrement préconisée dans le contrôle local (site cutané tumoral) et locorégional (nœud lymphatique de drainage) de ce type néoplasique (Turrel et coll., 1988 ; Al Sarraf et coll., 1996). Cette technique est ainsi particulièrement adaptée au traitement des mastocytomes dont la localisation et/ou le développement local n'autorise pas la réalisation d'une chirurgie large et complète. Elle a ainsi été rapportée comme efficace dans le contrôle local des marges des tumeurs dont l'examen microscopique avait révélé le caractère incomplet de la résection chirurgicale, limitant considérablement le taux de récurrences locales (Frimberger et coll., 1997 ; Ladue et coll., 1998). Les traitements systémiques chimiothérapeutiques sont incontournables pour les tumeurs en cours de dissémination métastatique ou pour les formes d'emblée multicentrique, pour lesquelles un traitement chirurgical curatif est illusoire. L'effet bénéfique des glucocorticoïdes a été démontré par plusieurs études (Dobson et Gorman, 1993 ; McCaw et coll., 1994). Des travaux récents ont par ailleurs proposé l'utilisation de la CCNU (chloroethyl-cyclohexyl-nitroso-urée) ou de l'association prednisone-vinblastine, pour les mastocytomes cutanés de grade histologique 2 et 3 (Rassnick et coll., 1999 ; Thamm et coll., 1999).

Qu'il s'agisse de traitements radiothérapeutiques ou chimiothérapeutiques, le principe d'action antitumorale est toujours basé sur l'inhibition physique ou pharmacologique de la prolifération cellulaire (Helfand, 1990). Ces deux modalités thérapeutiques sont de ce fait d'autant plus efficaces que les tumeurs traitées se caractérisent par une forte activité proliférative. La détermination de l'index de prolifération a ainsi été utilisée en médecine oncologique humaine pour la définition et la sélection de groupes de patients, redevables d'un traitement adjuvant, radio- ou chimiothérapeutique, complémentaire de la chirurgie (Porter-Jordan et coll., 1994 ; Oka et coll., 1996). À notre connaissance, cette évaluation est peu développée encore aujourd'hui en pratique cancérologique vétérinaire. Cependant, il est logique d'imaginer que les mastocytomes caractérisés par un fort taux de prolifération et donc un index de marquage élevé, pourraient se révéler plus sensibles à l'effet des radiations ionisantes et à l'action des drogues chimiothérapeutiques.

De ce fait la détermination de l'index de prolifération Ki-67 pourrait permettre de sélectionner les chiens redevables d'une thérapeutique adjuvante à la chirurgie (radiothérapie et/ou chimiothérapie),

et de prévoir, au moins partiellement, la radiosensibilité et la chimiosensibilité d'une tumeur donnée. Une telle démarche permettrait de ce fait d'adopter une stratégie thérapeutique raisonnée et adaptée individuellement à chaque patient atteint de mastocytome cutané, qui doit systématiquement être considéré comme un cas unique.

Conclusion générale - perspectives

Le mastocytome cutané canin est à plus d'un titre un type tumoral digne d'intérêt. Tout d'abord, sa fréquence particulièrement élevée dans l'espèce considérée en fait une dominante pathologique de la cancérologie canine. De plus, la grande variété de ses présentations cliniques apparaît fréquemment déroutante pour le clinicien. Par ailleurs, sa gravité potentielle, puisque les mastocytomes cutanés canins présentent dans environ 30% des cas un comportement d'agressivité locale forte voire une malignité systémique marquée oblige à considérer a priori avec réserve et prudence tout diagnostic de mastocytome chez le chien. Enfin la grande variabilité de son évolution clinique mais surtout le caractère souvent imprévisible de celle-ci désarme fréquemment le praticien comme le pathologiste vétérinaire.

En effet, malgré les nombreuses études réalisées dans ce but, aucun critère pronostique significatif, hormis l'examen histologique, n'a pu être réellement mis en évidence. Cependant, si l'histopathologie, par l'intermédiaire d'un système de grading à visée pronostique performant, permet de prédire avec une bonne fiabilité l'évolution de près de la moitié des mastocytomes cutanés canins, la majorité d'entre eux échappe à toute prévision et se comporte de façon déroutante. Par ailleurs, ce type tumoral n'a pu, contrairement à la grande majorité des tumeurs animales, bénéficier des données diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques de la pathologie comparée, puisqu'il constitue une réelle spécificité de la cancérologie vétérinaire, les proliférations tumorales à mastocytes étant rarissimes dans l'espèce humaine.

C'est dans ce contexte que se positionne notre étude. Il s'agit avant tout d'une démarche de recherche appliquée à la clinique, visant à mettre en évidence de nouveaux critères pronostiques objectifs de cette affection. Notre étude rétrospective a pu ainsi concerner un nombre important de chiens affectés, supérieur d'ailleurs à la plupart des études publiées à ce jour pour ce type tumoral. Nous remercions vivement pour cela le Dr Agnès Poujade d'avoir mis à notre disposition les prélèvements archivés dans son laboratoire d'histopathologie animale, d'où proviennent la totalité des 120 cas utilisés dans cette étude. Par ailleurs, le comportement et l'évolution clinique post-chirurgicale des mastocytomes nous était connus pour l'ensemble des chiens affectés, grâce à l'indispensable collaboration des vétérinaires praticiens référents. Qu'ils en soient également ici chaleureusement remerciés. Nous avons pu ainsi clairement identifier que la détection immunohistochimique des marqueurs de prolifération et tout particulièrement celle de l'antigène Ki-67 représentait un critère pronostique pertinent et fiable pour ce type néoplasique. Elle autorise en particulier une discrimination nette au sein de la population hétérogène des tumeurs de différenciation histologique intermédiaire (grade 2) qui représentent en pratique le type le plus

