



APPORT DE LA CYTOLOGIE ET DE L'HISTOLOGIE EN ONCOLOGIE CANINE

Thèse

Pour l'obtention du titre

de

Docteur en Médecine Vétérinaire

Présentée et soutenue publiquement par

Yasmine CHEIKH ALI

Le 06/02/2016

Membres du jury :

Président : Pr. Mohamed AOUINA

Assesseur : Pr. Faouzi LANDOLSI

Rapporteur : Pr. Ahmed REJEB

REMERCIEMENTS

Grâce soit rendue à Allah pour ce que j'ai et pour ce que je suis

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur Mohamed AOUIA

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider notre jury de thèse.

Veillez trouver ici le témoignage de notre gratitude et notre profond respect

A notre Juge de thèse

Monsieur le Professeur Faouzi LANDOLSI

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter l'évaluation et le critique de ce travail.

Veillez trouver ici notre vive reconnaissance et notre profonde admiration pour vos conseils et pour votre participation

A notre Encadreur de thèse

Monsieur le Professeur Ahmed REJEB

Nous sommes heureux de vous exprimer ici notre gratitude, tant pour les précieux conseils que vous nous avez prodigué, que la confiance que vous avez accordé dans l'élaboration de ce travail.

Nous vous remercions pour votre disponibilité permanente, votre dévouement, et vos qualités humaines

DEDICACES

*En témoignage de ma gratitude, ma reconnaissance et ma fidélité je dédie ce
travail*

A mon père AbdelAziz et ma mère Wassila

*Qui ont été toujours prêts à me soutenir, à m'entourer de leur affection et à
m'encourager pour remplir cette formation. Ce travail leur témoigne ma
profonde affection pour les sacrifices qu'ils m'ont accordés durant toute ma vie.*

Que dieu les garde et prolonge notre union.

A mes sœurs Nesrine et Sabrine, A mon frère Mohamed Amine

Pour qui j'ai beaucoup d'affection et d'attachement.

Et à qui j'espère beaucoup de bonheur et de succès dans leur vie.

A la famille Hamzi

*Que ce travail soit l'expression de mes sentiments les plus sincères, ma gratitude
et le témoignage de ma profonde estime*

A la famille Znaidi

Pour leur accueil chaleureux et leurs encouragements

A tous mes amis

*Zoubaida, Amira, Amen, Ibtihel, Sarah, Mouna, Marwa, Amira, Mouna, Belkiss,
Mohamed, Bassem, Helmi, Nizar, Yahya, Safa, Jouda, Rihab, Ines, Farida,
Ramla, Dorra, Amel, Hounaida, Firas*

En souvenirs des moments qu'on a passé ensemble.

TABLE DES MATIERES	PAGE
INTRODUCTION	1
PARTIE I : L'EXAMEN CYTOLOGIQUE EN ONCOLOGIE CANINE	
I. CYTOPONCTIONS DE NEOFORMATIONS	2
1. Cytoponctions de masses cutanées ou sous-cutanées	2
1.1. Techniques de prélèvement	2
1.1.1. Réalisation d'une ponction à l'aiguille fine sans aspiration	2
1.1.2. Réalisation d'une ponction à l'aiguille fine avec aspiration	3
1.2. Préparation d'une lame	5
1.2.1. Étalement	5
1.2.2. Fixation et coloration	7
1.2.2.1. Fixation	7
1.2.2.2. Colorations	8
1.2.2.2.1. Coloration de Romanowsky	8
1.2.2.2.2. Colorations bichromes et trichromes	9
1.2.2.2.3. Colorations spéciales	9
1.3. Principes d'interprétations	9
1.3.1. Appréciation de la qualité du prélèvement et du fond du frottis	9
1.3.2. Démarche diagnostique	10
1.3.2.1. Diagnostic de tumeur	10
1.3.2.2. Diagnostic de l'histogenèse de la tumeur	11
1.3.2.2.1. Examen du fond du frottis	11
1.3.2.2.1.1. Tumeurs à cellules rondes	11
1.3.2.2.1.2. Tumeurs épithéliales	12
1.3.2.2.1.3. Tumeurs mésenchymateuses	13
1.3.2.2.2. Appréciation des détails cytologiques	15
1.3.2.3. Diagnostic de bénignité/malignité	17
1.4. Efficacité diagnostique de l'examen cytologique des cytoponctions de masses cutanées et sous-cutanées	20
1.4.1. Données générales	20
1.4.2. Données spécifiques	20
1.4.2.1. Cas des tumeurs épithéliales	20
1.4.2.2. Cas des tumeurs conjonctives	20
1.4.2.3. Cas des tumeurs à cellules rondes	21
1.4.2.4. Cas particuliers des tumeurs mammaires	21
1.4.2.5. Cas particulier des tumeurs périnéales	22

2. Cytoponctions des nœuds lymphatiques	24
2.1. Technique de prélèvement	24
2.2. Applications, intérêts et limites	24
2.2.1. Adénogrammes et dépistage de métastases ganglionnaires	24
2.2.2. Adénogrammes et lymphomes	25
2.2.2.1. Distinction entre adénite, hyperplasie lymphoïde et lymphome	26
2.2.2.2. Classification des lymphomes malins	27
3. Cytoponctions échoguidées	29
3.1. Repérage du site et préparation	29
3.1.1. Repérage du site	29
3.1.2. Préparation du site	29
3.2. Ponction	30
3.2.1. Matériel utilisé	30
3.2.2. Différentes techniques	30
3.2.2.1. Cytoponction avec guide	30
3.2.2.2. Cytoponction sans guide	31
3.3. Applications pratiques et efficacité diagnostique	32
3.3.1. Données générales	32
3.3.2. Exemples d'organes	33
3.3.2.1. Tube digestif	33
3.3.2.2. Foie	34
3.3.2.3. Rate	34
3.3.2.4. Reins	34
4. Cytoponction du parenchyme pulmonaire	35
4.1. Technique de prélèvement	35
4.2. Intérêts et contre indications	36
5. Cytologie de la moelle osseuse (myélogramme)	37
5.1. Réalisation du myélogramme	37
5.1.1. Sites de prélèvement	37
5.1.2. Technique de prélèvement	38
5.1.3. Préparation des lames	39
5.2. Intérêts et applications	39
 II. CYTOPONCTIONS LIQUIDIENNES	 40
1. Cytoponctions d'épanchements cavitaires	40
1.1. Méthodologie	41
1.1.1. Techniques de prélèvement	41
1.1.2. Acheminement du prélèvement non traité	42
1.1.3. Etalement	43

1.1.4. Séchage et fixation	44
1.1.5. Colorations	44
1.2. Méthodologie de lecture des lames d'épanchements	44
1.2.1. Bases de l'interprétation cytologique	44
1.2.2. Démarche de lecture d'un étalement	45
1.3. Difficultés d'interprétation	45
1.4. Efficacité diagnostique de l'examen cytologique d'étalements de cytoponctions d'épanchements cavitaires	47
1.5. Cytologie des épanchements et immunomarquage	47
2. Cytologie du liquide synovial	47
2.1. Techniques de prélèvement	48
2.2. Utilité de l'examen cytologique d'étalements de cytoponctions du liquide synovial en cancérologie	48
3. Cytologie du liquide céphalo-rachidien	49
3.1. Matériel utilisé	49
3.2. Technique de prélèvement	49
3.3. Contre indications	50
3.4. Applications pratiques	50
 III. LAVAGE, BROSSAGE, ECOUVILLONNAGE, MASSAGES-RINÇAGE	 51
1. Cytologie des premières voies respiratoires	51
1.1. Techniques de prélèvement	51
1.2. Applications	52
2. Cytologie de l'arbre respiratoire	52
2.1. Techniques de prélèvement	52
2.1.1. Lavage trans-trachéal	52
2.1.1.1. Matériels utilisés	53
2.1.1.2. Préparation de l'animal	53
2.1.1.3. Technique du lavage	54
2.1.1.4. Traitement des échantillons	55
2.1.2. Lavage broncho-alvéolaire	55
2.1.2.1. Matériel nécessaire	56
2.1.2.1.1. LBA par bronchoscopie	56
2.1.2.1.2. LBA à l'aveugle	56
2.1.2.2. Technique du prélèvement	57
2.1.2.2.1. LBA ciblé sur une zone pulmonaire	57
2.1.2.2.2. LBA "en aveugle"	57
2.1.3. Brossage trachéal et bronchique	58
2.1.4. Biopsie bronchique	58

2.2. Efficacité diagnostique de la cytologie de l'arbre respiratoire	58
2.3. Difficultés d'interprétation	59
3. Cytologie urinaire	59
3.1. Techniques de prélèvement	59
3.2. Applications et efficacité diagnostique	59
4. Cytologie prostatique	60
4.1. Techniques de prélèvement	60
4.1.1. Massage rinçage prostatique	60
4.1.2. Obtention de liquide prostatique par aspiration à l'aiguille fine	61
4.2. Applications	62
4.3. Efficacité diagnostique	63
IV. CALQUES PAR IMPRESSION, ECOUVILLONNAGE, CALQUES A LA CELLOPHANE ADHESIVE ET APPPOSITIONS	64
1. Calques par impression	64
2. Écouvillonnage	64
3. Calque à la cellophane adhésive	65
4. Appositions	65
V. GRATTAGES	66
VI. PASTILLES DE CYTOCENTRIFUGATION	66
VII. INTERETS DU DIAGNOSTIC CYTOLOGIQUE EN ONCOLOGIE CANINE	66
1. Avantages et limites de la cytologie	66
1.1. Intérêts techniques	66
1.2. Limites	67
2. Apport diagnostique de la cytologie	68
3. Apport pronostique de la cytologie	69
4. Apport thérapeutique de la cytologie	70
PARTIE II : L'EXAMEN HISTOLOGIQUE EN ONCOLOGIE CANINE	
I. TECHNIQUES EN HISTO-PATHOLOGIE	71
1. Technique de préparation standard en histopathologie : l'inclusion en paraffine	71
1.1. Prélèvement	71
1.2. Fixation	71
1.3. Déshydratation et inclusion à la paraffine	72

1.4. Coupe des blocs et collage des coupes	73
1.5. Etalement et collage des coupes sur des lames de verre	73
1.6. Déparaffinage et réhydratation	73
1.7. Coloration	74
1.7.1. Coloration à l'Hématéine Eosine (H.E.)	74
1.7.2. Coloration à l'Hématéine-Eosine-Safran (H.E.S)	75
1.7.3. Coloration à l'Acide Périodique de Schiff (A.P.S. ou P.A.S.)	75
1.7.4. Giemsa	76
1.8. Déshydratation	76
1.9. Montage	76
2. Techniques complémentaires en histologie : techniques spéciales de détection <i>in situ</i>	78
2.1. Enzymologie et immunohistochimie	78
2.2. Immunophénotypage	79
3. Difficultés d'interprétation : artéfacts	81
 II. APPLICATIONS GENERALES ET EFFICACITE DIAGNOSTIC	 83
1. Diagnostic histologique d'une tumeur	83
1.1. Critères topographiques	83
1.2. Critères morphologiques	85
1.2.1. Taille des cellules	85
1.2.2. Forme du noyau	87
1.2.3. Importance de la nucléolation	87
1.2.4. Aspect de la chromatine	88
1.2.5. Extension du cytoplasme et ses caractéristiques tinctoriales	88
1.3. Critères d'agressivité	89
1.3.1. Etude de la prolifération : techniques et intérêts en oncologie canine	89
1.3.1.1. Index mitotique	89
1.3.1.1.1. Principe général	89
1.3.1.1.2. Limites en cancérologie canine	90
1.3.1.2. Organismes nucléolaires (AgNORs)	91
1.3.1.2.1. Biologie	91
1.3.1.2.2. Utilisation de l'index	92
1.3.1.2.3. Intérêts en cancérologie canine	92
1.3.1.2.4. Limites de l'utilisation de l'index AgNOR	94
1.3.1.3. Détection immunohistochimique des marqueurs de prolifération cellulaire PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et l'antigène Ki-67	94
1.3.1.3.1. Antigène nucléaire de prolifération cellulaire ou	95

proliferating cell Nuclear Antigen (PCNA)	
1.3.1.3.1.1. Biologie, structure et fonction	95
1.3.1.3.1.2. Intérêts en cancérologie canine	95
1.3.1.3.1.2.1. Tumeurs mammaires	96
1.3.1.3.1.2.2. Mastocytome cutané canin	97
1.3.1.3.1.2.3. Lymphomes canins	98
1.3.1.3.1.3. Limites de l'index PCNA	98
1.3.1.3.2. Antigène Ki-67	99
1.3.1.3.2.1. Biologie, structure et fonction	99
1.3.1.3.2.2. Utilisation de l'antigène ki-67	100
1.3.1.3.2.3. Intérêts de l'antigène ki67 en cancérologie canine	102
1.3.1.3.2.3.1. Tumeurs mammaires	102
1.3.1.3.2.3.2. Lymphomes canins	103
1.3.1.3.2.3.3. Mastocytome cutané canin	105
1.3.1.3.2.3.4. Mélanome du chien	107
1.3.1.3.2.4. Limites du ki 67	107
1.3.2. Importance de l'apoptose	107
1.3.3. Recherche d'embolies	109
2. Bilan d'extension	109
2.1. Bilan d'extension Loco-régional	109
2.2. Bilan d'extension général	110
III. EVALUATION DU PRONOSTIC DES CANCERS	111
1. Degré d'extension : système de stadification TNM	111
2. Degré de différenciation : le grade histologique	114
2.1. Mastocytome cutané canin	114
2.1.1. Grading de Patnaik	114
2.1.2. Grading de Kiupel	115
2.2. Tumeurs mammaires	116
2.2.1. Grading de Scarff, Bloom et Richardson	116
2.2.2. Grading de Gilbertson	117
IV. HISTOLOGIE EN THERAPEUTIQUE DES TUMEURS CHEZ LE CHIEN	118
1. Histologie et décision thérapeutique	119
2. Evaluation histopathologique des marges d'exérèse : intérêts et limites	120
CONCLUSION	122
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

	LISTE DES TABLEAUX	PAGE
Tableau I :	Classification d'une tumeur : épithéliale, mésenchymateuse ou à cellule ronde	14
Tableau II :	Comparaison de la fiabilité diagnostique de l'examen cytologique dans le cas de tumeurs mammaires chez la chienne faites par 2 cytologistes	21
Tableau III :	Répartition classification des lymphomes selon la classification de Kiel adaptée aux lymphomes canins	28
Tableau IV :	Sites de ponction des divers épanchements	41
Tableau V :	Apport de la cytologie au diagnostic différentiel des différents types pathogéniques d'épanchements cavitaires	46
Tableau VI :	Exemples de marqueurs utilisés afin d'identifier le type cellulaire	78
Tableau VII :	Principaux marqueurs cellulaires employés chez le chien	80
Tableau VIII :	Pourcentage de chiennes ayant développé des métastases durant le suivi post-chirurgical en fonction de l'index Ki-67	103
Tableau IX :	Index ki67 en fonction du grade histologique	105
Tableau X :	Taux de survie à deux ans en fonction de l'index Ki67 et le grade histologique	106
Tableau XI :	Métastases type leucémie	110
Tableau XII :	Métastases types mastocytomes malins	110
Tableau XIII :	Métastases type lymphome malins ganglionnaire	110
Tableau XIV :	Métastases" type cancers épithéliaux, mésenchymateux, mélanique	111
Tableau XV :	Classification TNM pour les tumeurs mammaires des animaux domestiques établie par l'OMS en 1980	112
Tableau XVI :	Détermination du stade TNM pour les tumeurs mammaires d'une chienne	113
Tableau XVII :	Pourcentage de chiennes ayant développé une récurrence ou un nouveau carcinome infiltrant dans les 2 ans suivant la mastectomie	117
Tableau XVIII :	Conduite du traitement d'un mastocytome en fonction de son grade histologique	120

	LISTE DES PHOTOS	PAGE
Photo 1 :	Cytoponction sous guidance échographique avec guide	31
Photo 2 :	Cytoponction sous guidance échographique sans guide	32
Photo 3 :	Collection aseptique du LCR	50
Photo 4 :	Réalisation d'une apposition suite à l'exérèse chirurgicale d'une masse	66
Photo 5 :	Bains, colorants et résine de montage	76

	LISTE DES FIGURES	PAGE
Figure 1 :	Ponction à l’aiguille fine sans aspiration	3
Figure 2 :	Cytoponction à l’aiguille fine avec aspiration à partir d'une masse solide	5
Figure 3 :	Technique "d'étirement vers l'arrière suivi d'un étalement vers l'avant"	6
Figure 4 :	Technique "d'écrasement ou de séparation"	7
Figure 5 :	Tumeur à cellules rondes	12
Figure 6 :	Archétype de la cellule épithéliale	12
Figure 7 :	Tumeur mésoenchymateuse	13
Figure 8 :	Algorithme d’aide à l’évaluation des cytoponctions des tumeurs cutanées ou sous-cutanées	16
Figure 9 :	Pléomorphisme cellulaire (carcinome chien)	17
Figure 10 :	Anisocytose anisocaryose (adénocarcinome chien)	18
Figure 11 :	Carcinome des glandes apocrines du sac anal	23
Figure 12 :	Cytologie d’une ponction-aspiration à l’aiguille fine d’une tumeur périanale	23
Figure 13 :	Un bon myélogramme chez un chien révèle une cellularité élevée	40
Figure 14 :	Lavage transtrachéal : deux techniques de prélèvement	54
Figure 15 :	Illustration d’un massage prostatique	61
Figure 16 :	Effet de la coloration à l’hématoxyline et à l'éosine utilisés seuls et celle de l’hématoxyline et l'éosine utilisés en combinaison	75
Figure 17 :	Différentes étapes de préparation d'une lame histologique par la méthode de paraffine	77

Figure 18 :	Immunohistochimie (lymphome canin, nœud lymphatique, chien)	81
Figure 19 :	Exemple d'artéfact : dépôts de colorant : Cartilage-chien	82
Figure 20 :	Exemple d'artéfact (séparation, espace) Peau, chien	82
Figure 21 :	Epithéliotropisme (lymphome cutané, chien)	84
Figure 22 :	Tropisme épidermique (lymphome cutané, chien)	84
Figure 23 :	Atteinte épidermique, dermique et annexielle	85
Figure 24 :	Taille du petit lymphocyte réactionnel : 4,5 à 5,5 mm	86
Figure 25 :	Taille de cellule lymphomateuse	86
Figure 26 :	Noyaux de formes irrégulières	87
Figure 27 :	Important volume de nucléole	87
Figure 28 :	Aspect de la chromatine (lymphome cutané, chien)	88
Figure 29 :	Vacuoles cytoplasmiques : (tumeur rénale, chien)	89
Figure 30 :	Index mitotique élevé (lymphome cutané, chien)	90
Figure 31 :	Mise en évidence des NORs par coloration argentique, cas de mastocytome cutané canin	93
Figure 32 :	Lymphome cutané canin avec un index ki67 inférieur à 21% (bas grade)	104
Figure 33 :	Lymphome cutané canin avec un index ki67 supérieur à 21% (haut grade)	104
Figure 34 :	Mastocytome cutané avec un index ki67 supérieur à 10%	106
Figure 35 :	Apoptose importante (lymphome cutané, chien)	108
Figure 36 :	Embole vasculaire (Mastocytome cutané, chien)	109
Figure 37 :	Marges d'une tumeur : différentes images possibles	121

LISTES D'ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

G : gauge

HE : Hématéine-Eosine

kD : Kilodaltons

Kg : kilogramme

LBA : lavage broncho-alvéolaire

LCET : lymphome cutané épithéliotrope à lymphocytes T

LCR : liquide céphalo-rachidie

LM : lymphome malin

MCC : mastocytome cutané canin

MGG : May-Grünwald Giemsa

ml : millilitre

mm : millimètre

MO : Microscope optique

OMS : organisation mondiale de santé

PAS : Periodic Acid Schiff

µm : micromètres

INTRODUCTION

Chez l'homme comme chez le chien, les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Ils se manifestent souvent par un amaigrissement, l'apparition de grosseurs ou encore de différents symptômes en fonction de l'organe atteint. Ces cancers sont suspectés par le clinicien et diagnostiqués par le pathologiste. Ils peuvent intéresser n'importe quel organe ou tissu dans l'organisme.