fréquent et pour lesquelles le grading histologique montre ses limites prédictives, de deux sous-populations de comportements biologiques nettement différents. Elle permet ainsi pour ce type tumoral, parmi les seuls d'ailleurs dont le nom ne renseigne pas sur le caractère malin ou bénin, de concevoir la possibilité de préférer à la répartition traditionnelle en 3 grades, une discrimination plus significative en terme de comportement clinique et surtout de conduite thérapeutique raisonnée, en deux populations : les mastocytomes faiblement prolifératifs (index de prolifération Ki-67 inférieur à 10%) qui peuvent être, avec une bonne confiance, considérés comme des mastocytomes bénins et dont l'exérèse chirurgicale complète pourra être curative ; les mastocytomes plus fortement prolifératifs (index de prolifération Ki-67 supérieur à 10%) qui doivent être a priori considérés comme des mastocytomes malins ou au moins potentiellement malins éventuellement redevables d'une thérapeutique adjuvante à la chirurgie seule, radiothérapeutique et/ou chimiothérapeutiques, qui auraient d'ailleurs probablement, mais cela reste à évaluer, une probabilité plus grande d'être efficaces, du fait précisément d'une activité de prolifération tumorale majorée.

La perspective naturelle de ce travail nous semble être d'évaluer qu'elle peut être la pertinence du protocole que nous proposons dans une démarche pronostique prospective. La facilité de mise en œuvre de notre protocole technique semble favorable à sa diffusion large et donc à une telle évaluation prospective. Nous plaidons ici pour sa mise en œuvre. Nous souhaitons que notre travail puisse ainsi participer à une gestion optimale et raisonnée des chiens atteints de mastocytome cutané canin et puisse d'une manière plus générale ouvrir des perspectives d'approches comparables pour d'autres types tumoraux de l'oncologie vétérinaire.

Références bibliographiques

Al Sarraf R, Mauldin GN, Patnaik AK, Meleo KA. A prospective study of radiation therapy for the treatment of grade 2 mast cell tumors in 32 dogs. *J Vet Intern Med* 1996 ; 10:376-378

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologie moléculaire de la cellule* 1995, troisième édition, pp 864-910, Flammarion.

Alison MR. Assessing cellular proliferation: what's worth measuring? *Hum Exp Toxicol* 1995 ; 14:935-944

Arellano M, Moreno S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 1997 ; 29:559-573

Ayl RD, Couto CG, Hammer AS, Weisbrode S, Ericson JG, Mathes L. Correlation of DNA ploidy to tumor histologic grade, clinical variables, and survival in dogs with mast cell tumors. *Vet Pathol* 1992 ; 29:386-390

Bacchi CE, Gown AM. Detection of cell proliferation in tissue sections. *Brazilian J Med Biol Res* 1993 ; 26:677-687

Baisch H, Gerdes J. Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation-associated antibody Ki-67 and propidium iodide: analysis by flow cytometry. *Cell Tissue Kinet* 1987 ; 20:387-391

Bolon B, Calderwood Mays MB, Hall BJ. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. *Vet Pathol* 1990 ; 27:96-102

Bolton WE, Mikulka WR, Healy CG, Schmittling RJ, Kenyon NS. Expression of proliferation associated antigens in the cell cycle of synchronized mammalian cells. *Cytometry* 1992 ; 13:117-126

Bostock DE, Crocker J, Harris K, Smith P. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *Br J Cancer* 1989 ; 59:915-918

Bostock DE. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *J Small Anim Pract* 1973 ; 14:27-40

Bratulic M, Grabarevic Z, Artukovic B, Capak D. Number of nucleoli and nucleolar organizer regions per nucleus and nucleolus - prognostic value in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 1996 ; 33:527-532

Bravo R, Frank R, Blundell PA, MacDonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase α . *Nature* 1987a ; 326:515-517

Bravo R, MacDonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferation cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Sci* 1987b ; 105:1549-1554

Castagnaro M, De Maria R, Bozetta E, Ru G, Casalone C, Biolatti B, Caramelli M. Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res Vet Sci* 1998 ; 65:223-226

Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 1998 ; 16:311-320

Celis JE, Bravo R, Larsen PM, Fey SJ. Cyclin: a nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. *Leukaemia Res* 1983 ; 8:143-157

Celis JE, Madsen P, Celis A et coll. Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase) is a central component of the pathway(s) leading to DNA replication and cell division. *FEBS Lett* 1987 ; 220:1-7

Chevallier P. PEST sites in nuclear proteins. *Int J Biochem* 1993 ; 25:479-482

Clemo FA, DeNicola DB, Carlton WW, Morrison WB, Walker E. Flow cytometric DNA ploidy analysis in canine transitional cell carcinoma of urinary bladders. *Vet Pathol* 1994 ; 31:207-215

Cohen SM, Ellwein LB. Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* 1990; 249:1007-1011

Coon JS, Landay AL, Weinstein RS. Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab Invest* 1987 ; 57:453-479

Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995 ; 147:545-560

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic basis of disease 1999, 6^{ème} édition, pp 89-98, WB Saunders Company

Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardised nomenclature. *J Pathol* 1989 ; 158: 189-194

Dervan PA, Magee HM, Buckley C, Carney DN. Proliferating cell nuclear antigen counts in formalin-fixed paraffin-embedded tissue correlate with Ki-67 in fresh tissue. *Am J Clin Pathol* 1992 ; 97:S21-S28

Deshaies RJ. The self-destructive personality of a cell cycle in transition. *Curr Opin Cell Biol* 1995 ; 7:781-789