Actuellement, et parce que les stratégies thérapeutiques ont changé, des informations plus précises sont nécessaires au clinicien. Le rôle du pathologiste dépasse alors le diagnostic précis, il est appelé aussi à donner certains éléments pronostiques.

En oncologie vétérinaire, le diagnostic et le pronostic vis-à-vis d'un processus tumoral sont encore généralement obtenus par examen histologique classique de pièces d'exérèse ou de biopsies. Cependant, cette procédure implique de devoir parfois être complétée par une seconde intervention chirurgicale si la tumeur n'a pas été excisée en totalité lors de la première intervention. Parfois même, un pronostic extrêmement sombre rendant tout espoir thérapeutique illusoire, cette première intervention ne présente qu'une utilité diagnostique. Enfin, réaliser un bilan d'extension complet du processus tumoral impliquerait selon cette procédure de résectionner ou de biopsier tous les nœuds lymphatiques et organes susceptibles de contenir des métastases ou micrométastases : une telle intervention serait chirurgicalement lourde et à risque pour l'animal.

En oncologie humaine puis en oncologie vétérinaire se sont développés les examens cytologiques afin de tâcher de pallier aux inconvénients de l'histologie, bien que cette dernière reste toujours l'examen de référence, encore indispensable le plus souvent.

L'objet de cette étude sera de décrire, à partir d'une étude bibliographique, les examens cytologiques et histologiques faites en pratique vétérinaire pour diagnostiquer et établir un pronostic statistique concernant les tumeurs canines.

Nous envisagerons dans une première partie les principaux examens cytologiques en cancérologie canines, l'intérêt et les limites de cette technique.

La deuxième partie de notre travail concernera les examens histologiques et leurs intérêts dans l'étude diagnostique, pronostique et thérapeutique des tumeurs les plus fréquentes chez le chien.

PARTIE I :

L'EXAMEN CYTOLOGIQUE EN

ONCOLOGIE CANINE

I. CYTOPONCTIONS DE NEOFORMATIONS

1. Cytoponctions de masses cutanées ou sous-cutanées

1.1. Techniques de prélèvement

Une bonne contention de l'animal est nécessaire. Dans certains cas, une sédation devrait être utilisée si le site de prélèvement est situé près de structures délicates, ou si l'animal est agité voire agressif. Une anesthésie générale peut être recommandée lorsqu'une immobilité complète est nécessaire.

Pour une ponction cutanée, le site doit être propre et un léger nettoyage avec un tampon d'alcool est généralement suffisant.

La ponction à l'aiguille fine est la technique de choix pour la majorité des masses cutanées ainsi que pour de nombreux autres sites et tissus. Elle présente de nombreux avantages : c'est une technique simple, rapide, non traumatique et sans danger à réaliser **(Hellmen et Lindgren, 1989)**.

Elle s'effectue par simple ponction de la lésion en utilisant une technique sans aspiration (avec aiguille démontée) ou une technique avec aspiration en employant une seringue attachée à l'aiguille. Les calibres d'aiguille recommandés sont variables selon les auteurs de 21-G à 23-G **(Raskin et Meyer, 2010 ; Dunn, 2014)**, 22-25G **(Cowell et Valenciano, 2014)**.

1.1.1. Réalisation d'une ponction à l'aiguille fine sans aspiration

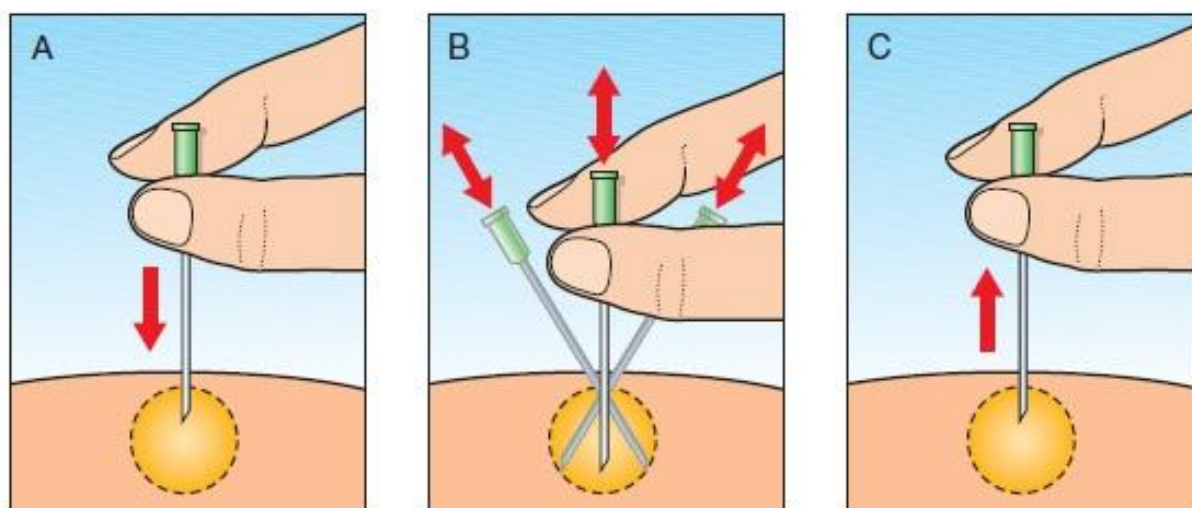
La ponction avec aiguille démontée suffit pour la plupart des tissus. Cette technique est plus facile à exécuter et est plus précise qu'un prélèvement avec aspiration. De plus, comme le prélèvement se fait sans dépression, le risque de contamination de l'échantillon par du sang périphérique est réduit.

Le prélèvement cellulaire s'effectue par l'exécution de nombreux mouvements de « va-et-vient » afin d'introduire des cellules et des fragments tissulaires dans l'aiguille. Il est recommandé de changer l'orientation de l'aiguille plusieurs fois au cours du prélèvement **[Figure 1]**.

Pour des lésions dont le diamètre excède 1,5 cm, plusieurs parties de la lésion devraient être ponctionnées afin d'obtenir un échantillon plus représentatif.

En effet, la ponction de la périphérie d'une masse, d'un centre nécrotique, d'une zone liquidienne ou d'une composante strictement inflammatoire au sein d'une lésion hétérogène, peut se traduire par un échantillon non représentatif.

Enfin, lors du prélèvement « va-et-vient », il faut veiller à ne pas faire sortir l'aiguille de la lésion afin d'éviter que l'échantillon ne soit contaminé par des cellules cutanées ou adipeuses. Aussi, si du sang remonte dans l'aiguille en effectuant cette manipulation, il est préférable de retirer l'aiguille immédiatement et d'étaler le contenu sur une ou deux lames avant la coagulation de l'échantillon. Dans ce cas, une deuxième ou même une troisième tentative de ponction est conseillée afin d'obtenir le meilleur échantillon possible (**Dunn, 2014 ; Pouletty, 2014**).



A : Insertion de l'aiguille ; B : Mouvements de va-et-vient ; C : Retraitement de l'aiguille

Figure 1 : Ponction à l'aiguille fine sans aspiration (Raskin et Meyer, 2010)

1.1.2. Réalisation d'une ponction à l'aiguille fine avec aspiration

Un prélèvement par aspiration peut être utilisé si la ponction avec aiguille démontée ne permet pas d'obtenir un échantillon suffisamment cellulaire.

La lésion est d'abord ponctionnée avec une aiguille fixée à une seringue de 3 à 20 ml, la taille de la seringue utilisée dépend de la consistance du tissu aspiré, plus le tissu est moelleux, moins est la taille recommandée (**Cowell et Valenciano, 2014**).

Une seringue de 20 ml est généralement recommandée pour l'aspiration de tissus plus fermes composés de cellules exfoliant peu (comme certaines tumeurs mésoenchymateuses), alors qu'une plus petite seringue est recommandée pour l'aspiration de tissus plus fragiles **(Pouletty, 2014)**.

La masse est stabilisée avec une main tandis que l'aiguille attachée à une seringue est introduite par l'autre main dans le centre de la masse. Une fois le tissu pénétré, une pression négative est exercée à plusieurs reprises en retirant le piston jusqu'au 3/4 du volume de la seringue pour favoriser le détachement cellulaire.

L'aiguille est redirigée à plusieurs directions alors que la pression négative est maintenue. Avant que l'aiguille soit retirée de la masse, le piston est libéré, soulageant la pression négative sur la seringue **[Figure 2] (Cowell et Valenciano, 2014)**.

Une pression négative excessive doit être évitée pour ne pas rompre les vaisseaux environnants et ainsi causer une contamination sanguine périphérique.

Comme pour la méthode sans aspiration, il est recommandé de changer l'orientation de l'aiguille dans le but d'obtenir un échantillon représentatif de la lésion **(Raskin et Meyer, 2010)**.

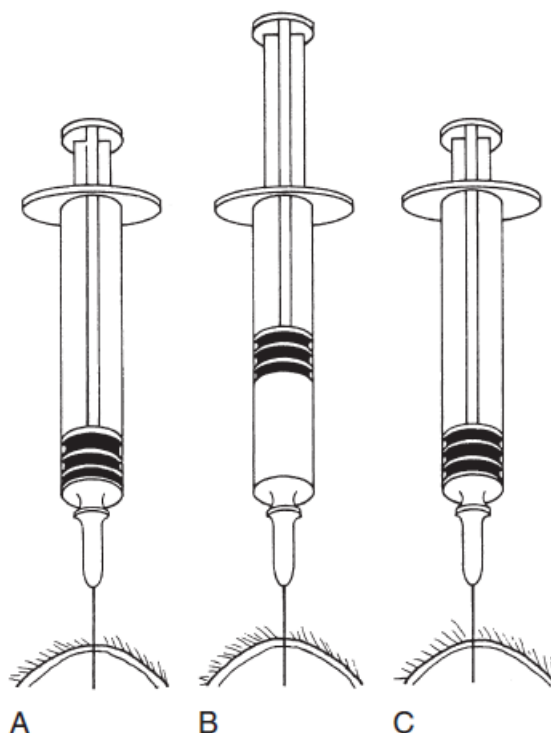
Après avoir échantillonné plusieurs zones, la pression négative est libérée, et l'aiguille est retirée de la masse et de peau **(Cowell et Valenciano, 2014)**.

Cette technique peut être modifiée en fixant une tubulure flexible entre l'aiguille et la seringue pour permettre une meilleure manipulation.

L'utilisation d'une courte tubulure permet un meilleur contrôle de l'aiguille durant la ponction cytologique **(Dunn, 2014 ; Pouletty, 2014)**.

Si une lésion est remplie de fluide, l'aspiration à l'aiguille fine est la méthode de prélèvement la plus appropriée. Un frottis direct du fluide doit être fait de telle sorte que la cellularité de l'échantillon peut être estimée à partir de la lame de microscope.

L'échantillon peut également être centrifugé, le surnageant éliminé et le culot cellulaire étalé sur une autre lame pour l'examen microscopique **(MacNeill, 2011)**.



A : Introduction de l'aiguille dans la masse ; B : Exertion d'une pression négative sur la seringue en retirant rapidement le piston ; C : Libération du piston et retraitement de l'aiguille

Figure 2 : Cytoponction à l'aiguille fine avec aspiration à partir d'une masse solide (Cowell et Valenciano, 2014)

1.2. Préparation d'une lame

1.2.1. Étalement

Après avoir effectué le prélèvement, ôter l'aiguille de la seringue, aspirer de l'air dans la seringue, replacer l'aiguille sur la seringue, pousser le piston de façon à ce que l'air pulsé passe par le fût de l'aiguille pour que le matériel cellulaire qu'il contient s'extirpe et tombe au centre d'une lame bien propre et dégraissée à l'alcool (**Rubiales, 2009**).

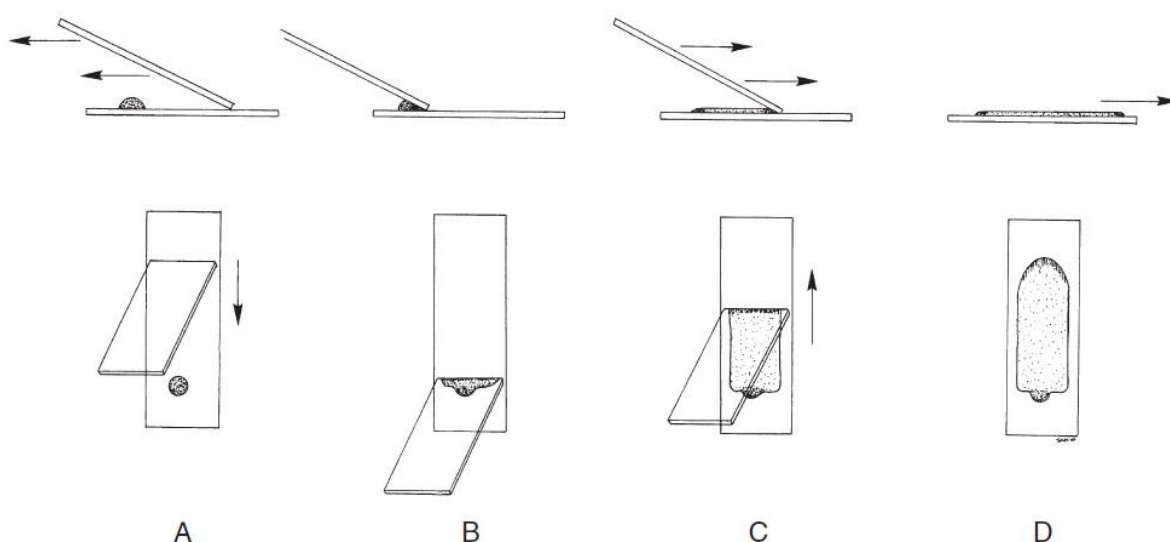
La goutte formée doit avoir la taille d'une tête d'épingle. Si elle est trop petite, les cellules pourraient se rompre lors de l'étalement et si elle est trop grosse, il devient difficile d'étaler finement les cellules sur la lame (**Baker et Lumsden, 2001**).

Ensuite, on doit étaler cette goutte sur la lame. Le but est de préparer une couche mince de cellules sans les rompre (**Cowell et Valenciano, 2014**).

▪ **Technique "d'étirement vers l'arrière suivi d'un étalement vers l'avant" :**

Méthode identique à celle utilisée pour le sang.

La lame mobile est placée à la surface de la lame fixe en formant un angle d'environ 30 à 45 degrés. Cette lame est tirée en arrière jusqu'à l'extrémité du matériel aspiré ce qui permet aux cellules et liquide de s'étaler latéralement par capillarité. Dès que les cellules et liquide ont atteint la moitié ou les 2/3 de la largeur de la lame fixe, la lame mobile est avancée d'un mouvement rapide et régulier pour étaler les cellules en fine couche [Figure 3] (Cowell et Valenciano, 2014).



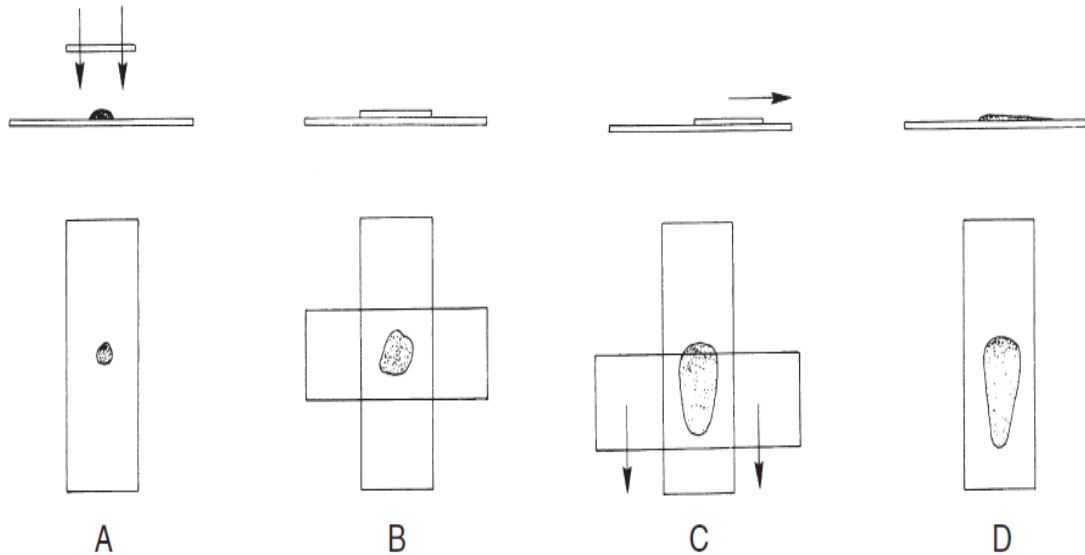
A : La lame mobile est placée à la surface de la lame fixe en formant un angle d'environ 30 à 45 degrés ; B : La lame mobile est tirée en arrière jusqu'à l'extrémité du matériel aspiré ; C, D : La lame mobile est avancée d'un mouvement rapide et régulier vers l'avant

Figure 3 : Technique "d'étirement vers l'arrière suivi d'un étalement vers l'avant" (Cowell et Valenciano, 2014)

▪ **Technique "d'écrasement ou de séparation" :**

Cette technique est recommandée lorsque la texture du prélèvement empêche une distribution uniforme des cellules (mucine en quantité important, présence de petites particules tissulaires).

Placer deux lames perpendiculairement l'une sur l'autre de telle sorte que seul le poids de la lame supérieure écrase les cellules lorsque les deux lames sont séparées en utilisant la force horizontale. Si l'étalement est mauvais, il faut alors ajouter une légère pression verticale pendant la séparation des lames [Figure 4] (Cowell et Valenciano, 2014).