Deshmukh P, Ramsey L, Garewal HS. Ki-67 labeling index is a more reliable measure of solid tumor proliferative activity than tritiated thymidine labeling. *Am J Clin Pathol* 1990 ; 94:192-195

Destexhe E, Vanmanshoven P, Coignoul F. Comparison of argyrophilic nucleolar organizer regions by counting and image analysis in canine mammary tumors. *Am J Vet Res* 1995 ; 56:185-187

Dewhirst MW, LaRue SM, Gerweck L. Tumor physiology and cell kinetics. *Sem Vet Med Surg* 1995 ; 10:148-157

Dictor M, Ehinger M, Mertens F, Akervall J, Wennerberg J. Abnormal cell cycle regulation in malignancy. *Am J Clin Pathol* 1999 ; 112:40-52

Dobson JM, Gorman NT. Cancer chemotherapy in small animal practice. *Library of Veterinary Practice*, Blackwell Scientific Publications 1993, pp. 7-16

- Duchrow M, Schlüter C, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif* 1996 ; 29:1-12
- Elias JM. Cell proliferation indexes: a biomarker in solid tumors. *Biotech Histochem* 1997 ; 72:78-85
- Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996 ; 274:1664-1672
- Ellis PSJ, Whitehead R. Mitosis count - a need for reappraisal. *Hum Pathol* 1981 ; 12:3-4
- Evans T, Rosenthal E, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983 ; 389-396
- Fairman MP. DNA polymerase delta/PCNA: actions and interactions. *J Cell Sci* 1990 ; 95:1-4
- Falini B, Flenghi L, Fagioli M, Stein H, Schwarting R, Riccardi C, Manocchio I, Pileri S, Pelicci PG, Lanfracone L. Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 1989 ; 37:1471-1478
- Fournel-Fleury C, Magnol JP, Chabanne L, Ghernati I, Marchal T, Bonnefond C, Bryon PA, Felman P. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67 antigen. *J Comp Pathol* ; 117:61-72
- Frazier KS, Hines ME 2nd, Hurvitz AI, Robinson PG, Herron AJ. Analysis of DNA aneuploidy and c-myc oncoprotein content of canine plasma cell tumors using flow cytometry. *Vet Pathol* 1993 ; 30:505-511
- Frimberger AE, Moore AS, Larue SM, Gliatto JM, Bengtson AE. Radiotherapy of incompletely resected, moderately differentiated mast cell tumors in the dog: 37 cases (1989-1993). *J Am Anim Hosp Assoc* 1997 ; 33:320-324
- Funasoki Y, Nakayama H, Uetsuka K, Nishimura R, Sasaki N, Doi K. Cellular proliferation and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Vet Pathol* 2000 ; 37:177-183
- Galand P, Degraef C. Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labeling for marking S phase cells in paraffin sections from animal and human tissues. *Cell Tissue Kinet* 1989 ; 22:383-392
- Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. *Am J Pathol* 1989 ; 134:733-739
- Gerdes J, Becker MHG, Key G, Catoretti G. Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 1992 ; 168:85-87

- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984 ; 133:1710-1715
- Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991 ; 138:867-873
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983 ; 31:13-20
- Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. In: Osborn M, editor. *Seminars in Cancer Biology*, Vol.1. London New York; Saunders Scientific Publications 1990 ; pp 99-206
- Goldschmidt MH, Shofer RS. *Skin tumors of the dog and cat*. Pergamon Press Oxford 1992 ; p 231-251
- Goodpasture C, Bloom SE. Visualisation of nucleolar organiser regions in mammalian chromosome using silver staining. *Chromosoma* 1975 ; 33:37-50
- Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: roles of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 1995 ; 11:211-219
- Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 4-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982 ; 218:474-475
- Griffey SM, Kraegel SA, Madewell BR. Proliferation indices in spontaneous canine lung cancer: proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki-67 (MIB1) and mitotic counts. *J Comp Pathol* 1999 ; 120:321-332
- Guillaud P, Vermont J, Seigneurin D. Automatic classification of cells in cell cycle phases based on Ki-67 antigen quantitation by fluorescence microscopy. *Cell Prolif* 1991 ; 24:481-491
- Guinebretière JM, Sabourin JC. Ki-67, marqueur de prolifération. *Ann Pathol* 1997 ; 17:25-30
- Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CCW, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dver R, Waseem NH, Lane DP. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990a ; 162:285-294
- Hall PA, Levison DA. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 1990b ; 43:184-192
- Harrison RF, Reynolds GM, Rowlands DC. Immunohistochemical evidence for the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by non-proliferating hepatocytes adjacent to metastatic tumours and in inflammatory conditions. *J Pathol* 1993 ; 171:115-122

- Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983 ; 31:1333-1335
- Helfand SC. Principles and applications of chemotherapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990 ; 20:987-1013
- Hellmen E, Lindgren A, Linell F, Matsson P, Nilsson A. Comparison of histology and clinical variables to DNA ploidy in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 1988 ; 25:219-226
- Hill CS, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 1995 ; 80:199-
- Hottendorf GH, Nielsen SW. Pathologic survey of 300 extirpated canine mastocytomas. *Zentralbl Veterinärmed Reihe A* 1967 ; 14:272-281
- Howard A, Pelc SR. Nuclear incorporation of P³² as demonstrated by autoradiographs. *Exp Cell Res* 1951 ; 2:178-187
- Hung LC, Pong VF, Cheng CR, Wong FI, Chu RM. An improved system for quantifying AgNOR and PCNA in canine tumors. *Anticancer Res* 2000 ; 20:3273-3280
- Johnson HA, Bond VP. A method of labeling tissues with tritiated thymidine *in vitro* and its use in comparing rates of cellular proliferation in duct epithelium, fibroadenoma and carcinoma of the human breast. *Cancer* 1961 ; 14:639-650
- 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
- Key G, Becker MHG, Baron B, Duchrow M, Schlüter C, Flad HD. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 1993a ; 68:629-636
- Key G, Petersen JL, Becker MHG, Duchrow M, Schlüter C, Askaa J. New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin wax sections. *J Clin Pathol* 1993b ; 46:1080-1084
- Kiupel M, Bostock D, Bergmann V. The prognostic significance of AgNOR counts and PCNA-positive cell counts in canine malignant lymphomas. *J Comp Pathol* 1998 ; 119:407-418
- Kiupel M, Teske E, Bostock D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol* 1999 ; 36:292-300
- Kravis LD, Vail DM, Kisseberth WC, Ogilvie GK, Volk LM. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1996 ; 209:1418-1420

- Kubbutat M, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Flad H, Gerdes J. Epitope analysis of antibodies recognizing the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein). *J Clin Pathol* 1994 ; 47:524-528
- Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res* 1986 ; 166:209-219
- Ladue T, Price GS, Dodge R, Page RL, Thrall DE. Radiation therapy for incompletely resected canine mast cell tumors. *Vet Radiol Ultrasound* 1998 ; 39:57-62
- Lamerton LF, Steel GG. Cell population kinetics in normal and malignant tissues. *Prog Biophys Mol Biol* 1968 ; 18:245-283
- Landberg G, Tan EM, Roos G. Flow cytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen/cyclin and Ki-67 antigen : a new view of the cell cycle. *Exp Cell Res* 1990 ; 187:111-118
- Laprie C, Abadie J, Amardeilh MF, Raymond I, Delverdier M. Detection of the Ki-67 proliferation associated nuclear epitope in normal canine tissues using the monoclonal antibody MIB-1. *Anat Histol Embryol* 1998 ; 27:251-256
- Leblond CP. Classification of cell populations on the basis of their proliferative behaviour. *NCI Monogr* 1963 ; 14:19-145
- Levine AJ. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992 ; 358:15-16
- Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessment of cell proliferation. *Am J Clin Pathol* 1992 ; 97:S4-S13
- Lohr 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
- Macy DW. Canine mast cell tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1985 ; 15:783-803
- Magnol JP, Toulemonde N. Histopronostic du mastocytome cutané canin. Validité du grading de Patnaik. *Rev Med Vet (Toulouse)* 1987 ; 138:125-129
- Maiolino P, Restucci B, De Vico G. Expression of proliferating cell nuclear antigen in basal cell carcinomas and in squamous cell carcinomas of canine skin : correlation with mitotic index and histological features. *Zentralbl Veterinarmed A* 1995 ; 42:339-343
- Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR Jr, et coll. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 1984 ; 309:374-376
- Mc Caw DL, Miller MA, Ogilvie GK, Withrow SJ, Brewer WG Jr, Klein MK, Bell FW, Anderson SK. Response of canine mast cell tumors to treatment with oral prednisone. *J Vet Intern Med* 1994; 8: 406-408

- Mc Cormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology* 1993 ; 22:355-360
- Mc Cormick D, Hall PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 1991 ; 19:29-33
- Mendelsohn ML. The growth fraction: a new concept applied to tumours. *Science* 1963 ; 132:1496
- Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978 ; 121:2228-2233
- Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995 ; 374:131-134
- Morris GF, Mathews MB. Regulation of PCNA during the cell cycle. *J Biol Chem* 1989 ; 264:13856-13864
- Moulton JE. *Tumors in Domestic Animals. Third Edition, Revised and Expanded.* Berkeley, University of California Press 1990, pp. 38-43
- Nielsen SW, Cole CR. Canine mastocytoma. A report of one hundred cases. *Am J Vet Res* 1958 ; 19:417-432
- O'Keefe DA. Canine mast cell tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990 ; 20:1105-1115
- Öfner D, Aubele M, Biesterfeld S, Derenzini M, Gimenez-Mas JA, Hufnagl P, Ploton D, Trere D, Rüschoff J. Guidelines of AgNOR quantification - first update. *Virchows Arch* 1995 ; 427:341
- Ogata K, Kurki P, Celis JE, Nakamura RM, Tan EM. Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. *Exp Cell Res* 1987 ; 168:475-486
- Oka K, Nakano T, Hoshi T. Analysis of response to radiation therapy of patients with cervical adenocarcinoma compared with squamous cell carcinoma. MIB 1 and PC10 labeling indices. *Cancer* 1996; 77: 2280-2285
- Owen LN, Steel GG. The growth and cell population kinetics of spontaneous tumours in domestic animals. *Br J Cancer* 1969 ; 23:493-509
- Pardee A. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974 ; 71:1286-1290
- Patnaik AK, Ehler WN, Mac Ewen EG. Canine cutaneous mast cell tumors: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol* 1984 ; 21:469-474
- Pena LL, Nieto AI, Perez-Alenza D, 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
- Perez Alenza MD, Pena L, del Castillo N, Nieto AI. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract* 2000 ; 41:287-291

- Philipps BS, Kass PH, Naydan DK, Winthrop MD, Griffey SM, Madewell BR. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J Vet Diagn Invest* 2000 ; 12:111-117
- Platz SJ, Breuer W, Pflieger S, Minkus G, Hermanns W. Prognostic value of histopathological grading in canine extramedullary plasmacytomas. *Vet Pathol* 1999 ; 36:23-27
- Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolar organiser region at the optical level. *Histochem J* 1986 ; 18:5-14
- Ploton D, Menager M, Lechki C, Jeannesson P, Visseaux B, Adnet JJ. Coloration des organisateurs nucléolaires (NORs) par l'argent. Application à l'étude de la structure du nucléole et intérêt en pathologie. *Ann Pathol* 1988 ; 8:248-252
- Poirier J, Ribadeau Dumas JL, Catala M, Gherardi RK, Bernaudin JF. *Histologie moléculaire*, 1997, cinquième édition, pp 32-43, Masson SA.
- Porter-Jordan K, Lippman ME. Overview of the biologic markers of breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994; 8: 73-100
- Prelich G, Kostura M, Marshak DR, Mathews MB, Stillman B. The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication *in vitro*. *Nature* 1987a ; 326:471-475
- Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase δ auxiliary protein. *Nature* 1987b ; 326:517-520
- Preziosi R, Sarli G, Benazzi C, Marcato PS. Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. *J Comp Pathol* 1995 ; 113:301-313
- Prosperi E. Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 1997 ; 3:193-210
- Quinn CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol* 1990 ; 160:93-102
- Quirke P, Dyson JED. Flow cytometry: methodology and applications in pathology. *J Pathol* 1986 ; 149:79-87
- Raleigh JA, Zeman EM, Calkins DP, McEntee MC, Thrall DE. Distribution of hypoxia and proliferation associated markers in spontaneous canine tumors. *Acta Oncol* 1995 ; 34:345-349
- Rassnick KM, Mauldin GN, Moroff SD, Mauldin GE, McEntee MC, Mooney SC. Prognostic value of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in feline intestinal lymphoma. *J Vet Intern Med* 1999 ; 13:187-190
- Rassnick KM, Moore AS, Williams LE, London CA, Kintzer PP, Engler SJ, Cotter SM. Treatment of canine mast cell tumors with CCNU (lomustine). *J Vet Intern Med*; 13: 601-605

- Renaudon C, Leblanc B, Andreu M. La coloration argyrophile des organisateurs nucléolaires. *Rev Fr Histotechnol* 1988 ; 1:25-29
- Robbins BA, de la Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 1987 ; 111:841-845
- Roels SL, Tilmant K, Ducatelle R. PCNA and Ki-67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *J Comp Pathol* 1999 ; 121:13-24
- Roels SL, Van Daele AJ, Van Marck EA, Ducatelle RV. DNA ploidy and nuclear morphometric variables for the evaluation of melanocytic tumors in dogs and cats. *Am J Vet Res* 2000 ; 61:1074-1079
- Rogers KS. Mast cell tumors. Dilemmas of diagnosis and treatment. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1996 ; 26:87-102
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 1986 ; 234:364-367
- Rose DSC, Maddox PH, Brown DC. Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J Clin Pathol* 1994 ; 47:1010-1014
- Ross W, Hall PA. Ki-67: from antibody to molecule to understanding. *J Clin Pathol: Clin Mol Pathol* 1995 ; 218:M113-M117
- Rutteman GR, Cornelisse CJ, Dijkshoorn NJ, Poortman J, Misdorp W. Flow cytometric analysis of DNA ploidy in canine mammary tumors. *Cancer Res* 1988 ; 48:3411-3417
- Sarli G, Benazzi C, Preziosi R, Della Salda L, Bettini G, Marcato PS. Evaluating mitotic activity in canine and feline solid tumors: standardizing the parameter. *Biotech Histochem* 1999 ; 74:64-76
- Sarli G, Benazzi C, Preziosi R, Marcato PS. Assessment of proliferative activity by anti-PCNA monoclonal antibodies in formalin-fixed, paraffin-embedded samples and correlation with mitotic index. *Vet Pathol* 1995 ; 32:93-96
- Sarli G, Benazzi C, Preziosi R, Marcato PS. Proliferative activity assessed by anti-PCNA and Ki-67 monoclonal antibodies in canine testicular tumours. *J Comp Path* 1994 ; 110:357-368
- Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 1987 ; 133:579-584
- Sawhney N, Hall PA. Ki-67. Structure, function and new antibodies. *J Pathol* 1992 ; 168:161-162
- Schluter C et coll. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993 ; 123:513-522
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000 ; 182:311-322

- Schonk DM, Kuijpers HJH, Van Drunen E, Van Dalen CH, Geurts Van Kessel AHM, Verheijen R, Ramaekers FCS. Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to the human chromosome 10. *Human Genet* 1989 ; 83:297-299
- Schwyn U, Crompton NE, Blattman H, Hauser B, Klink B, Parvis A, Ruslander D, Kaser-Hotz B. Potential tumour doubling time: determination of Tpot for various canine and feline tumours. *Vet Res Commun* 1998 ; 22:233-247
- Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, Van Noorden S, Price Y, Lane DP, Wright NA. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 1991 ; 165:173-178
- Seigneurin D, Guillaud P. L'antigène Ki-67, marqueur du cycle cellulaire et de la prolifération tumorale. *Pathol Biol* 1991 ; 39:1020-1028
- Shi SR, Key ME, Kalka KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991 ; 39:741-748
- Shivji MKK, Kenny MK, Wood RD. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is required for DNA excision repair. *Cell* 1992 ; 69:345-367
- Silvestrini R, Costa A, Vereroni S, Del Bino G, Persici P. Comparative analysis of different approaches to investigate cell kinetics. *Cell Tissue Res* 1988 ; 21:123-131
- Simoes JP, Schoning P, Butine M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet Pathol* 1994 ; 31:637-647
- Taylor JH, Woods PS, Hughes WL. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Biochemistry* 1957 ; 43:122-128
- Teske E, Rutteman GR, Kuipers-Dijkshoorn NJ, van Dierendonck JH, van Heerde P, Cornelisse CJ. DNA ploidy and cell kinetic characteristics in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol* 1993 ; 21:579-584
- Thamm DH, Mauldin EA, Vail DM. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor: 41 cases (1992-1997). *J Vet Intern Med* 1999; 13: 491-497
- Theon AP, Metzger L, Griffey S. In situ analysis of cellular proliferation in canine, feline and equine tumors by immunohistochemistry : a comparison of bromodeoxyuridine, proliferating cell nuclear antigen, and interchromatin-associated antigen immunostaining techniques. *J Vet Diagn Invest* 1994 ; 6:453-457
- Tijan R, Maniatis T. Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 1994 ; 77:5-10
- Toschi L, Bravo R. Changes in cyclin/PCNA distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol* 1988 ; 107:1623-1628