A : Une goutte du prélèvement est placée au milieu de la lame fixe ; B : Une deuxième lame est placée perpendiculairement à la première ; C : Tirer la lame mobile sans avoir exercé des forces verticales ; D : La lame fixe prête

Figure 4 : Technique "d'écrasement ou de séparation" (Cowell et Valenciano, 2014)

Une ou plusieurs lames peuvent être réalisées en fonction de la quantité récoltée. Il est conseillé d'effectuer au moins trois étalements pour avoir les meilleures chances d'en avoir un correct et de permettre plusieurs colorations si besoin (Kuchler, 2002).

1.2.2. Fixation et coloration

1.2.2.1. Fixation

La fixation est réalisée en laissant les lames sécher à l'air par agitation manuelle ou avec un séchoir à cheveux (air froid). Le séchage doit être effectué rapidement pour obtenir des détails cytoplasmiques et nucléaires optimaux. Les prélèvements doivent être préservés de toute vapeur de formol qui génère des sous colorations sévères (Raskin et Meyer, 2010).

Certaines colorations nécessitent une « fixation humide » avec de l'éthanol comme le colorant de Papanicolaou, les colorants bichromes ou trichromes (**Baker et Lumsden, 2001**).

1.2.2.2. Colorations

Une ou plusieurs colorations peuvent être faites, on doit toujours conserver quelques lames non colorées en cas où il serait nécessaire d'effectuer des colorations spécifiques ou des immunomarquages.

1.2.2.2.1. Coloration de Romanowsky

C'est la coloration la plus souvent utilisée en cytologie de routine. Elle comprend plusieurs colorations dont celle de Wright, de Giemsa, de Wright-Giemsa, de May-Gründwald-Giemsa (MGG) ainsi que des colorations rapides développées pour être utilisées en clinique (**Baker et Lumsden, 2001**). Ce sont des colorations à base d'alcool à utiliser sur des cellules séchées à l'air. Les propriétés tinctoriales varient considérablement entre les différentes colorations de Romanowsky.

Coloration de May-Grünwald & Giemsa (M.G.G.)

C'est la coloration de base en hématologie et en cytopathologie vétérinaires. La méthode consiste à faire agir successivement deux colorants neutres. Le mélange de May-Grünwald (éosinate de bleu de méthylène) colore les structures basophiles en bleu (noyaux et certaines granulations cytoplasmiques) et les structures acidophiles en rouge tandis que le colorant de Giemsa (éosinate d'azur de méthylène) renforce la coloration des structures acidophiles et colore les granulations métachromatiques. Le temps de réalisation de cette méthode est d'environ 20 minutes.

Le frottis doit d'abord être recouvert par le May-Grünwald non dilué pendant 4 minutes. L'excès de colorant est éliminé par égouttage et rinçage rapide à l'eau courante. Enfin, la lame est immergée dans un bain de Giemsa R (dilué extemporanément au 1/20^{ème}) pendant 16 minutes puis rincée à l'eau courante.

1.2.2.2. Colorations bichromes et trichromes

Ces colorations sont appliquées sur des cellules qui ont immédiatement subi une fixation humide. La coloration de Papanicolaou n'est pas utilisée couramment en médecine vétérinaire car elle demande une préparation plus longue, elle est plus compliquée que la coloration MGG (**Fournel et coll., 1994**) et elle ne permet pas d'évaluer les caractéristiques tinctoriales du cytoplasme.

En revanche, elle accentue les détails nucléaires et permet de détecter précocement les aberrations morphologiques indiquant une dysplasie ou une néoplasie (**Raskin et Meyer, 2010**).

Notons qu'en cytopathologie humaine, on utilise plutôt en routine les colorations de Papanicolaou ou l'H.E. (**Cordonnier et coll., 2012**).

1.2.2.3. Colorations spéciales

Si la coloration de May-Grünwald & Giemsa n'a pas permis d'établir un diagnostic, on peut avoir recours à des colorations spéciales. On peut appliquer aux prélèvements cytopathologiques les colorations d'histochimie ou d'autres colorations (comme par exemple le Bleu de Crésyl Brillant pour mettre en évidence les réticulocytes).

1.3. Principes d'interprétations

1.3.1. Appréciation de la qualité du prélèvement et du fond du frottis

Tout d'abord, il faut observer au faible grossissement (grossissement X100, objectif 10) pour évaluer la qualité des prélèvements et leur représentativité. On balaye toutes les lames, sur toute leur surface.

On note la cellularité des échantillons, l'intégrité ou non des cellules et de leur cytoplasme, s'il y a des noyaux nus (cellules sans cytoplasme), si les cellules sont écrasées ou artéfactuellement étirées, si elles sont dispersées ou groupées, s'il existe ou non une hémodilution, si au sein des éventuels groupements la densité cellulaire permet ou non une analyse fine à l'échelon cellulaire (si l'étalement n'est pas trop épais).

Un mauvais prélèvement pourra être hémodilué, sans cellules, ou avec trop de cellules entassées ou abîmées ou avec trop de globules lipidiques ou trop de mucus. On vérifie également la qualité de la coloration et la normalité des affinités tinctoriales (**Rubiales, 2009**).

1.3.2. Démarche diagnostique

Le matériel cellulaire obtenu par une cytoponction ne donnera pas une représentation de l'architecture du tissu d'origine et l'identification et la caractérisation des cellules examinées ne seront pas toujours évidentes.

Néanmoins, la cytologie permet souvent une analyse plus fine et détaillée à l'échelon cellulaire, ce qui permet au cytopathologiste une démarche diagnostique comportant 3 étapes principales :

- *diagnostic de tumeur
- *diagnostic de l'histogenèse de la tumeur
- *diagnostic de bénignité/malignité

1.3.2.1. Diagnostic de tumeur

Déterminé par la présence d'un monomorphisme non inflammatoire d'une population cellulaire (**Rubiales, 2009**).

Il existe cependant certaines exceptions qu'on appelle : « les tumeurs polymorphes » :

- les mastocytomes (mastocytes et polynucléaires éosinophiles),
- les tumeurs ulcérées et surinfectées (cellules tumorales et polynucléaires neutrophiles),
- l'histiocytome en voie de rejet (histiocytes et lymphocytes),
- l'histiocytome fibreux malin (histiocytes et fibroblastes).

Dans cette étape, le cytopathologiste ne doit pas tomber dans les pièges de la cytologie, il faut bien connaître les limites de cette technique, à savoir :

- une tumeur est souvent limitée par une inflammation (inflammation péri-tumorale) : si les ponctions effectuées n'atteignent pas la tumeur mais sont faites dans ces aires inflammatoires, on aura des résultats faussement négatifs d'un processus inflammatoire alors qu'il s'agit d'un phénomène néoplasique,

- certaines tumeurs présentent un centre nécrotique (histiocytome fibreux malin, carcinomes bronchiques, grandes tumeurs à croissance rapide) dont la ponction peut donner des résultats faussement négatifs.

Dans certaines tumeurs à centre kystique (tumeurs basocellulaires félines) les cellules cancéreuses ne sont présentes qu'au niveau de la paroi des kystes, difficilement accessibles à la ponction. En contrepartie, il existe certains granulomes inflammatoires monomorphes pouvant mimer un processus tumoral, et certaines cellules inflammatoires, notamment les macrophages réactifs et les fibroblastes pouvant présenter des altérations qui simulent une néoplasie (**Mangnol et Marchal, 1998**).

1.3.2.2. Diagnostic de l'histogenèse de la tumeur

1.3.2.2.1. Examen du fond du frottis

Certains critères permettent au cytologiste de classer la tumeur parmi l'un des 3 grands groupes : tumeurs mésenchymateuses, tumeurs épithéliales ou tumeurs à cellules rondes.

1.3.2.2.1.1. Tumeurs à cellules rondes

Les cellules sont isolées. Elles sont plus ou moins rondes, bien étalées, de taille petite à moyenne. Elles sont abondantes. Si elles forment des amas, ils sont peu cohésifs. Il apparaît indispensable de repérer s'il existe ou non des granulations cytoplasmiques et quelle est leur couleur.

Exemples : mastocytomes [**Figure 5**], lymphomes, plasmocytomes extra-médullaires, histiocytome cutané canin, sarcome de Sticker, histiocytosarcome, histiocytose maligne (**Rubiales, 2009**).

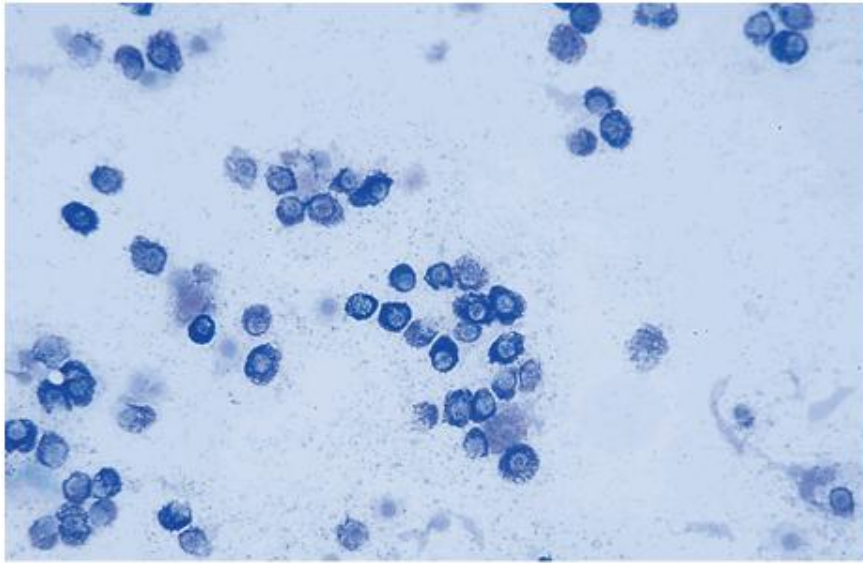


Figure 5 : Tumeur à cellules rondes : on note que les cellules sont isolées, bien étalées, plus ou moins rondes (mastocytome canin, Hémalun Eosine, GX100) (Rubiales, 2009)

1.3.2.2.1.2. Tumeurs épithéliales

Les cellules épithéliales sont jointives et forment des amas cohésifs bien organisés. Leur cellularité est élevée. Elles sont en général de grande taille, ont une forme ronde ou polyédrique et un cytoplasme bien délimité [Figure 6] (Rubiales, 2009).

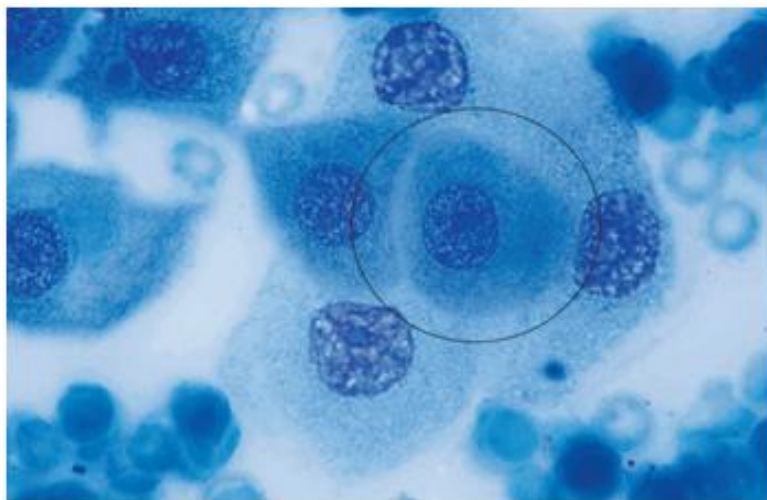


Figure 6 : Archétype de la cellule épithéliale : Notez la grande cellule au noyau rond central nettement uni-nucléolé et à cytoplasme rond à anguleux, plus ou moins géométrique à bords nets (Hémalun Eosine, GX1000) (Rubiales, 2009)

1.3.2.2.1.3. Tumeurs mésoenchymateuses

Les frottis sont peu cellulaires, présentent des cellules de taille variable, souvent isolées, à noyau et à cytoplasme plus ou moins fusiformes ou à cytoplasme étoilé. Les contours cytoplasmiques sont flous, mal délimités. Elles sont plus ou moins regroupées en amas étirés, peu organisés, le long d'axes multidirectionnels et parfois associées à une trame fibrillaire acidophile intercellulaire, plus ou moins abondante [Figure 7].

Exemple : sarcomes du complexe tumoral.

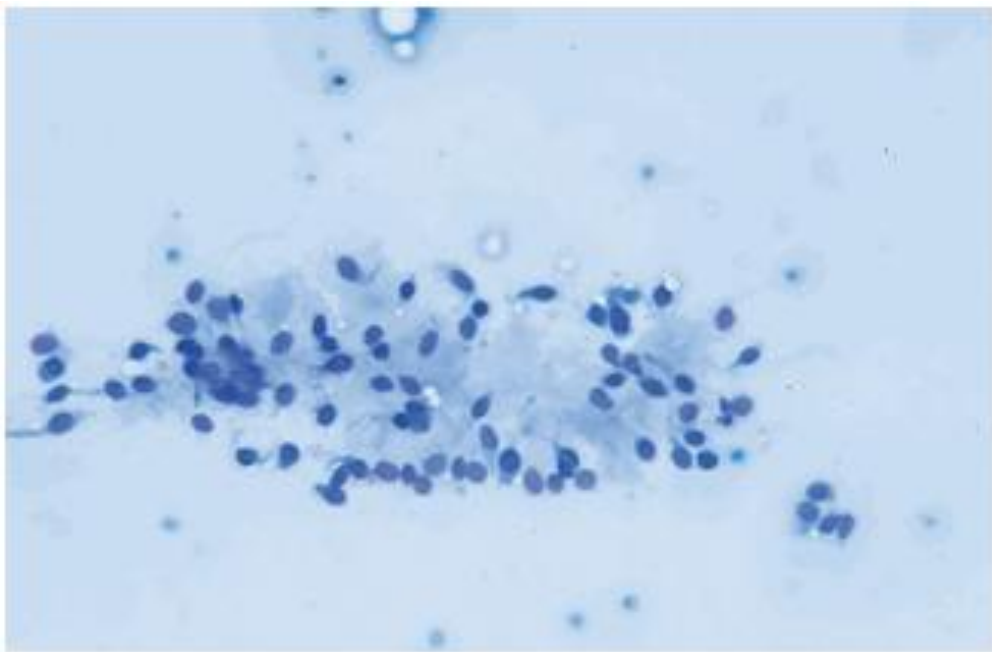


Figure 7 : Tumeur mésoenchymateuse : rares amas cellulaires, mal organisés, agencés en vagues multidirectionnelles, dit agencement « storiforme » (Hémalun Eosine, GX100, sarcome à cellules fusiformes, chien) (Rubiales, 2009)

Le tableau suivant **[Tableau 1]** résume les principaux critères de chaque groupe des tumeurs:

Tableau I : Classification d'une tumeur : épithéliale, mésenchymateuse ou à cellule ronde (Mangnol et Marchal, 1998)

Critères simplifiés	Origine cellulaire		
	Cellule épithéliale	Cellule mésenchymateuse	Cellule ronde
Cellularité	Elevée	Faible à modérée	Elevée
Constructions tissulaires	Cellules isolées et/ou agrégats à cellules jointives	Cellules isolées et/ou agrégats à cellules non jointives	Cellules isolées
Forme cellulaire	Ronde à polyédrique	Fusifforme	Ronde ou ovale
Limites cellulaires	Bords nets	Bords flous	Bords nets
Différenciations (vacuoles, granulations)	+	+	++
Basophilie cytoplasmique	Oui	Variable	Oui pour les tumeurs lymphoïdes
Produit de sécrétion autour des cellules	Parfois	Souvent	Non

1.3.2.2.2. Appréciation des détails cytologiques

Les forts grossissements vont permettre d'évaluer les détails cytologiques :

- Rapport nucléo-cytoplasmique élevé, faible
- Taille nucléaire variable, augmentée : anisocytose, macrocytose
- Hyperchromatisme ou euchromatisme nucléaire
- Répartition de la chromatine : distribution en mottes grossières, finement dispersée et uniforme, grenue, réticulée...
- Hyperchromatose marginale (irrégularité et épaissement de la bordure nucléaire)
- Nombre, taille et répartition des nucléoles
- Noyaux multiples, polylobés, à contours réguliers ou irréguliers (indentés)
- Cytoplasme : taille (variation de taille : anisocytose) ; couleur : basophile, éosinophile ; extension et forme : en couronne, polaire, excentré ; contenu : vacuolisé (grosses vacuoles en bague à chaton, petit espace clair archoplasmique juxtanucléaire, cytoplasme ballonné et distendu par des lipides), présence de granulations (pourpracées, rouges, violacées, acidophiles, gris-noirâtres, verdâtres, bleutées) et répartition.
- Existence de mitoses : nombre, normales ou asymétriques, multipolaires...

L'architecture, le fond du frottis et les détails cytologiques vont conduire au typage cellulaire : tumeur épithéliale, mésenchymateuse, lymphoïde, histiocytaire, mélanique, adipeuse, mastocytaire, plasmocytaire... **[Figure 8] (Rubiales, 2009).**

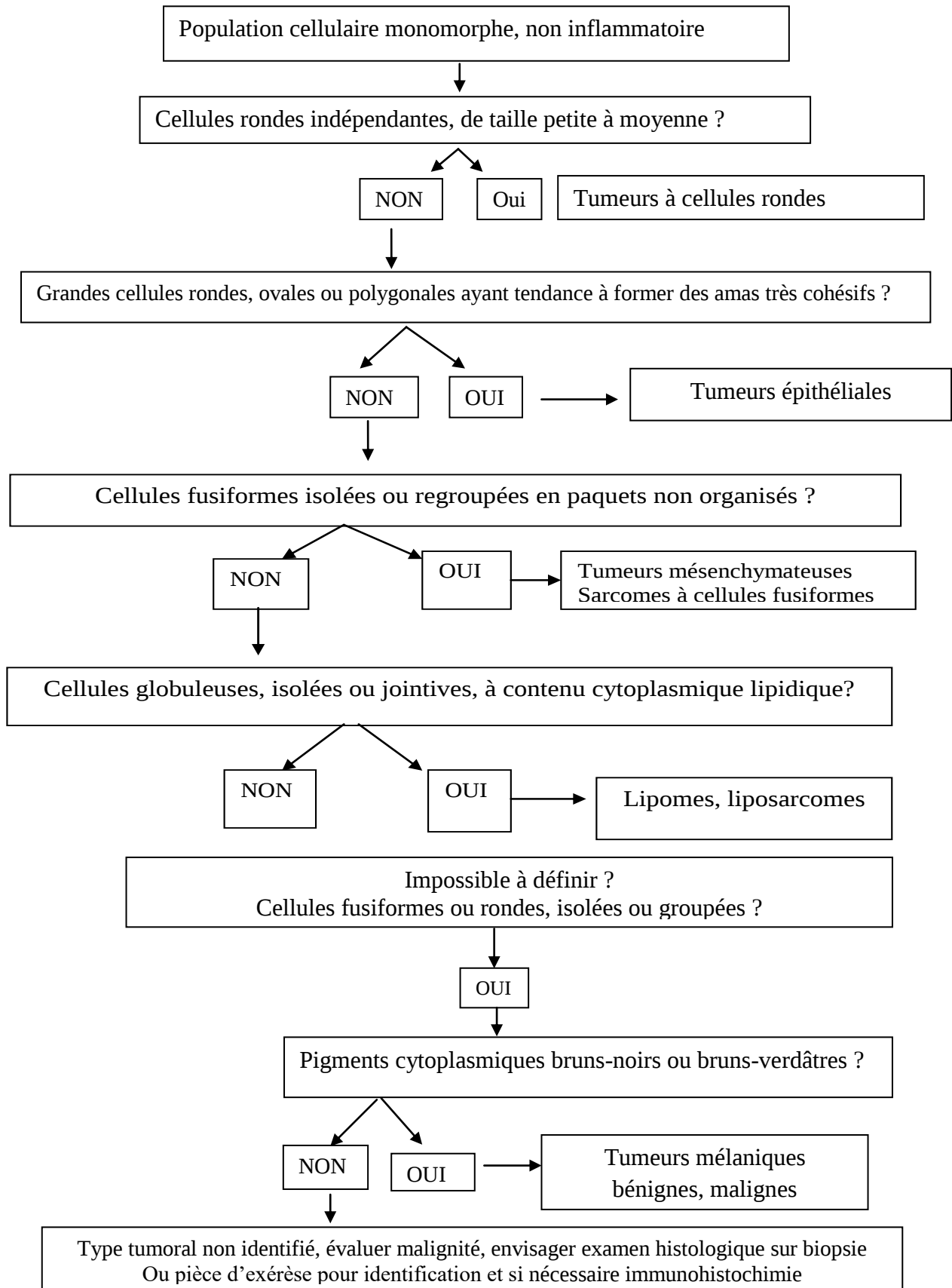


Figure 8 : Algorithme d'aide à l'évaluation des cytoponctions des tumeurs cutanées ou sous-cutanées (Rubiales, 2009)

1.3.2.3. Diagnostic de bénignité/malignité

En cytologie, il n'existe pas de critère de malignité absolu, hormis la mise en évidence de cellules métastatiques, étrangères au tissu cytoponctionné.

Toutefois, on repère des critères de malignité :

- À l'échelon de la population cellulaire :
 - Hypercellularité (pour les sarcomes surtout)
 - Amas irréguliers tridimensionnels
 - Pléomorphisme élevé

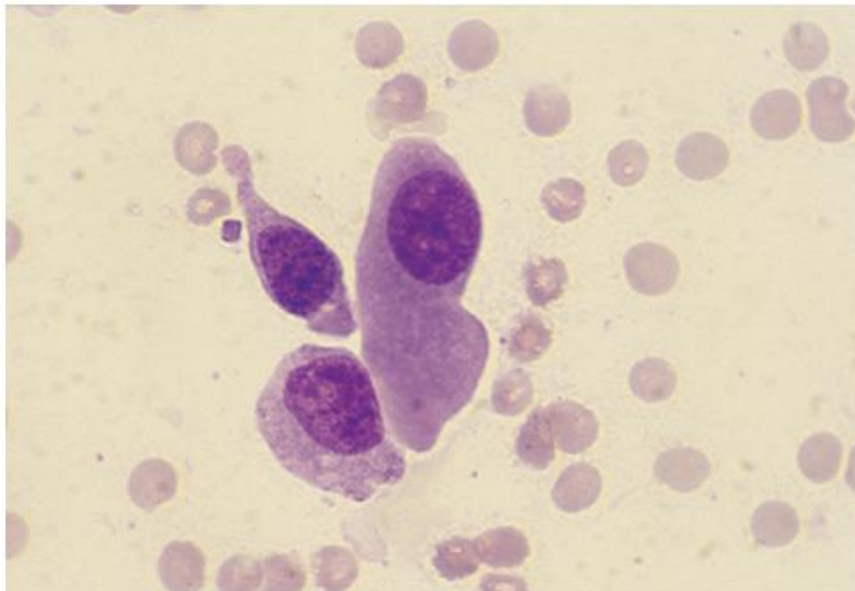


Figure 9 : Pléomorphisme cellulaire (carcinome chien) : notez la variabilité de la taille et de la forme critères de malignité cellulaire (Wight-Giemsa 1000x) (Raskin et Meyer, 2010)

- À l'échelon de la cellule :
 - Critères nucléaires :
 - Rapport nucléo-cytoplasmique élevé
 - Noyau volumineux (macrocyose)
 - Noyaux de taille variable (anisocaryose) au sein de la population cellulaire ou au sein d'une même cellule plurinucléée

- Hyperchromatisme nucléaire
- Chromatine distribuée irrégulièrement et grossière
- Epaissement et irrégularité de la bordure nucléaire
- Multinucléation ou macronucléole proéminent
- Nucléoles volumineux
- Nucléoles de taille variable
- Nucléoles à contours anguleux, en carte de géographie
- Multinucléation
- « télescopage nucléaire » : les noyaux d'une même cellule ou de deux cellules voisines se déforment, se surimpriment, s'entrechoquent ou se renfoncent mutuellement (« nuclear molding »)
- Mitoses nombreuses ou atypiques

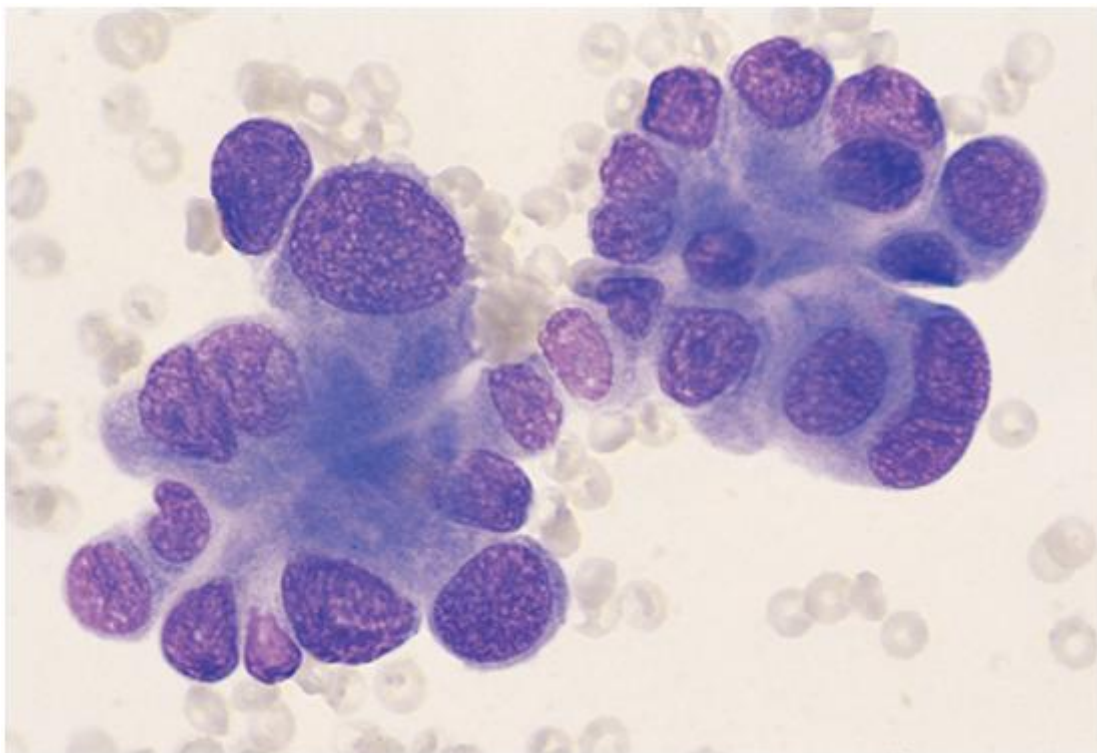


Figure 10 : Anisocytose, anisocaryose (adénocarcinome chien) : Notez la variation du rapport nucléo-cytoplasmique, l'anisocaryose, la binucléation et l'aspect grossier de la chromatine (May-Grünwald Giemsa 400x) (Raskin et Meyer, 2010)

▪ Critères cytoplasmiques :

- Hyperbasophilie cytoplasmique
- Perte des grains de sécrétion
- Augmentation de la vacuolisation

On s'appuiera principalement sur les critères nucléaires à l'échelon cellulaire, qui sont considérés comme les plus fiables.

• Gradation :

- La détection de 3 critères nucléaires de malignité ou plus, dans une grande proportion de cellules tumorales, sera fortement en faveur d'une tumeur maligne.

- L'identification de 1 à 3 critères nucléaires de malignité chez certaines cellules pourra correspondre soit à une tumeur bénigne, soit à une tumeur maligne et l'on devra avoir recours à un contrôle histologique sur pièce tissulaire biopsique ou d'exérèse chirurgicale pour avancer dans le diagnostic tumoral.

- Si aucun critère nucléaire de malignité n'est reconnu ou si quelques cellules expriment au plus 1 critère, la lésion est probablement bénigne.

Attention, certaines tumeurs malignes n'expriment pas ou peu de critères cytologiques de malignité (exemple : adénocarcinome des glandes muqueuses du sac anal) (**Rubiales, 2009**).

Un tissu avec de nombreux critères de malignité peut être considéré comme malin. En revanche, un tissu avec peu de modifications cytologiques ne peut pas être considéré comme bénin. « Bénin » est un diagnostic histologique et non cytologique.

Le cytopathologiste ne peut conclure avec certitude en la malignité d'une tumeur que lorsqu'il diagnostique une tumeur étant forcément maligne (lymphome) ou lorsqu'il met en évidence un phénomène métastatique dans le cadre d'un bilan d'extension (**Mangnol et coll., 1998**).

1.4. Efficacité diagnostique de l'examen cytologique des cytoponctions de masses cutanées et sous-cutanées

1.4.1. Données générales

Une étude a été faite par Wurm et coll. : pour 64 tumeurs ils ont comparés les résultats des diagnostics cytologiques et histologiques. 89% de ces tumeurs ont été révélées par la cytologie **(Wurm et coll., 1993)**.

La même étude a été réalisée sur 43 néoplasmes cutanés : 36 d'entre elles ont données des résultats positives à l'examen cytologique. Soit 83,7% des cas **(Bielecki et coll., 1997)**.

1.4.2. Données spécifiques

1.4.2.1. Cas des tumeurs épithéliales

Ils sont caractérisés par leurs dispositions en amas et par des critères de malignité bien marqués.

Les cellules sébacées ou kératinisées sont faciles à distinguer par contre il est parfois difficile de typer les autres cellules, d'où l'utilisation fréquente d'un terme générique : adénome, adénocarcinome **(Joland, 1990)**.

1.4.2.2. Cas des tumeurs conjonctives

Caractérisés par une cellularité faible et d'une variabilité morphologique des cellules.

Le diagnostic cytologique est souvent performant dans les cas des lipomes, des ostéosarcomes, fibrohistiocytes ou mélanomes bien différenciés, il est beaucoup plus délicat concernant les tumeurs telles que les chondrosarcomes et les mélanomes malins achromiques.

Dans le cas de tumeurs à cellules fusiformes, la cytologie permet généralement de déterminer le degré de malignité de la tumeur mais ne parvient généralement pas à déterminer le sous-type cellulaire, le cytopathologiste doit avoir recours à un immunomarquage **(Joland, 1990)**.

1.4.2.3. Cas des tumeurs à cellules rondes

L'examen cytologique est généralement fiable et souvent précis : le type cellulaire est très fréquemment suspecté. N'empêche que, dans certains cas, une analyse histologique ou une étude immunocytochimique doit compléter l'examen cytomorphologique (**Cast, 1994**).

1.4.2.4. Cas particuliers des tumeurs mammaires

Une étude, menée en 1986, par Allen et coll., a tenté de définir la validité des différents critères cytologiques. Il s'agit d'une comparaison des résultats histologiques et cytologiques (de 2 cytologistes différents) de 75 prélèvements effectués sur 33 chiennes atteintes de tumeurs mammaires. Les cytologies douteuses n'ont pas été prises en compte.

Les résultats obtenus par les 2 différents cytologistes de l'étude sont reportés dans le tableau 2 :

Tableau II : Comparaison de la fiabilité diagnostique de l'examen cytologique dans le cas de tumeurs mammaires chez la chienne faites par 2 cytologistes (Allen et coll., 1986)

	Cytologiste 1	Cytologiste 2
Faux positifs	3%	0%
Faux négatifs	22%	36%
Sensibilité	25%	17%
Spécificité	62%	49%
Valeur prédictive positive	90%	100%
Valeur prédictive négative	75%	59%
Valeur diagnostique	79%	66%

La valeur diagnostique et la valeur prédictive positive semblent significatives.

Cependant, il faut noter que les auteurs ont exclu, de leurs calculs, les cytologies non concluantes. Si on tient compte de ces valeurs, la valeur diagnostique chute à 44% pour le cytologiste 1 et 33% pour le cytologiste 2 dans l'étude menée par Allen et coll.

Ces études montrent donc qu'il est difficile d'établir un diagnostic et un pronostic fiable avec la cytologie pour les cancers mammaires de la chienne (**Allen et coll., 1986**).

En effet, certaines tumeurs mammaires sont des tumeurs mammaires hétérogènes, mêlant plusieurs contingents cellulaires de malignité variable. Des erreurs par défaut sont alors possibles si les cytoponctions sont peu représentatives de l'ensemble de la tumeur. Des erreurs par excès sont également possibles : en effet, il peut exister au sein de la tumeur de nombreuses cellules dysplasiques, parfois très atypiques, dont l'aspect est similaire à celui de cellules malignes.

L'examen cytologique, seul, ne suffit donc pas. Pour améliorer les valeurs diagnostique et pronostique, il apparaît nécessaire de la coupler à d'autres techniques (**Magnol et coll., 1998**).

1.4.2.5. Cas particulier des tumeurs périnéales

Représentés majoritairement par les adénomes des glandes périanales (aussi appelés circumanalomes). Ce sont des néoplasies très fréquentes et représentent la majorité des tumeurs périanales canines (58-96%).

La cytologie joue un rôle important pour déterminer l'origine de la lésion (glandes anales, mastocytes, tissu de soutien, ...) et peut même permettre de connaître le degré de malignité dans certains cas.

Les tumeurs des glandes périanales ont une apparence caractéristique à la cytologie, et peuvent, avec l'expérience, être différenciées des tumeurs des glandes apocrines des sacs anaux [**Figure 11**]. En cas de tumeur des glandes périanales, les cellules apparaissent cohésives et ressemblent à des hépatocytes [**Figure 12**] (**Crespo, 2015**).

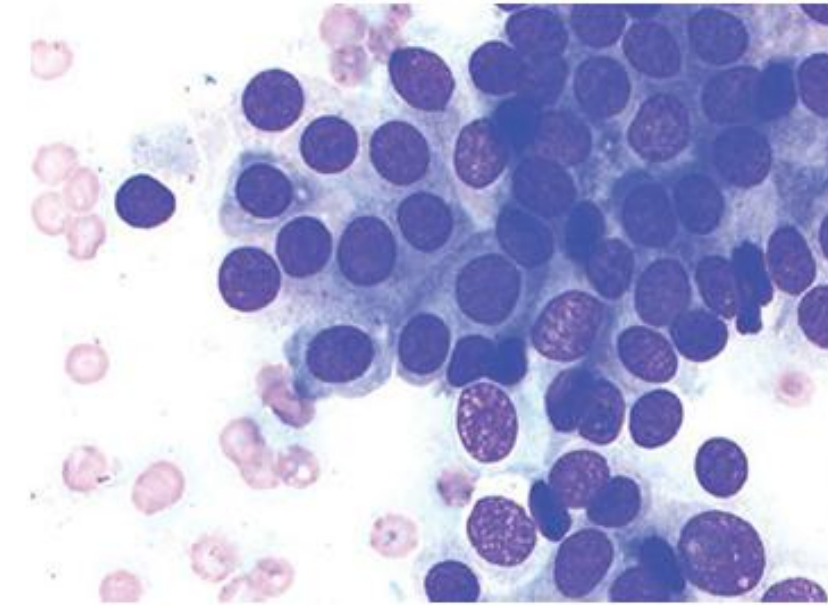


Figure 11 : Carcinome des glandes apocrines du sac anal : Notez l'aspect en grappes des cellules, la quantité modérée de cytoplasme basophile pâle et la variabilité du rapport nucléocytoplasmique (**May-Grünwald Giemsa 400x**) (**Dunn, 2014**)

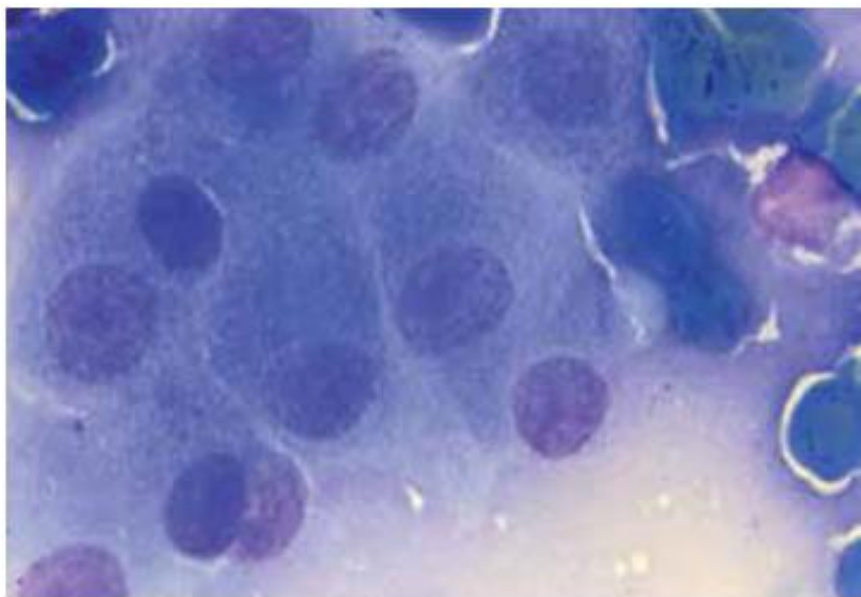


Figure 12 : Cytologie d'une ponction-aspiration à l'aiguille fine d'une tumeur périanale. Notez la présence d'un amas de cellules polygonales. Les cellules ont un aspect hépatoïde avec une grande quantité de cytoplasme mousseux, un noyau arrondi, et un ou plusieurs nucléoles proéminents. (**May-Grünwald Giemsa 1000x**) (**Crespo, 2015**)

2. Cytoponctions des nœuds lymphatiques

La cytoponction ganglionnaire est un examen complémentaire facile, rapide, fiable et justifié devant toute adénopathie suspecte (**Carter et coll., 1987 ; Delverdier et coll., 1988 ; Teske et coll., 1994a ; Fournel et coll., 1997a**). Elle est indiquée pour le dépistage des lymphomes malins et des métastases ganglionnaires.