- Turrel JM, Kitchell BE, Miller LM, Theon A. Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1988 ; 193:936-940
- Vail DM, Kisseberth WC, Obradovich JE, Moore FM, London CA, MacEwen EG, Ritter MA. Assessment of potential doubling time (Tpot), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol* 1996 ; 24:807-815
- Vail DM, Moore AS, Ogilvie GK, Volk LM. Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats. *J Vet Intern Med* 1998 ; 12:349-354
- Van Bockstaele DR, Lan J, Snoeck HW, Korthout M, De Bock RF, Peetermans ME. Aberrant Ki-67 expression in normal bone marrow revealed by multiparameter flow cytometric analysis. *Cytometry* 1991 ; 12:50-63
- Van Dierendonck JH, Keijzer R, Van de Velde CJH, Cornelisse CJ. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1989 ; 49:2999-3006
- Van Diest PJ, Brugal G, Baak JPA. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical values. *J Clin Pathol* 1998 ; 51:716-724
- Verheijen R, Kuijpers HJH, Schlingemann RO, Boehmer ALM, Van Driel R, Brakenhoff GJ, Ramaekers FCS. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I Intracellular localisation during interphase. *J Cell Sci* 1989a ; 92:123-130
- Verheijen R, Kuijpers HJH, Van Driel R, Beck JLM, Van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, Ramaekers FCS. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II Localisation in mitotic cells and associated with chromosomes. *J Cell Sci* 1989b ; 92:531-541
- Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995 ; 55:5187-5190
- Waseem NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990 ; 96:121-129
- Wijsman JH, Van Dierendonck JH, Keijzer R, Van de Velde CJH, Cornelisse CJ. Immunoreactivity of proliferating cell nuclear antigen compared with bromodeoxyuridine incorporation in normal and neoplastic rat tissue. *J Pathol* 1992 ; 168:75-83
- Xiong Y, Zhang H, Beach D. D-type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992 ; 71:505-514
- Yoshida K, Yanai T, Iwasaki T, Sakai H, Ohta J, Kati S, Ishikawa K, Lackner AA, Masegi T. Proliferative potential of canine oral epulides and malignant neoplasms assessed by bromodeoxyuridine labeling. *Vet Pathol* 1999 ; 36:35-41

Zambetti GP, Bargonetti J, Walker K, Prives C, Levine AJ. Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element. *Genes Dev* 1992 ; 6:1143-1152

Zeman EM, Calkins DP, Cline JM, Thrall DE, Raleigh JA. The relationship between proliferative and oxygenation status in spontaneous canine tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993 ; 27

Annexes

**ANNEXE 1 : FICHE DE RENSEIGNEMENTS CLINICO-PATHOLOGIQUES
DES MASTOCYTOMES CUTANES CANINS**

PROPRIETAIRE	VETERINAIRE
Nom : Adresse : Téléphone :	Nom : Adresse : Téléphone :
Référence examen histologique :	

ANNEXE 2 : COLORATION PAR L'HEMALUN-EOSINE SUR COUPES TISSULAIRES DE PRELEVEMENTS FIXES AU FORMOL A 10% ET INCLUS EN PARAFFINE

I - TECHNIQUE

- 1 - **Déparaffiner** et hydrater à l'eau courante.
- 2 - **Colorer** dans l'hémalun * ou Hématoxyline de Harris 3 à 10 mn
- 3 - **Laver** à l'eau courante..... 2 mn
- 4 - **Différencier** dans l'alcool chlorhydrique ** quelques sec
- 5 - **Laver** à l'eau courante
- 6 - **Bleuir** les noyaux avec le carbonate de Lithium*** quelques sec
- 7 - **Laver** à l'eau courante 2 mn
- 8 - **Colorer** dans une solution d'Eosine Erythrosine ***** 3 à 7 mn
- 9 - **Laver** rapidement à l'eau courante.
- 10 - **Déshydratation** dans l'alcool à 95° puis l'alcool à 100°
- 11 - **Eclaircir** et monter.

II- REFERENCES

- Hémalun (Hémateine).....	Merck	11487
- Hématoxyline de Harris	CML	9999504
- Eosine B.....	Merck	15934
- Erythrosine B	Merck	15936

III- REACTIFS

* HEMALUN

- **Porter** à ébullition dans un ballon, 500 ml d'une solution aqueuse saturée à froid d'Alun de potasse : 50 g pour 1 litre d'eau distillée.
- **Retirer** du feu puis ajouter par petites doses, avec précaution, pour éviter les projections : 1 g à 1,2 g d'hématéine.
- **Reporter** à ébullition pendant 5 mn environ.
- **Laisser** déposer pendant 24 heures
- **Filtrer**.
- **Ajouter** 2% d'acide acétique
Si on conserve la solution un certain temps, il est bon de la filtrer si elle a tendance à déposer et de l'acidifier à nouveau si elle vire au violet.