2.1. Technique de prélèvement

Elle est identique à celle utilisée pour les tumeurs cutanées et sous-cutanées, cependant certaines précautions sont particulièrement importantes :

- Utiliser une aiguille de petit calibre (5 ou 6/10^{ème} de mm) car la cellularité des adénogrammes est toujours élevée
- Ne pas écraser les cellules lymphoïdes lors de l'étalement car elles sont très fragiles et se réduisent facilement à des noyaux nus, non interprétables
- Réaliser plusieurs ponctions sur un même ganglion, en diverses directions et diverses profondeurs, de façon à obtenir un échantillon représentatif de la population ganglionnaire globale
- Lors de polyadénomégalie, ponctionner au moins 2 ganglions, en évitant dans la mesure du possible des ganglions faisant l'objet de stimulations antigéniques répétées tels les nœuds lymphatiques drainant la cavité buccale
- Ponctionner la ou les tumeurs voisines si une ou plusieurs sont présentes
- Les métastases débutantes se localisent préférentiellement dans le sinus périphérique, sous-capsulaire, il faut donc réaliser quelques prélèvements superficiels lors de la ponction du ganglion (**Fournel et coll., 1994 ; Magnol et coll., 1998**).

2.2. Applications, intérêts et limites

2.2.1. Adénogrammes et dépistage de métastases ganglionnaires

Un ganglion hypertrophié ne signifie pas forcément la présence de métastases, ceci peut être le résultat d'une hyperplasie secondaire à un processus inflammatoire péri-tumoral et/ou à un processus nécrotique intra-tumoral. Inversement, la présence de métastases

ganglionnaires ne se traduit pas obligatoirement par une augmentation de la taille du ganglion **(Magnol et coll. 1998)**.

La cytologie présente un intérêt pour différencier un nœud lymphatique réactionnel d'un nœud lymphatique métastatique. Mais, le praticien doit se souvenir qu'en cas de micro métastase, la probabilité de prélever des cellules malignes reste faible et qu'en conséquence, un résultat négatif ne le dispense pas d'enlever le nœud lymphatique lors de la chirurgie et de le soumettre à l'examen histologique **(Magnol et coll., 1998)**.

Les principaux cancers lymphophiles en pratique sont les carcinomes, les mélanomes malins, les mastocytomes de grade II et III, certains sarcomes, ainsi que les leucémies aiguës myéloïdes et l'histiocytose maligne.

Les cellules métastatiques peuvent ne pas ressembler exactement aux cellules de la tumeur : elles peuvent être plus anaplasique cytologiquement, peuvent perdre la capacité à former des amas, ou peuvent présenter un nombre plus élevé de critères de malignité dans les cas de métastases avancées, l'adénogramme d'un nœud lymphatique étant complètement envahi par le néoplasme, sera constitué uniquement de nappes de cellules cancéreuses sans aucune population lymphoïde résiduelle. Le cytologiste ne pourra pas dans ce cas affirmer l'origine ganglionnaire du prélèvement **(Magnol et coll., 1998)**.

NB : les cellules métastatiques issus d'une tumeur primitive peuvent ne pas s'implanter dans le premier nœud lymphatique rencontré au cours de leurs trajet au-travers des voies lymphatiques, mais s'implanter dans un ganglion plus distal d'où l'intérêt de réaliser de ponctions dans plusieurs nœuds lymphatiques.

La qualité du diagnostic donné par le cytologiste est conditionnée par la représentativité, la richesse et la qualité de l'échantillon, supposant un bon repérage de la zone de ponction, un prélèvement de qualité et un étalage non excessif.

2.2.2. Adénogrammes et lymphomes

Dans le cadre de l'étude des lymphomes malins canins, l'adénogramme permet une approche diagnostique satisfaisante et une classification morphologique proche de celle obtenue après examen histologique.

La différence fondamentale entre cytologie et histologie est l'impossibilité pour la cytologie d'identifier le caractère architectural (folliculaire ou diffus) des lymphomes. Ce

critère peut être important pour le pronostic. En effet, les lymphomes folliculaires sont de moindre malignité que les lymphomes diffus. Cependant, il y a peu de lymphome folliculaire chez le chien (0 à 6% des cas de lymphomes) (**Carter et coll., 1987 ; Delverdier et coll., 1988 ; Teske et coll., 1994a ; Fournel et coll., 1997a**).

Dans le cas d'hypertrophie ganglionnaire le cytologiste est appelé à :

- Evaluer les proportions respectives des différentes populations cellulaires et repérer s'il existe des cellules anormales
- Distinguer entre une adénite, une hyperplasie lymphoïde et un lymphome
- S'il s'agit d'un lymphome, il doit le classer pour en déduire le pronostic et la stratégie thérapeutique correspondante.

2.2.2.1. Distinction entre adénite, hyperplasie lymphoïde et lymphome

L'adénite demeure rare dans l'espèce canine et présente un diagnostic cytologique relativement aisé, par contre la distinction entre hyperplasie et lymphome malin pose effectivement un véritable problème. On retiendra que les critères permettant de différencier l'un de l'autre seront pour l'adénite : l'hétérogénéité de la population, la plasmocytose massive à plasmocytes matures et normaux, le polymorphisme des blastes regroupés en amas et mêlés à des cellules centrofolliculaires et à des mitoses. Tandis que le monomorphisme de la population suspecte, la répétition des anomalies cytonucléaires, l'absence de plasmocytes et la dispersion des blastes orientera le diagnostic vers un lymphome malin (**Fournel et coll., 1994**).

Néanmoins, chez le chien, il s'avère particulièrement délicat de distinguer entre une réaction hyperplasique et lymphome malin (LM) dans les cas suivants :

- Hyperplasie des zones T/LM à petites cellules pléomorphes
- Hyperplasie folliculaire/LM à cellules centrofolliculaires débutant
- Hyperplasie immunoblastique/LM immunoblastique
- Cytologie ganglionnaire « normale »/LM lymphocytaire débutant
- Hyperplasie plasmocytaire massive/LM lymphoplasmocytaire, plasmocytome ganglionnaire, métastase ganglionnaire d'un myélome multiple

- Hyperplasie des zones marginales massive/LM à moyennes cellules macronucléolées **(Fournel et coll., 1994)**.

Malgré ces difficultés, la cytologie est un examen fiable, dont le pouvoir diagnostique est estimé à 90% lorsque l'échantillon est de bonne qualité **(Sapierzyński et Micuń, 2009)**.

2.2.2.2. Classification des lymphomes malins

En médecine humaine, les différentes classifications élaborées au fil du temps visent à regrouper les lymphomes en entités pathologiques bien définies et homogènes, afin de proposer pour chaque sous type un pronostic et prévoir la réponse thérapeutique. Pour répondre à ces objectifs, les classifications doivent être reproductibles, se justifier cliniquement et doivent pouvoir s'adapter à la découverte des nouveaux types de lymphome qu'il faudra intégrer **(Isaacson, 2000)**.

Chez les animaux et en particulier chez le chien, la classification des lymphomes s'est appuyée sur les classifications humaines existantes puisque les lymphomes malins canins présentent des similitudes avec les lymphomes non hodgkiniens humains.

Les classifications des lymphomes malins canins semblent en bien des points superposables à celles de l'homme mais les lymphomes canins présentent quelques caractéristiques spécifiques :

- Les lymphomes canins sont exceptionnellement de type folliculaire, et les rares cas rencontrés ne sont généralement pas de bon pronostic, alors que ce type représente jusqu'à 30% des cas chez l'homme **(Fournel et coll., 1997a)**.

- Les lymphomes de bas grade sont bien moins fréquents que chez l'homme et ne représentent qu'à peine 30% des cas de lymphomes canins, tous sous-types confondus **(Pastor et coll., 2009)**.

- Certains sous-types morphologiques sont propres à l'espèce canine et ne sont pas retrouvés chez l'homme, c'est par exemple le cas des lymphomes à cellules moyennes macronucléolées ou les lymphomes de haut grade à cellules plasmocytoides **(Fournel et coll., 1997a)**

A de nombreuses reprises, les lymphomes canins ont été classés suivant la classification de Kiel qui se base surtout sur des critères cytologiques. Selon cette

classification, la majorité des lymphomes canins sont de haut grade (**Delvrier et coll., 1988 ; Teske et coll., 1994b ; Fournel et coll., 1997a**).

Tableau III : Répartition classification des lymphomes selon la classification de Kiel adaptée aux lymphomes canins (Delverdier et coll., 1988 ; Teske et coll., 1994 ; Fournel-Fleury et coll., 1997a)

Grade	Sous-type cellulaire	Delverdier (n=52)	Teske (n=95)	Fournel (n=92)
Bas grade	Mycosis fongoïdes	26,92%	29,5%	26,1%
	Lymphocytaire			
	Lymphoplasmocytaire/cytoïde			
	Variante cellules claires			
	Variante type centrocytaire			
	Variante type prolymphocytaire			
	Centrocytaire			
	Centrocytocytoïdique			
	Cellules moyennes macronucléolées			
Haut grade	Centroblastique monomorphe	73,08%	70,5%	73,9%
	Centroblastique polymorphe			
	Immunoblastique			
	Lymphoblastique			
	Petites cellules inclassables			
	Type Burkitt			
	Plasmocytoides			
	Pléomorphes mixte			
	Pléomorphes à grandes cellules			
	Grandes cellules anaplasiques			

Une classification de Kiel actualisée apparaît pour l'instant comme la plus adaptée au modèle canin, car elle se base sur la morphologie, l'immunophénotype et la cellule d'origine pour classer les lymphomes. La cytologie prend une place importante dans cette classification, permettant une subdivision plus fine des lymphomes et ayant l'avantage d'être bien

développée et facilement applicable en médecine canine. Depuis 2004, une étape a été franchie car il a clairement été montré que cette classification a un réel intérêt concernant le pronostic **(Ponce et coll., 2004)**.

En effet, sous chimiothérapie, les lymphomes B et T présentent des durées de survie significativement différentes, de plus cette étude montre clairement des différences significatives de pronostic entre les différents sous types. Ceci justifie ainsi l'utilisation, en pratique, d'une classification clinique comme chez l'homme **(Ponce et coll., 2004)**.

Le manque d'outils de biologie moléculaire chez le chien n'autorise pas encore une précision dans la classification des lymphomes malins comme chez l'homme. Néanmoins, l'avancée réalisée ces dernières années a permis de collecter des données cliniques permettant de fonder la classification des lymphomes canins selon des critères clinico-morphologiques. A présent l'évolution vers une classification qui fait intégrer dans un premier temps davantage de données cliniques, puis progressivement des données génétiques et moléculaires est en cours.

3. Cytoponctions échoguidées

3.1. Repérage du site et préparation

3.1.1. Repérage du site

Le site de prélèvement est repéré dans un premier temps par un examen échographique classique. La sonde doit être placée de façon que le trajet de l'aiguille soit le plus court possible, que son insertion dans l'organe soit facile et surtout, qu'il n'y ait pas d'organe interposé **(Mai, 2001)**.

3.1.2. Préparation du site

La zone correspondant au lieu de prélèvement est nettoyée et désinfectée chirurgicalement à l'aide d'alcool et de solutions iodées **(Mai, 2001)**.

Il est préférable de limiter l'utilisation de gel échographique qui peut générer des artéfacts cytologiques s'il se dépose accidentellement sur les prélèvements **(Menard et Papageorges, 1995)**.

On peut utiliser l'alcool comme agent de contact au lieu du gel (**Cowell et Valenciano, 2014**).

3.2. Ponction

3.2.1. Matériel utilisé

Une sonde sectorielle ou linéaire peut être employée pour effectuer l'échographie. La sonde linéaire est préférable lorsque la lésion est très superficielle car la sonde sectorielle engendre des artéfacts de champ proche néfastes pour l'image (**Mai, 2001**).

Le gel échographique est retiré car il peut générer des artéfacts cytologiques s'il se dépose accidentellement sur le prélèvement (**Mai, 2001**).

Le prélèvement peut être réalisé avec (**Besso, 1996**) ou sans guide (**Menard et Papageorges, 1995**). Ce guide est une pièce mécanique qui se fixe sur la sonde de l'échographe et contient un conduit de quelques millimètres de diamètre permettant le passage de l'aiguille. Une longueur de conduit de 2 à 3 cm est nécessaire pour assurer la constance de la trajectoire de l'aiguille. Le trajet théorique de l'aiguille est alors matérialisé par une droite en pointillés sur l'écran de l'échographe, ce qui facilite la visualisation de l'aiguille. Des aiguilles fines de 20 à 22G sont utilisées (**Besso, 1996**).

Des aiguilles spinales biseautées peuvent aussi être utilisées (**Wood et coll., 1998**).

L'aiguille est connectée directement à une seringue stérile de 10 ml ou elle peut être connectée à une tubulure elle-même connectée à une seringue stérile (**Mai, 2001**).

3.2.2. Différentes techniques

3.2.2.1. Cytoponction avec guide

Lors de prélèvement avec guide, l'aiguille se trouvant obligatoirement dans le plan de coupe ultrasonore de la sonde, sa visualisation est aisée. Cependant, ce guide peut limiter l'accessibilité à la lésion dans certaines circonstances (en raison de l'encombrement de la pièce et de la faible latitude de mouvement autorisée) [**Photo 1**].



Photo 1 : Cytoponction sous guidance échographique avec guide (Raskin et Meyer, 2010)

3.2.2.2. Cytoponction sans guide

Cette technique autorise un plus grand choix de voies d'abord et semble limiter les lacérations tissulaires **[Photo 2] (Pennick et Finn-bodner, 1998)**.

L'aiguille peut être introduite à une distance variable de la sonde mais la visualisation de celle-ci est maximale lorsqu'elle se rapproche de la perpendiculaire à la sonde.

La plupart des cytoponctions se faisant à main levée, l'aiguille est enfoncée à travers la peau en direction de la zone visée, en essayant de la maintenir le plus obliquement possible au faisceau ultrasonore. Afin de faciliter le repérage de l'aiguille sur l'écran, différentes astuces peuvent être utilisées :

- Le biseau doit être dirigé vers le haut (en effet, son angulation le rend particulièrement visible)
- Le manipulateur peut effectuer de petits mouvements d'avant en arrière avec l'aiguille

- Avant de pénétrer la peau, le fait de remplir le corps de la seringue d'air et de le vider plusieurs fois de suite permet de faire rentrer un peu d'air dans l'aiguille, ce qui facilite sa visualisation

- Eventuellement, il est possible d'injecter de petites quantités d'air ou de liquide (le liquide sera préféré à l'air car ce dernier génère des artéfacts gênants pour la suite des opérations) (**Smith, 1989 ; Menard et Papageorges, 1995 ; Saunders, 1996**).

Certains auteurs utilisent une aiguille directement montée sur la seringue (**Wood et coll., 1998 ; Mai, 2001**).

D'autres préfèrent intercaler une tubulure entre l'aiguille et la seringue estimant que la manipulation est alors plus facile et précise (**Papageorges et coll., 1988 ; Menard et Papageorges, 1997**).



Photo 2 : Cytoponction sous guidance échographique sans guide (Raskin et Meyer, 2010)

3.3. Applications pratiques et efficacité diagnostique

3.3.1. Données générales

Certaines études, en humaine ainsi qu'en médecine vétérinaire, ont cherché à démontrer la fiabilité des cytoponctions échoguidées.

En ce qui concerne les tumeurs, la littérature humaine rapporte une efficacité de 82 à 91% pour détecter une tumeur grâce à une cytoponction (**Menard et coll., 1986 ; Papageorges et coll., 1988**). Dans le domaine vétérinaire, une étude sur 102 cas (**Menard et coll., 1986**) a révélé une réussite de 69%, avec un taux de faux positifs de l'ordre de 1%. En particulier, il semblerait qu'il y ait une bonne corrélation entre les résultats cytologiques et histologiques lors de lymphome (**Teske et Van Heerde, 1996**).

Une étude portant sur 70 cas chez des carnivores, a abouti à une corrélation cytologie-biopsie de 84,3%. Il y avait 15,7% de faux négatifs. Ces erreurs s'expliquent par une pauvreté cellulaire lors du prélèvement, ou bien par la réaction inflammatoire qui entoure la tumeur. (**Léveillé et coll., 1993**).

3.3.2. Exemples d'organes

3.3.2.1. Tube digestif

Une étude menée par Crystal et coll. pour rechercher la fiabilité des cytoponctions échoguidées dans le tube digestif, en comparant leurs résultats obtenus avec les résultats histologiques. Leur diagnostic était correct dans 4 cas sur 10 soit dans 40% des cas (**Crystal et coll., 1993**).

En médecine humaine au contraire, la même étude a été réalisée sur 128 patients. Les 128 procédures de cytoponction échoguidée ont donnés 115 résultats conformes à l'histologie soit une fiabilité de 89,9% (**Pedersen et coll., 1984**).

Pennick et coll. ont rapporté les conclusions de cytoponctions et des biopsies réalisés sur 22 chats ayant un lymphome. La sensibilité de la cytoponction était de 90%.

Au cours de la même étude, une lésion maligne était identifiée comme telle dans 5 cas sur 7, et il semblait que les lésions stomacales soient plus facilement diagnostiquées (sachant que 4 estomacs sur 5 étaient envahis par un processus lymphomateux). Ces auteurs ont donc conclu à une assez grande facilité de diagnostiquer un lymphome digestif par cytoponction.

Ils ont également abouti à la conclusion que l'épaisseur de lésion n'est pas un facteur conditionnant la réussite puisque les lésions de l'intestin grêle étaient en général bien plus épaisses que celles de l'estomac, et ont pourtant donné de moins bons résultats (**Pennick et coll., 1994**).

3.3.2.2. Foie

Une étude sur 307 cas a montré que, lors de cytoponction du foie, un résultat est obtenu dans 95% des cas. Cependant, ces chiffres n'ont pas été confirmés par des biopsies **(Ménard et Papageorges, 1996)**.

Dans une autre étude menée sur 20 cas, Kristensen et coll. ont obtenu un diagnostic cytologique pour 16 cas soit 80%, mais ces résultats n'ont été confirmés par la biopsie que pour deux d'entre eux : ces 2 cas correspondaient à des pathologies diffuses. Au contraire, lors de lésion focale ou multifocale, ou lors de processus pathologique qui ne desquame pas, la cytologie est non concluante **(Kristensen et coll., 1990)**.

En médecine humaine, la cytologie hépatique présente une sensibilité de 90 à 95%, et semble aussi fiable que la biopsie **(Montali et coll., 1982)**.