**ANNEXE 3 : REACTION AU BLEU DE TOLUIDINE
SUR COUPES TISSULAIRES DE PRELEVEMENTS
FIXES AU FORMOL A 10% ET INCLUS EN PARAFFINE**

I - TECHNIQUE

- 1 - **Déparaffiner** et **hydrater** à l'eau courante.
- 2 - Colorer dans la solution de **bleu de Toluidine** *..... **1 mn**
- 3 - **Laver** à l'eau courante.
- 4 - Passer les coupes dans l'**alcool à 95 °** puis dans l'**alcool à 100 °**.
- 5 - Eclaircir et Monter.

II - REACTIFS

- * - Bleu de Toluidine **1 g**
- Eau bidistillée pH 6 **100 ml**

III - REFERENCES DES REACTIFS

- Bleu de Toluidine : Merck 1273

IV - RESULTATS

- Coloration de fondbleu pâle
- Noyau et cytoplasmebleu clair à bleu foncé
- Granulations métachromatiques des mastocytesviolet pourpre

**ANNEXE 4 : FICHE D'EXAMEN HISTOLOGIQUE
DES MASTOCYTOMES CUTANES CANINS**

PROPRIETAIRE	VETERINAIRE
Nom :	Nom :
Adresse :	Adresse :
Téléphone :	Téléphone :
Référence examen histologique :	

**ANNEXE 5 : DETECTION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DU MARQUEUR DE
PROLIFERATION KI-67 SUR COUPES TISSULAIRES DE PRELEVEMENTS
FIXES AU FORMOL ET INCLUS EN PARAFFINE A L'AIDE DE
L'ANTICORPS MIB 1**

I - TECHNIQUE

- | | | |
|----|--|---------------------|
| 1 | - Couper des coupes de 5µm et placer sur lames " polysine" avec eau albuminée à 2 %. | |
| 2 | - Sècher à l'étuve à 37°C..... | 12h |
| 3 | - Déparaffiner et hydrater à l'eau distillée | |
| 4 | - Traiter les lames au four à micro-ondes (700 W).....
dans tampon citrate (pH 6) | 2 x 5 min |
| 5 | - Refroidir immédiatement les lames à l'eau du robinet froide | |
| 6 | - Rincer à l'eau distillée préchauffée à 37°C..... | 3 bains |
| 7 | - Trypsiner à 37°C (1 tablette 0,1 g / 1 ml d'eau distillée)..... | 30 sec |
| 8 | - Laver à l'eau distillée..... | 3 bains |
| 9 | - Incuber dans du peroxyde d'hydrogène à 3% dans l'eau distillée..... | 10 min |
| 10 | - Laver à l'eau distillée..... | 3 bains |
| 11 | - Placer les coupes dans des bains de P.B.S 7,6*..... | 5 min |
| 12 | - Incuber dans du sérum normal de chèvre à 20%..... | 20 min |
| 13 | - Incuber avec l'anticorps anti Ki-67 dilué au 1/50^{ième}
dans du P.B.S 7,6* contenant 2% de BSA | 30 min à T°A |
| 14 | Placer dans des bains de P.B.S 7,6* | 3 x 3 min |
| 15 | - Incuber avec l'anticorps anti-Ig de souris biotinylé dilué au 1/300^{ième}
dans P.B.S 7,6* contenant 2% BSA | 30 min à T°A |
| 16 | Placer dans des bains de P.B.S 7,6 * | 3 x 3 min |
| 17 | Incuber avec Streptavidine / PER dilué au 1/300^{ième}
dans P.B.S 7,6 * contenant 2 % BSA | 30 min à T°A |
| 18 | Placer dans des bains de P.B.S 7,6 * | 3 x 3 min |
| 19 | - Incuber avec le substrat chromogène (DAB)..... | 15 min |
| 20 | - Rincer à l'eau distillée. | |
| 21 | - Contre colorer dans l' Hématoxyline de Harris | 1min |
| 22 | - Laver à l'eau courante. | 5min |
| 23 | - Déshydrater et monter . | |

**ANNEXE 6 : DETECTION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DU MARQUEUR DE
PROLIFERATION PCNA (PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN)
SUR COUPES TISSULAIRES DE PRELEVEMENTS FIXES AU FORMOL
ET INCLUS EN PARAFFINE A L'AIDE DE L'ANTICORPS PC 10**

I - TECHNIQUE

- | | | |
|----|---|---------------------|
| 1 | - Couper des coupes de 5µm et placer sur lames "polysine" avec eau albuminée à 2 %. | |
| 2 | - Sècher à l'étuve à 37°C | 12 h |
| 3 | - Déparaffiner et hydrater à l'eau distillée | |
| 4 | - Traiter les lames au four à micro-ondes (700 W).....
dans tampon citrate (pH 6) | 2 x 5 min |
| 5 | - Refroidir immédiatement les lames à l'eau du robinet froide | |
| 6 | - Rincer à l'eau distillée préchauffée à 37°C | 3 bains |
| 7 | - Trypsiner à 37°C (1 tablette 0,1 g / 1 ml d'eau distillée)..... | 30 sec |
| 8 | - Laver à l'eau distillée | 3 bains |
| 9 | - Incuber dans du peroxyde d'hydrogène à 3% dans l'eau distillée | 10 min |
| 10 | - Laver à l'eau distillée | 3 bains |
| 11 | - Placer les coupes dans des bains de P.B.S 7,6* | 5 min |
| 12 | - Incuber dans du sérum normal de chèvre à 20% | 20 min |
| 13 | - Incuber avec l'anticorps anti PCNA dilué au 1/1000^{ième} | 30 min à T°A |
| | dans du P.B.S 7,6* contenant 2% de BSA et 10% de sérum de chien | |
| 14 | Placer dans des bains de P.B.S 7,6* | 3 x 3 min |
| 15 | - Incuber avec l'anticorps anti-Ig de souris biotinylé dilué au 1/300^{ième} | 30 min à T°A |
| | dans P.B.S 7,6* contenant 2% BSA et 10% de sérum de chien | |
| 16 | Placer dans des bains de P.B.S 7,6 * | 3 x 3 min |
| 17 | Incuber avec Streptavidine / PER dilué au 1/300^{ième} | 30 min à T°A |
| | dans P.B.S 7,6 * contenant 2 % BSA | |
| 18 | Placer dans des bains de P.B.S 7,6 * | 3 x 3 min |
| 19 | - Incuber avec le substrat chromogène (DAB) | 15 min |
| 20 | - Rincer à l'eau distillée. | |
| 21 | - Contre colorer dans l' Hématoxyline de Harris | 1 min |
| 22 | - Laver à l'eau courante. | 5 min |
| 23 | - Déshydrater et monter . | |