3.3.2.3. Rate

Les indications de la cytologie splénique sont l'évaluation d'un nodule ou d'une masse, d'une splénomégalie ou d'un parenchyme anormal d'après l'échographie, ainsi que la caractérisation d'un désordre hématologique **(Christopher, 2003)**.

D'après certains auteurs, l'aspiration à l'aiguille fine serait plus indiquée pour des splénomégalies généralisées, la cytologie concluant au diagnostic plus facilement **(Neer, 1996)**.

Les néoplasies sont facilement détectés à la cytologie. Cela est dû à la capacité d'exfoliation des cellules sanguines. Les tumeurs mésoenchymateuses et sarcomateuses exfolient peu ce qui rend le diagnostic plus difficile **(Christopher, 2003)**.

3.3.2.4. Reins

Les néoplasmes rénaux sont rares chez les chiens. Ils occupent seulement 0,3 à 1,7% de tous les néoplasmes pour cette espèce. De ces néoplasmes primaires, la plupart sont des carcinomes rénaux. A la différence de chez l'homme, plus de 90% des tumeurs rénales primaires chez les chiens et les chats sont malins **(Lappin et Latimer, 1988)**.

4. Cytoponction du parenchyme pulmonaire

L'aspiration transthoracique à l'aiguille fine est une technique utile pour l'enquête de lésions discrètes et, dans une moindre mesure, des lésions diffuses interstitielles, en particulier si la masse est située de manière adjacente à la paroi thoracique bien qu'il puisse potentiellement donner lieu à plus de complications, notamment lacération pulmonaire, des hémorragies et pneumothorax.

4.1. Technique de prélèvement

La technique peut être réalisée avec l'animal debout ou en décubitus sternal (**Dunn, 2014**) de préférence sous guidage échographique (**Clercx et coll., 1996**).

La sédation peut être nécessaire si l'animal a mal ou présente des signes de détresse respiratoire sévère.

Si l'affection pulmonaire est localisée la ponction se fera au lieu de la lésion, mais dans le cas d'une affection pulmonaire généralisée on ponctionnera de préférence du côté droit, entre la 7^{ème} et la 9^{ème} côte, au 2/3 de la distance entre le sternum et la colonne, contre le bord cranial de la côte (**Gallois, 1993**).

Un anesthésique local peut être injecté dans le bord antérieur de l'espace intercostal caudal immédiatement à la nervure (**Dunn, 2014**).

Les lésions à proximité de la paroi thoracique peuvent être aspirées à l'aide d'une aiguille 22-25 G × 5 cm fixée à une seringue de 5 ml ou 10 ml. Les lésions plus profondes peuvent nécessiter une aiguille spinale 22 G pour atteindre le site. L'aiguille est insérée à travers l'espace costochondral.

À un angle de 90 ° par rapport à la paroi thoracique. Une fois introduite dans la cavité thoracique, la pression négative est appliquée à la seringue et l'aiguille est avancée dans la lésion. Les chances d'obtenir un échantillon suffisant sont maximisées si l'aiguille est retirée et avancé deux ou trois fois dans une direction légèrement différente maintenir une pression négative à tout moment (**Dunn, 2014**).

Selon d'autres auteurs, il ne faut jamais changer l'orientation de l'aiguille pour ne pas dilacérer le tissu pulmonaire, mais exercer de petits mouvements de va-et-vient. L'aiguille est retirée en maintenant une pression négative jusqu'à sa sortie du parenchyme pulmonaire (**Gallois, 1993**).

L'aiguille est ensuite retirée et une pression négative est libérée juste avant que l'aiguille sort de la cavité thoracique. Seule une petite quantité de matière peut être présente dans l'aiguille ou le moyeu de la seringue, et ceci est expulsé sur une lame de verre. Un frottis est préparé de la manière habituelle (**Dunn, 2014**).

4.2. Indications et contre indications

La cytoponction est indiquée lors de lésions focales et accessibles, cependant la ponction de lésions diffuses présente également un intérêt. Elle permet, dans un premier temps de faire un diagnostic différentiel entre lésions inflammatoires et tumorales.

La principale contre-indication est un trouble de l'hémostase, où le risque de complications secondaires peut être significativement augmenté. Concernant les masses pulmonaires, la ponction intrathoracique est déconseillée lors de toux incontrôlable en raison du risque de lacération du parenchyme pulmonaire ou de pneumothorax et lors d'hypertension pulmonaire pour le risque d'hémorragie intrapulmonaire ou pleurale. Mais dans la majorité des cas, les complications sont quasi-nulles (**Rivière, 2012**).

En médecine humaine, 84% de diagnostics corrects sont obtenus par la cytologie (**Yang et coll., 1990**).

Wood et coll. reportent les résultats des cytoponctions pulmonaires sur 19 animaux, complétées par des biopsies. Dans 10 cas sur 11, ils ont correctement identifié une tumeur pulmonaire (avec une valeur prédictive positive de 100%) et dans 5 cas sur 6, ils ont correctement identifié une blastomycose (avec une valeur prédictive positive de 100%). Les résultats sont alors excellents (**Wood et coll., 1998**).

Ogilvie et coll. ont réalisé une étude sur 210 chiens dans le but de classifier les tumeurs pulmonaires primitives. Parmi ces 210 cas, ils ont effectué des cytoponctions pulmonaires transthoraciques pour 66 chiens. Le diagnostic de néoplasie a été évoqué chez 52 parmi les 66 chiens soit 79% des cas (**Ogilvie, 1989**).

La différenciation cytologique des différentes origines de la néoplasie (bronchique, bronchiolaire, alvéolaire) ne peut pas être faite. De nombreux carcinomes métastasent au parenchyme pulmonaire. Les préparations cytologiques de carcinomes primaires et métastatiques sont similaires et ils ne peuvent pas être définitivement distingués par l'évaluation cytologique seule. Seul le carcinome épidermoïde possède des images

caractéristiques qui autorisent une identification lors de l'analyse cytologique (**Muller et Guaguère, 2006**).

L'examen cytologique permet la plupart du temps de poser le diagnostic de tumeur et d'en établir l'origine. Cependant, son principal inconvénient est qu'il ne fournit pas d'information sur l'architecture du tissu étudié et sur le degré d'infiltration des tissus adjacents, contrairement à l'histologie (**Morris et Dobson, 2001**).

5. Cytologie de la moelle osseuse (myélogramme)

L'examen cytologique d'un myélogramme est le moyen diagnostique indispensable pour le diagnostic des leucémies et des états préleucémiques, ceux-ci trouvant leur origine dans la moelle osseuse. cependant il permet également d'évaluer l'envahissement de la moelle osseuse par un processus métastatique dans le cadre d'un bilan d'extension, ou de caractériser ou de surveiller une insuffisance médullaire paranéoplasique ou consécutive à une chimiothérapie.

5.1. Réalisation du myélogramme

5.1.1. Sites de prélèvement

La ponction de moelle osseuse hématopoïétique doit être réalisée dans l'os spongieux. Les sites de prélèvement varient en fonction de la taille de l'animal. Ainsi, les lieux d'élection possibles sont les suivants :

- La crête iliaque chez les grands chiens : ce prélèvement fournit les résultats les plus réguliers (**Magnol et coll., 1998**).
- Têtes de côte et jonctions chondrocostales (7^{ème} à 9^{ème} côtes) chez les chiens de grande race.
- Du 3^{ème} au 5^{ème} sternèbre chez des jeunes chiens de grande taille.
- Fosse trochantérienne pour les chiens de petite race et les animaux jeunes n'ayant pas atteint leur taille adulte.
- La tête humérale (**Magnol et coll., 1998 ; Grindem et coll., 2002 ; Tyler et coll., 2006**).

La grande cellularité des prélèvements qu'ils permettent, la facilité de ponctionner à ces niveaux et enfin le moindre risque des complications associées sont les trois raisons pour lesquels ces sites ont été choisis **(Grindem et coll., 2002)**.

Il est toujours préférable de ponctionner plusieurs sites **(Thrall, 1981)**.

5.1.2. Technique de prélèvement

La ponction de moelle osseuse ne nécessite pas d'anesthésie générale chez le chien, seulement une sédation et une anesthésie locale **(Magnol et coll., 1998)**.

L'animal muselé est positionné en décubitus sternal voire en position assise pour un prélèvement dans la crête iliaque ou en décubitus latéral pour une ponction dans la fosse trochantérienne **(Tyler et coll., 2006)**.

La zone d'élection est tondue et préparée de manière chirurgicale **(Grindem et coll., 2002)**.

Tout matériel utilisé pour cette ponction doit être stérile **(Magnol et coll., 1998)**. 1,5 à 3 ml d'anesthésique local sont injectés dans la peau, les tissus sous-cutanés et sous le périoste au niveau du site de cytoponction **(Tyler et coll., 2006)**.

Après avoir repéré le site de ponction par palpation digitée, la peau est incisée à la lame de scalpel sur un centimètre et les tissus mous sous-cutanés sont disséqués jusqu'au périoste **(Magnol et coll., 1998)**.

Un trocart de Mallarmé (18/10^{ème}, 15/10^{ème}) est implanté (sans enfoncement) sur la surface selon l'angulation optimum : pour la crête iliaque, l'angle est de 45° vers l'avant, médialement pour éviter la fosse iliaque **(Magnol et coll., 1998)**.

Puis une pression modérée est appliquée et l'ensemble trocart-mandrin est enfoncé progressivement, sans changement d'axe, en tournant le trocart dans le sens anti-horaire **(Tyler et coll., 2006)**.

Le mandrin est ensuite retiré et une seringue de 10 ml à usage unique montée est solidarisée au trocart. Plusieurs aspirations brutales sont alors effectuées pour décoller les grains de moelle, jusqu'à l'apparition de quelques gouttes de moelle **(Magnol et coll., 1998)**.

Lors d'échec à la première tentative, on peut retirer la seringue, renfoncer le mandrin et avancer encore un peu le trocart **(Tyler et coll., 2006)**.

Une fois on a obtenu le prélèvement recherché, l'ensemble trocart-seringue est retiré doucement par mouvements de rotation et la peau doit être suturée **(Magnol et coll., 1998)**.

5.1.3. Préparation des lames

La seringue contenant la moelle est ensuite désolidarisée du trocart. Le matériel médullaire est expulsé délicatement sur les lames **(Magnol et coll., 1998)**.

Les frottis doivent être préparés dans les 30 secondes qui suivent car la moelle a tendance à coaguler **(Tyler et coll., 2006)**.

L'étalement se fait par étirement comme pour un frottis sanguin : correctement effectué, l'étalement de moelle a l'aspect d'une lame de sang piquetée de trous **(Magnol et coll., 1998)**. Le séchage des lames a lieu à l'air libre **(Tyler et coll., 2006)**.

5.2. Intérêts et applications

Sauf exception, le myélogramme précède toujours la biopsie ostéomédullaire. La biopsie ostéomédullaire est susceptible de compléter l'examen cytologique de la moelle osseuse hématopoïétique et de fournir des données pronostiques quand le myélogramme aboutit au diagnostic de syndrome myélodysplasique et/ou myéloprolifératif chronique, d'infiltration leucémique ou lymphomateuse **(Le Foll, 2011)**.

L'examen cytologique de la moelle osseuse hématopoïétique repose sur la morphologie des cellules, la proportion respective des différentes lignées cellulaires, la présence de cellules inflammatoires et la découverte de cellules métastatiques.

Un prélèvement interprétable nécessite des frottis qui permettent d'évaluer la cellularité globale de la moelle. Un frottis de bonne qualité renferme plusieurs grains de moelle (amas cellulaires mêlant des adipocytes et des cellules hématopoïétiques) **[Figure 13]**.

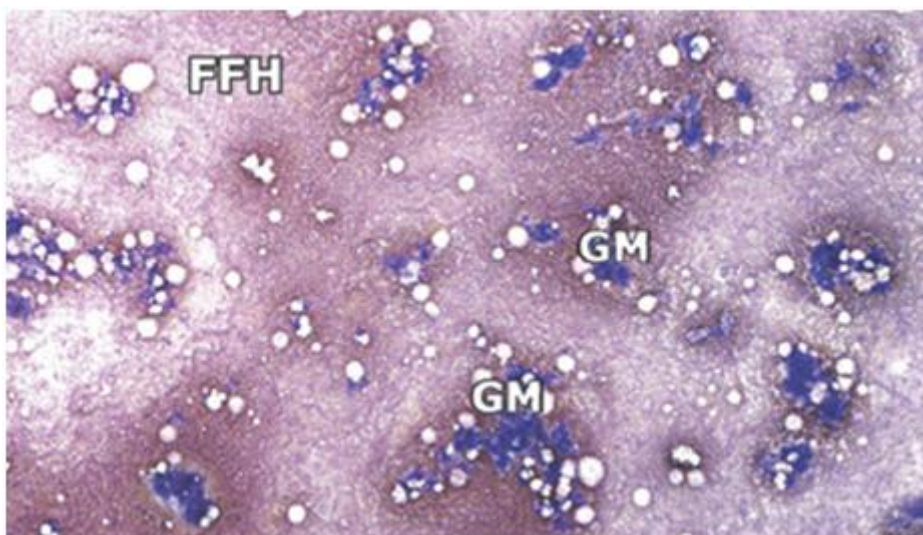


Figure 13 : Un bon myélogramme chez un chien révèle une cellularité élevée (Le Foll, 2011) FFH: fond de frottis hématique. GM: graines de moelle

Le myélogramme permet d'accéder aux détails cellulaires et d'identifier plus précisément les anomalies de maturation des différentes lignées cellulaires (dysplasie, atypies cytonucléaires...) qu'un examen histologique.

Par conséquent, le myélogramme permet d'exclure en première intention une aplasie médullaire (si le frottis apparaît riche en cellules) et d'accéder aux détails cytologiques des différentes lignées cellulaires.

Néanmoins, l'interprétation du myélogramme n'est pas toujours évidente, c'est pour cette raison que les critères cytologiques doivent être interprétés en tenant compte de l'ensemble des anomalies, cliniques et biochimiques.

II. CYTOPONCTIONS LIQUIDIENNES

1. Cytoponctions d'épanchements cavitaires

Les épanchements cavitaires chez les carnivores domestiques peuvent avoir une origine inflammatoire, mécanique ou néoplasique. Les épanchements liés à un processus cancéreux sont aussi fréquents qu'on ne peut pas négliger l'importance d'une analyse cytologique devant tout épanchement lors d'un contexte cancérologique.

Les indications préférentielles d'un examen cytologique du liquide d'épanchement en cancérologie sont :

- Une suspicion d'un lymphome malin médiastinal
- Présence d'un épanchement chez un animal atteint d'un cancer connu pour son affinité pour les séreuses (cancer de l'ovaire ou de la mamelle)
- Présence d'un épanchement cavitaire isolé avec un contexte clinique ne permettant aucune explication pathologique d'emblée.

1.1. Méthodologie

1.1.1. Techniques de prélèvement

Dans la plus part des cas, la ponction d'un liquide d'épanchement ne nécessite pas une anesthésie générale, par contre, dans certains cas lors d'un épanchement péricardique, réalisé de préférence sous guidance échographique pour des raisons de sécurité, une sédation pourrait être nécessaire.

La ponction doit être faite dans des conditions de stérilité absolue. Le clinicien doit noter l'aspect du liquide, il doit s'arrêter directement s'il remarque que l'aspect devient hémorragique afin de limiter l'hémodilution.

Les sites de ponctions pour chaque type d'épanchement sont résumés dans le tableau ci-dessous [Tableau 4] :

Tableau IV : Sites de ponction des divers épanchements (Else et Simpson, 1988 ; Jongh, 1989 ; Fournel et coll., 1990)

Epanchement pleural	Epanchement péritonéal	Epanchement péricardique
Animal debout	Animal en décubitus latéral	Animal debout ou en décubitus latéral gauche
Côté droit ou gauche	Ligne blanche	Coté gauche
6 ^{ème} /7 ^{ème} espace intercostal, à la limite 1/3 inférieur 1/3 moyen	2 cm en arrière de l'ombilic	3 ^{ème} /5 ^{ème} espace intercostal à la limite 1/3 inférieur 1/3 moyen du thorax

Si l'épanchement touche plusieurs cavités, le clinicien doit prélever des différents sites touchés car la cause peut varier d'un site à un autre.

Quelques complications peuvent avoir lieu si le clinicien ne respecte pas toutes les règles dont :

- L'hémorragie
- L'induction d'un foyer d'infection
- Extension de lésion à partir d'une lésion localisée
- Pneumothorax
- Détresse cardiaque sévère

Pour éviter ces complications le praticien doit insister sur la bonne contention de l'animal ou sa sédation dans certains cas, sur l'asepsie totale. Il doit dans tout les cas surveiller la couleur des muqueuses et le rythme cardiaque jusqu'à 6 heures après la ponction.

1.1.2. Acheminement du prélèvement non traité

Tout échantillon liquide sur lequel l'évaluation cytologique va pour être exécutée devrait être placé dans une appropriée quantité d'acide éthylène-diamine-tétracétique (EDTA). L'EDTA empêchera la coagulation de l'échantillon (qui peut changer les comptages cellulaires obtenus à partir de l'échantillon) et aident à préserver la morphologie de cellules pendant le transport au laboratoire.

C'est particulièrement important si l'échantillon sera expédié (**Cowell et Valenciano, 2014**).

L'acheminement doit se faire le plus rapidement possible, l'idéal est de ne pas dépasser les 2 heures qui suivent le prélèvement.

En pratique, quelques auteurs tolèrent jusqu'à 24 heures, le temps nécessaire pour l'envoi postal d'un prélèvement en urgence, durant ce temps, les transformations ne sont pas excessives puisque les cellules survivent quelque temps dans ce liquide.

Pour améliorer les résultats, une conservation à +4°C et l'envoi avec de la glace sont conseillées (**Jongh, 1989**).

Selon d'autres auteurs, même en utilisant les tubes EDTA et en gardant le prélèvement à 4°C les cellules dégénèrent et l'évaluation n'est pas significative.

Selon ces auteurs, la meilleure méthode pour conserver la morphologie des cellules contenues dans l'épanchement est d'envoyer au laboratoire, des lames prêtes sur les quelles on a étalé le prélèvement et qu'on a fixé. Ceci permet une conservation de la morphologie cellulaire pour plusieurs jours (**Ledieu, 2004 ; Cowell et Valenciano, 2014**).

Les frottis doivent être préparés dans les 30 minutes de l'échantillonnage pour éviter les artefacts (**Dunn, 2014**).

1.1.3. Etalement

L'étalement peut être précédé ou non d'une centrifugation. L'étalement sans centrifugation se fait à la manière d'un frottis sanguin. C'est la méthode la plus facile mais la cellularité est souvent très faible dans ce cas.

La centrifugation douce classique à 1500/2000 tours pendant 5 min permet d'avoir une cellularité plus importante mais les amas cellulaires sont parfois disloqués.

La meilleure méthode est la cytocentrifugation qui permet une concentration des cellules et leur étalement monocellulaire sur une surface réduite.