II- RESULTATS

- Coloration de fondbleu
- Noyaux exprimant l'antigène PCNAmarron brique

III - REFERENCES ANTICORPS / SYSTEME DE REVELATION

- Anticorps primaire anti-PCNA..... Dako, M.0879
(anticorps monoclonal anti-PCNA, clone PC10, produit chez la souris)
- Anticorps secondaire de liaison biotinylé..... Dako, E 433
(anticorps anti-immunoglobuline de souris produit chez la chèvre)
- Streptavidine / PER Dako, P 397
(streptavidine couplée à l'enzyme peroxydase)
- DAB liquide (diaminobenzidine) Dako, K.3465
(dans 1 ml de DAB substrat, ajouter 1 goutte de DAB chromogène, puis mélanger)

IV - REFERENCES PRODUITS AUTRES QU'ANTICORPS

- Trypsine Sigma, T.7168
- BSA (Bovine Serum Albumine)..... Sigma, A.7168
- Sérum normal de chèvre Dako, X 907
- Sérum normal de chien Jackson Imuunoresearch Lab, 004-000-120

II - RESULTATS

- Coloration de fondbleu
- Noyaux exprimant l'antigène Ki-67marron brique

III - REFERENCES ANTICORPS / SYSTEME DE REVELATION

- Anticorps primaire anti-Ki-67 Immunotech,
(anticorps monoclonal anti-Ki-67, clone MIB 1, produit chez la souris)
- Anticorps secondaire de liaison biotinylé..... Dako, E 433
(anticorps anti-immunoglobuline de souris produit chez la chèvre)
- Streptavidine / PER Dako, P 397
(streptavidine couplée à l'enzyme peroxydase)
- DAB liquide (diaminobenzidine) Dako, K.3465
(dans 1 ml de DAB substrat, ajouter 1 goutte de DAB chromogène, puis mélanger)

IV - REFERENCES PRODUITS AUTRES QU'ANTICORPS

- Trypsine Sigma, T.7168
- BSA (Bovine Serum Albumine)..... Sigma, A.7168
- Sérum normal de chèvre Dako, X 907

**** ALCOOL CHLORHYDRIQUE**

- | | | |
|---------------------------------------|------|----|
| - Alcool à 70°..... | 1000 | ml |
| - Acide chlorhydrique (d = 1,19)..... | 5 | ml |

***** CARBONATE DE LITHIUM**

- Carbonate de lithium à saturation dans l'eau distillée.

****** EOSINE - ERYTHROSINE**

- | | | |
|-----------------------|------|----|
| - Eosine | 4 | g |
| - Erythrosine B | 4 | g |
| - Eau distillée..... | 1000 | ml |

IV - RESULTATS

- Noyaubleu
- Cytoplasmerose
- Coloration de fond (ex : tissu conjonctif).....rose

Toulouse, 2001

NOM : ABADIE

PRENOM : Jérôme

TITRE : LES MARQUEURS DE PROLIFERATION EN ONCOLOGIE VETERINAIRE
APPLICATIONS A L'ETUDE PRONOSTIQUE DU MASTOCYTOME CUTANE CANIN

RESUME : Le mastocytome cutané représente un type tumoral dominant de la cancérologie du chien mais demeure l'une des tumeurs canines au comportement clinique les plus imprévisibles. L'auteur évalue dans une étude rétrospective portant sur 120 chiens porteurs de mastocytome cutané, la valeur pronostique de la détection immunohistochimique des marqueurs de prolifération PCNA et Ki-67. Il montre que la détermination de l'expression de l'antigène Ki-67 permet de prédire avec une grande fiabilité l'évolution clinique post-chirurgicale de ce type tumoral.

MOTS-CLES : Mastocytome cutané canin - Cancérologie - Marqueurs de prolifération - PCNA - Ki-67

ENGLISH TITLE : PROLIFERATION MARKERS IN VETERINARY ONCOLOGY
APPLICATIONS TO PROGNOSIS OF CANINE CUTANEOUS MAST CELL TUMOR

ABSTRACT : Cutaneous mast cell tumors are very common in the dog, but behave frequently in an unpredictable fashion. In a retrospective study performed on mast cell tumor tissue surgically removed from 120 dogs, the author assesses the prognostic significance of immunohistochemical detection of PCNA and Ki67 antigen. He concludes that the determination of Ki67 expression may be clinically useful to prognosis and the prediction of survival times for dogs with mast cell tumor.

KEY WORDS : Canine cutaneous mast cell tumor - Oncology – Proliferation markers - PCNA - Ki-67