La cytocentrifugation se fait à 600 tours/min pendant 6 à 7 minutes, elle permet une bonne lecture des lames, la détection d'un petit nombre de cellules anormales sans aucun arrière plan qui risque de mener le cytologiste en erreur. L'inconvénient de cette méthode est son coût élevé (**Jongh, 1989**).

1.1.4. Séchage et fixation

Le séchage doit être rapidement fait, l'utilisation d'un sèche-cheveux est recommandée.

Pour la coloration MGG, la fixation par un simple séchage est la règle. Par contre, pour une coloration Papanicolaou, il est préférable d'immerger la lame encore humide dans de l'alcool éthylique à 95% (**Fournel et coll., 1990**).

1.1.5. Colorations

Les lames sont ensuite colorées. On utilise souvent deux colorations :

- La coloration MAY-GRÜNWALD-GIEMSA (MGG) : coloration de base qui permet une bonne appréciation des caractères cytoplasmiques.

- La coloration de Papanicolaou : c'est la meilleure coloration permettant une bonne appréciation des critères nucléaires (mottes chromatiniennes, nucléoles) et de l'organisation tridimensionnelle des amas cellulaire (**Fournel et coll., 1990**).

On peut y adjoindre des colorations supplémentaires comme le PAS (acide-périodique-Schiff) et le bleu alcian qui ont un intérêt tout particulier dans le diagnostic des adénocarcinomes mucosécrétants (**Tartar-Zamolo et Marsan, 1985**).

1.2. Méthodologie de lecture des lames d'épanchements

1.2.1. Bases de l'interprétation cytologique

Les épanchements cancéreux chez le chien ont souvent un aspect macroscopique séro-hémorragique voire hémorragique.

Dans le liquide d'épanchement on observe généralement trois types de cellules :

- Des cellules issues du mésothélium (revêtement des séreuses) ou cellules mésothéliales.

- Des cellules migrées du sang : lymphocytes, polynucléaires, histiocytes, monocytes, plasmocytes et mastocytes.

Ces deux premiers types de cellule constituent le « fond du frottis », ils permettent au cyto-pathologiste de déterminer le processus pathogénique responsable de la constitution de l'épanchement et de son ancienneté.

- Des cellules malignes le plus souvent importées par un processus métastatique et plus rarement primitives.

1.2.2. Démarche de lecture d'un étalement

En première étape il faut s'assurer de la qualité du prélèvement, puis on procède à l'examen du contexte cellulaire général afin de différencier les populations cellulaires normales, réactionnelles et tumorales pour finir avec l'étude de chaque population à l'échelon cellulaire.

Pour y parvenir, le cyto-pathologiste commence son examen par le plus faible grossissement des microscopes puis il passe aux forts grossissements afin de détailler les anomalies à l'échelon cellulaire **(Cloet-Chabre, 2000)**.

1.3. Difficultés d'interprétation

La principale difficulté réside dans la différenciation entre les cellules malignes et les cellules mésothéliales transformées. En effet, lors d'épanchements inflammatoires et chroniques, l'hyperplasie mésothéliale devient importante et atypique, pouvant mimer une population tumorale **[Tableau 5]**.

Il n'est pas toujours facile de différencier une cellule maligne d'une cellule irritée. En effet, il n'existe pas de critères constants de malignité qui distingue clairement les cellules mésothéliales réactives et les cellules dérivées d'un néoplasme malin **(Tartar et Marsan, 1985)**.

Dans les cas où un épanchement inflammatoire contient des cellules épithéliales présentant des critères de malignité, il devient nécessaire de réaliser une biopsie et un examen histologique pour confirmer ou infirmer l'hypothèse d'un carcinome **(Radin, 2004)**.

Tableau V : Apport de la cytologie au diagnostic différentiel des différents types pathogéniques d'épanchements cavitaires (Magnol et coll., 1998)

Nature de l'épanchement		Cytologie
Inflammatoire		Neutrophiles Macrophages vacuolaires Lymphocytes Cellules mésothéliales dégénérées lors d'épanchements chroniques
Mécanique (cardiaque)		Macrophages très vacuolaires Cellules mésothéliales basophiles peu transformées Peu ou pas de neutrophiles
Néoplasique	Mésothéliome	Cellules mésothéliales variablement atypiques, isolées ou en boules Cellularité +++
	Carcinomes métastatiques	Cellules carcinomateuses très atypiques en « boules » ou amas Cellularité +++ Reconnaissance du tissu originel difficile
	Carcinomes primitifs (d'organes siégeant dans la cavité concernée)	Cellules carcinomateuses le plus souvent isolées et atypiques Cellularité +/- Reconnaissance du tissu originel difficile
	lymphomes malins	Cellules lymphoïdes souvent atypiques Cellularité +++ Origine lymphoïde évidente
	Hémangiosarcome	Hémorragie cavitaire massive Très rares cellules tumorales peu caractéristiques d'une lignée donnée
	Mastocytome malin	Histogenèse le plus souvent évidente
	Mélanome malin	Cellularité ++ Histogenèse évidente ou non selon la différenciation

1.4. Efficacité diagnostique de l'examen cytologique d'étalements de cytoponctions d'épanchements cavitaires

Dans une étude de détection des tumeurs malignes dans les épanchements abdominaux et thoraciques chez le chien, la sensibilité était basse à 64% cependant, la spécificité était haute à 99% (**Raskin et Meyer, 2010**).

Indépendamment du type de tumeur, les cellules néoplasiques peuvent ou non être présents sur les lames cytologiques d'une ponction de l'épanchement. Lors d'une suspicion importante d'une origine néoplasique et des résultats cytologiques négatifs, il est nécessaire de réaliser une biopsie et un examen histologique pour confirmer ou infirmer la suspicion.

1.5. Cytologie des épanchements et immunomarquage

L'immunocytochimie est une méthode d'analyse des cellules *in situ* par une technique d'immunofluorescence. Une technique immunochimique dont l'échantillon est une préparation cytologique. Cette technique permet de révéler et cibler une molécule biologique à l'échelle cellulaire depuis des anticorps spécifiques. Pour mettre en évidence ce complexe antigène-anticorps

Il est possible ainsi d'identifier des populations cellulaires si on connaît un anticorps spécifique de chacune. Il deviendra alors possible d'identifier l'origine d'une cellule tumorale ayant perdu ses caractères morphologiques propres.

C'est une technique intéressante dans les cas où l'examen cytologique seul s'avère insuffisant pour trancher, elle est couramment utilisée en médecine humaine (**Raskin et Meyer, 2010**).

2. Cytologie du liquide synovial

Les difficultés locomotrices chez le chien sont un motif fréquent de consultation, parmi les étiologies possibles on trouve les boiteries dont l'origine est un processus tumoral impliquant un membre et dont le diagnostic est difficile sans recours à des examens complémentaires.

L'examen cytologique du liquide articulaire est un geste simple qui peut, devant toute arthropathie avec épanchement, renseigner sur sa nature.

2.1. Techniques de prélèvement

L'examen du liquide synovial se fait à partir des articulations gonflées ou présentant un épanchement synovial de préférence **(Jacques et coll., 2002)**.

Cet acte est peu compliqué et peut se faire sur le chien vigile ou après une tranquillisation ou une sédation **(Taylor, 2003)**.

Le site de ponction est tondu et nettoyé et le praticien doit porter des gants stériles.

Pour ceci, on utilise une seringue de 3 cm³ avec une aiguille de calibre adapté à la taille de l'articulation (21G à 25G en général). On pique dans l'articulation puis on applique une dépression légère sur le piston de la seringue. On arrête quand il n'y a plus de liquide qui vient ou si du sang apparaît **(Schrader, 1995)**.

Immédiatement après le prélèvement, on utilise une goutte de liquide synovial pour étaler une lame microscopique. Le reste du prélèvement est divisé sur tube sec pour les examens microbiologiques et sur tube EDTA pour les autres examens cytologiques et chimiques **(Taylor, 2003)**.

2.2. Utilité de l'examen cytologique d'étalements de cytoponctions du liquide synovial en cancérologie

Cet examen est utile pour le diagnostic des métastases localisées au synovium puisque les tumeurs de la synovie sont diagnostiquées par ponction directe de la masse tumorale.

Les métastases localisées au synovium sont, contrairement aux métastases osseuses, exceptionnellement diagnostiquées. Meinkoth et coll. reportent le cas d'un chien présenté pour une boiterie avec suppression d'appui de la patte postérieure gauche et une douleur à la manipulation de la queue.

Un épanchement articulaire modéré et des modifications prolifératives furent constatés à l'examen radiographique du tarse. L'autopsie révéla la présence d'un carcinome broncho-alvéolaire indifférencié avec des métastases osseuses, ganglionnaires et articulaires **(Meinkoth et coll., 1997)**.

3. Cytologie du liquide céphalo-rachidien

L'examen cytologique du liquide céphalo-rachidien est indiqué lors de toute affection du système nerveux centrale chez le chien, en effet beaucoup de ces affections perturbent la composition du LCR, en particulier les affections inflammatoires et tumorales. Cet examen permet souvent au clinicien de déterminer la nature générale du phénomène pathologique et occasionnellement l'étiologie de l'affection en cause (**Feldman, 2000**).

3.1. Matériel utilisé

Pour cette manipulation on utilise un matériel comprenant : des gants stériles, une aiguille avec un stylet, de 0,8 mm de diamètre et de 40 à 60 cm de long (selon la taille du sujet) et le matériel habituel de préparation d'un site opératoire (**Cook et DeNicola, 1988**).

3.2. Technique de prélèvement

Une anesthésie générale ainsi qu'une intubation trachéale sont indispensables.

L'animal en position latérale, l'aide se place à la tête et la maintient fléchie à 90° par rapport au rachis et légèrement surélevée pour que l'axe du rachis soit parallèle à la table.

A l'aide de la main libre, l'opérateur palpe la protubérance occipitale et les extrémités cardiales des ailes de l'atlas avec la droite joignant l'occiput à la colonne vertébrale [**Photo 3**].

Une fois que le point d'insertion est localisé, l'aiguille est enfoncée dans la peau avec le biseau dirigé crucialement. L'aiguille est fermement maintenue par le pouce et l'index de la main libre qui stabilisent et contrôlent l'avancée de l'aiguille. Cette dernière est tenue perpendiculairement à la surface de la peau ou légèrement inclinée vers l'arrière selon un angle de 45°, elle est enfoncée progressivement dans les tissus, en prenant garde que le stylet demeure bien en place (**Cook et DeNicola, 1988**).

Le liquide prélevé est recueilli dans un tube à prélèvement stérile, puis centrifugé.



Photo 3 : Collection aseptique du LCR (Dunn, 2014)

3.3. Contre indications

Cette manipulation est contre-indiquée lorsque :

- L'état général de l'animal ne permet pas une anesthésie générale
- Hypertension intra-cranienne
- Infections cutanés ou sous cutané au lieu de la ponction

3.4. Applications pratiques

Lors de l'examen cytologique du LCR, il est rare d'observer des cellules néoplasiques (Chrisman, 1992).

Cet examen est particulièrement utile pour le diagnostic de lymphome : ainsi, Davidson et coll. ont reporté le cas d'un chien présenté pour cécité aiguë et pour lequel le diagnostic de lymphosarcome fut obtenu par évaluation cytologique du liquide céphalo-rachidien. Ce lymphome envahissait les nœuds lymphatiques, la cavité nasale, la moelle osseuse et le chiasma optique (Davidson et coll., 1998).

D'autres cancers peuvent également être révélés par cet examen : Pumarola et coll. ont reporté un cas de carcinomatose méningéale (= infiltration leptoméningéale diffuse par les cellules d'une tumeur solide extra-neurale qui ont métastasé vers le système nerveux central)

diagnostiquée par examen cytologique du liquide céphalo-rachidien chez une chienne qui présentait également des nodules mammaires. Le LCR présentait des cellules néoplasiques similaires à celles observées au niveau des nodules mammaires, lesquels furent diagnostiqués comme étant l'origine de la carcinomatose (**Pumarola et Balasch, 1996**).

III. LAVAGE, BROSSAGE, ECOUVILLONNAGE, MASSAGES-RINÇAGE

1. Cytologie des premières voies respiratoires

Les affections des cavités naso-sinuses chez le chien sont multiples, parmi celles-ci on retrouve de nombreux types de tumeurs.

Les méthodes de diagnostic habituelles : recueil des commémoratifs, examen clinique, radiographie, rhinoscopie ne donnent généralement qu'une orientation diagnostique d'un phénomène néoplasique qui devra être confirmé ou infirmé par des analyses cytologiques ou histologiques et préciser le type de tumeur.

1.1. Techniques de prélèvement

Plusieurs modes de prélèvement sont possibles dans ce cas :

- **Ecouvillonnage** : cette méthode est contre indiquée lorsque les lésions sont trop humides. Elle se fait en frottant la muqueuse nasale avec un écouvillon hydrophile préalablement humidifié par une solution saline. Ceci permet la récolte des cellules muqueuses.

- **Brossage** : effectué à l'aide d'un cyto-brosse, permet une meilleure abrasion de la surface et donne par la suite des cellules plus profondes.

- **Flushing** : le flushing consiste en un lavage vigoureux de la cavité nasale avec du sérum physiologique sous pression qui permet de recueillir des échantillons pour la cytologie, la bactériologie voire l'histologie si le tissu expulsé n'est pas trop nécrotique (**Cobb, 1998**).

Cette technique s'exerce sur un animal sous anesthésie générale, intubé et placé en décubitus latéral du côté de la lésion (**Collas, 1996**).

- **Cytoponction** : se pratique lorsque la masse tumorale est palpable ou visible à la radiographie. Dans certains cas, la tumeur nasale provoque un effondrement d'un plan osseux,

on accède alors par une cytoponction transcutané ou trans-palatine à l'aide d'une aiguille fine (Magnol et coll., 1998).

- Biopsie suivie d'appositions ou de grattage

1.2. Applications

Les adénocarcinomes sont relativement fréquents chez les chiens et les chats. La morphologie de ces tumeurs est similaire entre les adénocarcinomes et les carcinomes à cellules squameuses situés sur d'autres sites. Les tumeurs d'origine mésenchymateuse de la cavité nasale sont rares (fibrosarcomes, ostéosarcomes et chondrosarcomes se produisent de temps en temps).

Le lymphome est la tumeur à cellules rondes impliquant la cavité nasale la plus fréquente chez les chiens et les chats.

La cytologie d'un lymphome nasal ressemble à celle observée dans d'autres sites. Les carcinomes anaplasiques nasals ont aussi une apparence de cellules rondes, mais les cellules ont tendance à être beaucoup plus grande (Dunn, 2014).

Comme pour la plupart des tumeurs mésenchymateuses, l'examen histologique d'un échantillon de biopsie est habituellement nécessaire pour définir avec précision le type de tissu.

L'aspect radiographique et l'emplacement de la lésion peut également fournir quelques indications.

2. Cytologie de l'arbre respiratoire

2.1. Techniques de prélèvement

2.1.1. Lavage trans-trachéal

Il s'agit d'un acte peu invasif, facile, rapide et peu onéreux, il est tout à fait justifié de l'entreprendre en présence de tout signe de maladie respiratoire profonde avant d'envisager d'autres moyens diagnostiques plus lourds et plus invasifs.

Le principe est d'introduire une sonde directement dans la trachée et jusqu'à la bifurcation trachéo-bronchique, à travers le ligament cricothyroïdien ou entre des anneaux trachéaux chez un animal vigile ou tranquilisé (Nelson et coll., 1998).

Il faut éviter tant que possible toute sédation, afin que l'animal conserve un bon réflexe de toux, nécessaire à la récolte du liquide (**McCullough et Brinson, 1999**).

En cas de suspicion de phénomène inflammatoire, l'interprétation cytologique du liquide de lavage transtrachéal permet, d'accéder facilement à une analyse plus fine des processus pathologiques mis en cause, en précisant si l'inflammation est plutôt de nature infectieuse, parasitaire, allergique ou tumorale (**Masserdotti et DeLorenzi, 1998**).

2.1.1.1. Matériels utilisés

- Un cathéter jugulaire et son aiguille de ponction : la tubulure est en général assez longue pour atteindre la bifurcation trachéo-bronchique (à peu près au niveau du quatrième espace intercostal)
- 4 à 6 seringues stériles de contenance 12 à 35 ml
- Un champ stérile pour y placer le matériel
- Du sérum physiologique chaud stérile
- Une paire de gants stériles
- Un anesthésique pour pratiquer une tranquillisation éventuelle
- Du matériel pour préparer la zone de ponction (tondeuse, savon, solution antiseptique, et un anesthésique local avec seringue et aiguille)

2.1.1.2. Préparation de l'animal

La tranquillisation ne doit pas altérer le réflexe de toux car cela compromettrait les chances de récupérer suffisamment de liquide.

Le site de ponction doit être préparé de manière chirurgicale (**Bauer et Thomas, 1983**).

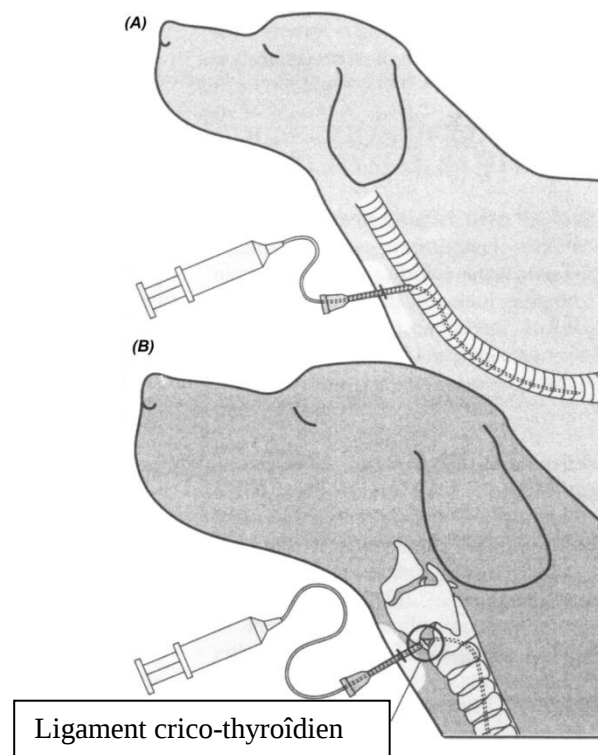
Le chien est placé en décubitus sternal ou en position assise, selon le confort du clinicien et de l'animal (**Nelson et coll., 1998**). Son nez est orienté vers le haut selon un angle de 45° par rapport à l'horizontale. Le site de ponction doit être anesthésié par des injections sous-cutanées de 0,5 à 1 ml de lidocaïne avant de commencer l'opération (**Jaffe, 1998**).

2.1.1.3. Technique du lavage

Il consiste à introduire un cathéter jugulaire monté sur aiguille à travers du ligament crico-thyroïdien du larynx, on aspire alors les premières sécrétions puis on injecte une solution saline tiédie (1 à 2 ml pour 5 kg) que l'on réaspire immédiatement. On retire la tubulure et l'on comprime la zone de ponction par un bondage laissé 24 heures afin de prévenir l'apparition d'emphysème sous-cutané (**Gallois, 1993**).

Alternativement, le lavage a la possibilité d'être effectué entre deux anneaux trachéaux à peu près 1 à 3 cm en dessous du larynx, notamment chez les chiens de grand format: cette technique présente l'avantage de diminuer le risque de lésions au niveau du larynx mais peut être à l'origine de fractures trachéales (**Jaffe, 1998**).

S'il est nécessaire de répéter le lavage, ceci doit être fait soit immédiatement soit 48 à 72 heures après, afin d'éviter une augmentation importante du nombre de polynucléaires neutrophiles ou de contaminants, augmentation constatée au cours des 2 jours qui suivent le lavage (**Gallois, 1993**).



(A) : ponction entre deux anneaux trachéaux ; (B) : ponction à travers le ligament crico-thyroïdien

Figure 14 : Lavage transtrachéal : deux techniques de prélèvement (Corcoran, 1998)

2.1.1.4. Traitement des échantillons

Tous les auteurs s'accordent à signaler que les cellules du liquide de lavage transtrachéal sont très fragiles (**Mc Cullough et Brinson, 1999**).

Les prélèvements doivent donc être exploités avec le moins de manipulations possibles dans les 15 à 30 minutes qui suivent leur récolte. Les étalements sont effectués directement à partir du liquide ou après centrifugation ou sédimentation (**Nelson et coll., 1998**).

La cytocentrifugation est plus intéressante car elle permet d'obtenir des préparations où les cellules y sont plus concentrées et moins abîmées (**Rebar et coll., 1980**).

Enfin, ils sont colorés :

- Au colorant de Wright ou Romanovsky rapide équivalents du May-Grünwald-Giemsa après séchage à l'air libre
- A l'hémalin-éosine ou au colorant de Papanicolaou après fixation à l'alcool (**Masserdotti et DeLorenzi, 1998**).

2.1.2. Lavage broncho-alvéolaire

Le LBA est l'examen complémentaire préconisé pour le diagnostic cytobactériologique des affections pulmonaires profondes particulièrement les affections de type alvéolaire ou interstitiel et aussi lorsque les résultants du lavage trachéal n'ont pas permis de déterminer la nature exacte de l'affection. Le prélèvement d'un lobe particulier est possible si un endoscope est utilisé (**Gamet, 2001**).

Cette technique s'est énormément développée ces dernières années : c'est un examen quasiment systématiquement réalisé lors des trachéobronchoscopies. Le but du lavage bronchoalvéolaire est de récupérer les cellules siégeant dans le territoire pulmonaire profond en se basant sur le principe suivant : les cellules présentes dans la lumière alvéolaire représentent les cellules siégeant dans l'interstitium pulmonaire (**Spilmont et Cadoré, 2007**).

Le LBA s'effectue sous anesthésie générale et est associé à une hypoxie transitoire et pour cette raison, une autre technique de prélèvement (lavage trachéal, ponction trans-thoracique) lui est préférée chez les animaux qui présentent une dyspnée initiale importante (**Gamet, 2001**).

Il est réalisé le plus souvent à la faveur d'une bronchoscopie pendant laquelle on pourra examiner l'ensemble du tractus respiratoire, et repérer les zones pulmonaires plus particulièrement concernées, mais peut également être pratiqué "en aveugle" à condition que l'affection suspectée concerne tous les lobes pulmonaires caudaux (**Bergeaud et Masson, 2015**).

2.1.2.1. Matériel nécessaire

2.1.2.1.1. LBA par bronchoscopie

Le bronchoscope doit être un endoscope souple et doit comporter un canal opérateur et une source de lumière froide (**Gamet, 2001**). Les bronchoscopes les plus récents sont des vidéoscopes, dans lesquels la caméra est insérée à l'extrémité de l'endoscope, ce qui fournit une image de très bonne qualité.

La taille du patient conditionne le diamètre et la longueur de l'endoscope. Pour les petits animaux jusqu'à une quinzaine de kilos, le meilleur compromis est celui d'un bronchoscope pédiatrique de 5 mm de diamètre, et 60 cm de long, qui dispose d'un canal opérateur de 2 mm et d'une insufflation. Pour les animaux d'un poids supérieur, on peut utiliser un vidéogastroscope de 8 ou 9 mm de diamètre et d'au moins 1 mètre de longueur, qui aura été stérilisé par une solution adaptée.

2.1.2.1.2. LBA à l'aveugle

Si l'on ne dispose pas d'un bronchoscope, et si les lésions suspectées intéressent plusieurs lobes pulmonaires, on peut pratiquer le LBA en aveugle.

Quelle que soit la méthode de prélèvement, par bronchoscopie ou en aveugle, il faut préparer à l'avance le matériel suivant : une seringue de sérum physiologique de 5 à 20 ml selon la taille du patient, Une tubulure stérile de 1 ou 2 mm de diamètre compatible avec le passage dans le canal opérateur de l'endoscope utilisé, ou une tubulure stérile de 3 mm environ (sonde urinaire, sonde de nutrition par exemple) de longueur suffisante pour accéder aux lobes caudaux pour un examen en aveugle. L'extrémité est coupée de manière stérile pour permettre une injection et une aspiration par l'extrémité de la sonde, un tube sec, un tube EDTA, et des lames de microscope (**Bergeaud et Masson, 2015**).

2.1.2.2. Technique du prélèvement

L'asepsie des prélèvements doit être préservée à chaque étape. Le port des gants stériles est obligatoire et l'animal doit être anesthésié et intubé (**Gamet, 2001**).

2.1.2.2.1. LBA ciblé sur une zone pulmonaire

Le lavage bronchoalvéolaire est effectué après un premier passage de l'endoscope qui vise à répertorier les lésions (**Gamet, 2001 ; Spilmont et Cadoré, 2007**).

Le bronchoscope permet d'examiner systématiquement tout l'arbre bronchique des lobes moyens et caudaux, et ainsi de repérer la zone qui est à explorer plus particulièrement. Il est conseillé d'injecter par le canal opérateur de l'oxygène pur ou de l'air sous pression pour compenser la perte de diamètre des voies respiratoires.

L'endoscope est préalablement stérilisé, Il est introduit dans une des bronches incriminées jusqu'à être arrêté par la réduction du diamètre. Un cathéter de diamètre et de longueur adaptés (1 ou 2 mm de diamètre et plus de 1 m de long selon l'endoscope) est introduit dans le canal opérateur.

On injecte 1 à 2 ml/kg de sérum physiologique dans la bronche, complété par de l'air pour chasser tout le liquide qui est ensuite aspiré le plus complètement possible (de 10 à 50% du volume injecté) en faisant des petits mouvements de va et vient avec le bronchoscope. Si possible, on répète la procédure sur un deuxième lobe pulmonaire.

La présence de mousse dans le liquide recueilli montre qu'il contient du surfactant, et l'aspect trouble fait espérer une bonne cellularité.

2.1.2.2.2. LBA "en aveugle"

L'animal est couché sur le coté droit ou gauche si l'on privilégie un lobe droit ou gauche, ou sur le sternum si aucune latéralisation de lésion n'est privilégiée. La longueur de la sonde est estimée depuis l'entrée de la gueule jusqu'à la 8^{ème} côte. Elle est introduite au travers de la sonde trachéale, préalablement stérilisée par une solution adaptée, jusqu'à ce que l'on ressente une résistance. Le liquide est alors injecté, complété par de l'air pour le chasser de la sonde, puis recueilli par aspiration en faisant des petits mouvements (**Bergeaud et Masson, 2015**).

2.1.3. Brossage trachéal et bronchique

Le brossage trachéal et bronchique est d'une performance diagnostique cytologique moindre que ne l'est celle du lavage bronchoalvéolaire ; il est employé lors de masses endotrachéal et endobronchiques ou de bronchite chronique (**Spilmont et Cadoré, 2007**).

Se fait généralement à la suite d'un LBA, une brosse (de diamètre variant de 1,2 millimètres à 1,7 millimètres selon la compatibilité avec l'endoscope) est introduite dans le canal de biopsie de l'endoscope, tournée doucement contre la muqueuse des voies aériennes pour collecter les cellules.

La muqueuse des voies aériennes proximale plus grande (trachée distale, les bronches distales) doivent être balayées pendant au moins 30 secondes et les régions visiblement anormales de la muqueuse sont visées pour maximiser le rendement, avec des tentatives d'éviter des accumulations de mucus et de pus (**Zhu et coll., 2015**).

2.1.4. Biopsie bronchique

Les biopsies bronchique et pulmonaire sont moins souvent réalisées, et permettent d'obtenir des prélèvements plus spécifiques pour en faire des appositions ou des calques (**Spilmont et Cadoré, 2007**).

2.2. Efficacité diagnostique de la cytologie de l'arbre respiratoire

Il est difficile de diagnostiquer les tumeurs conjonctives et métastatiques car ceux-ci se développent dans le tissu pulmonaire interstitiel : on ne peut les diagnostiquer que lorsqu'elles ont envahi l'arbre bronchique. par contre, les chances de diagnostiquer une tumeur primitive du poumon d'origine épithéliale sont importantes car celles-ci se développent en partie dans les voies respiratoires et ne restent pas confinées au parenchyme pulmonaire (**Gallois, 1993**).

Le carcinome est la tumeur primitive pulmonaire la plus fréquemment rencontrée, comparée aux fibrosarcomes aux ostéosarcomes, aux chondrosarcomes, aux hémangiosarcomes ou aux adénomes qui restent exceptionnels (**Fournel et coll., 1994**).

Une étude réalisée en médecine humaine s'est intéressée particulièrement à l'intérêt de l'examen cytologique dans le diagnostic des carcinomes pulmonaires: il a permis d'établir le

bon diagnostic dans 79,1% des cas. Aucun faux positif n'était à déplorer (**Linder et coll., 1987**).

2.3. Difficultés d'interprétation

Le diagnostic de carcinome doit être établi avec beaucoup de précautions : il est facile quand les cellules présentent des critères évidents de malignité en l'absence de signes d'inflammation, mais le plus souvent, des phénomènes inflammatoires se surajoutent au fond tumoral, ce qui rend le diagnostic cytologique plus difficile.

On cite aussi la difficulté de différencier les cellules épithéliales tumorales de cellules hyperplasiques. Il peut alors être nécessaire de recourir à un examen histologique beaucoup plus invasif (**Nelson et coll., 1998**).

3. Cytologie urinaire

3.1. Techniques de prélèvement

L'examen cytologique peut se faire sur le culot d'un prélèvement urinaire (centrifugation 1000 rotation/minute pendant 5 min). L'urine peut être obtenue par taxis trans-abdominal, par cathéterisation ou par cystocentèse (méthode recommandée si la culture bactérienne est exigée).

Des échantillons pour la cytologie peuvent aussi être obtenus en rinçant la vessie avec une solution saline tiède à l'aide d'une sonde urinaire on récupère ensuite le fluide affleurant.

Si une masse est évidente à l'échographie et accessible, une biopsie par aspiration de la masse à travers un cathéter peut être exécutée. Cette technique se pratique après sédation de l'animal ou sous anesthésie. Si la masse n'est pas accessible par l'urètre, une cytoponction échoguidée peut être exécutée après une anesthésie (**Dunn, 2014**).

3.2. Applications et efficacité diagnostique

La néoplasie est plus facile à détecter par cytoponction à l'aiguille fine ou par impression d'une masse dans la vessie ou l'urètre plutôt que par l'examen au microscope du sédiment d'urine.

Chez les chiens et les chats, la tumeur la plus commune est le carcinome de l'urètre. Les polypes et les masses bénignes sont beaucoup moins communs et peuvent être différenciés des carcinomes sur des frottis d'impression. D'autres tumeurs rares incluent les leiomyomes et leiomyosarcomes (**Dunn, 2014**).

Dans une étude faite, 115 chiens avec un néoplasme au bas appareil urinaire ont été évalués, 97% de ces tumeurs étaient malignes et d'origine épithéliales (**Norris et coll., 1992**).

Le diagnostic des tumeurs conjonctives du rein et de la vessie s'effectue grâce à l'imagerie médicale. La cytologie peut être décevante car ces lésions sont très cohésives et desquament peu (**Tamburro et coll., 2008**).

4. Cytologie prostatique

Parmi les affections touchant de manière fréquente les chiens âgés et non castrés on trouve les affections prostatiques qui représentent une part importante. Leur symptomatologie étant uniforme, le diagnostic nécessite des investigations complémentaires. L'examen cytologique de prélèvements issu de la prostate apparaît comme l'un des éléments performants du diagnostic différentiel de ces affections.

4.1. Techniques de prélèvement

4.1.1. Massage rinçage prostatique

Le massage prostatique s'effectue sous sédation ou anesthésie (**Root-Kusritz et coll., 2000**).

Cette méthode consiste à insérer une sonde urinaire dans l'urètre jusqu'au pôle caudal de la prostate (l'opérateur sent la progression de la sonde en même temps par voie rectale). Une seringue est placée au bout de la sonde urinaire, l'opérateur aspire avec la seringue en même temps qu'un massage de la prostate est réalisé par voie rectale. Les sécrétions prostatiques sont ainsi aspirées par la seringue. Avec cette méthode, on récolte une petite quantité de fluide prostatique qui peut ensuite être examinée cytologiquement et cultivée. Si on n'obtient pas de fluide avec cette méthode, on peut instiller quelques millilitres de solution stérile (Ringer Lactate ou NaCl 0,9%) pendant le massage prostatique, 0.1 à 0.5 ml peuvent être ensuite récupérés [**Figure 15**] (**Olson et coll., 1987**).

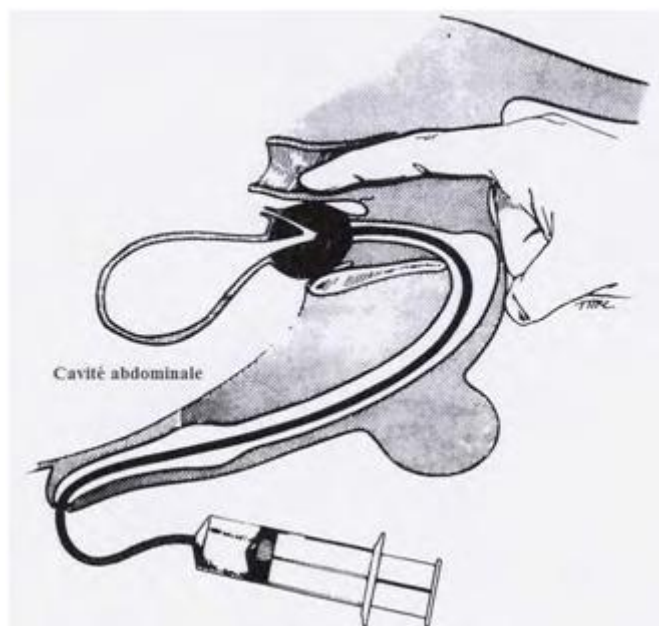


Figure 15 : Illustration d'un massage prostatique (Olson et coll., 1987).

Une précaution est à prendre lors du massage prostatique : le massage doit être délicat car un massage vigoureux peut provoquer la rupture d'un abcès, ce qui prédispose l'animal à une péritonite, une septicémie et un choc septique et endotoxémique. Le massage prostatique peut aussi provoquer la dissémination de cellules néoplasiques (**Forrester et Purswell., 1997**).

4.1.2. Obtention de liquide prostatique par aspiration à l'aiguille fine

Les cytoponctions peuvent être réalisées par un abord para-rectal ou trans-abdominal, sous contrôle échographique ou non. Le choix de l'abord est déterminé par la position de la prostate et la façon dont elle peut être immobilisée le plus efficacement (**Rogers et coll., 1986**).

Une aspiration à l'aiguille fine à l'aveugle ne doit pas être réalisée si le clinicien suspecte la présence d'abcès prostatiques, car la ponction augmente le risque de péritonite.

Dans ces cas-là, il vaut mieux réaliser une aspiration échoguidée (**Root-Kusritz et coll., 2000**).

Pour un abord para-rectal, un nettoyage chirurgical de la zone périnéale doit être réalisé. La prostate est palpée par voie rectale avec une main et une aiguille (22 gauges) est

insérée à travers le périnée, latéralement à l'anus et médialement à la tubérosité ischiatique. L'aiguille est dirigée parallèlement au rectum jusqu'à ce qu'elle atteigne la prostate (**Olson et coll., 1987**). Une dépression est effectuée puis relâchée avant que l'aiguille soit retirée (**Rogers et coll., 1986**).

Pour un abord abdominal sous contrôle échographique, un nettoyage chirurgical est également réalisé, ainsi qu'une anesthésie cutanée locale et une incision cutanée afin de faciliter le passage de l'aiguille. La sonde échographique est placée dans un gant stérile et un gel acoustique stérile est utilisé sur la peau. L'aiguille est ensuite avancée jusqu'à l'organe à ponctionner. Une fois l'organe atteint, un aide stabilise la sonde échographique pendant que l'opérateur réalise la cytoponction (**Hager et coll., 1985**).

Les échantillons obtenus par aspiration directe contiennent moins de cellules contaminantes et sont plus cellulaires que les échantillons obtenus par éjaculation ou massage prostatique (**Zinkl, 2006**).

4.2. Applications

Chez le chien, le cancer de la prostate est une affection rare. Ceci est montré par l'incidence très faible de cette maladie en pratique vétérinaire courante (**Barsanti et Finco, 1995**).

Sa prévalence parmi les affections prostatiques est de 7% (13 cas sur 177), sans que les tranches d'âge soient précisées (**Krawiec et Heflin, 1992**).

Elle peut être surestimée en cas de tumeur vésicale envahissant la région cervico-prostatique (**Kennedy, 1995**).

Le type tumoral le plus fréquemment retrouvé est l'adénocarcinome prostatique (> 90% des cas). Les métastases dans les nœuds lymphatiques, les vertèbres lombaires ou les poumons sont fréquentes (**Barsanti et Finco, 1995**).

Les cellules glandulaires d'une prostate normale se regroupent en amas de petite ou moyenne taille. Leurs noyaux sont centraux, ronds à ovales et la chromatine est finement ponctuée. Le cytoplasme est discrètement acidophile, en quantité modérée, il a un aspect fin et granulaire. Des cellules du stroma peuvent parfois être observées, elles sont généralement peu nombreuses, elles ont un noyau allongé et un cytoplasme discrètement basophile en quantité modérée (**Rogers et coll., 1986 ; Zinkl, 2006**).

Des cellules contaminantes peuvent être observées : spermatozoïdes, cellules squameuses provenant de l'urètre ou des organes génitaux externes, cellules urothéliales provenant du tractus urinaire ou génital, autres cellules épithéliales provenant du canal déférent et de l'épididyme (**Zinkl, 2006**).

Les échantillons obtenus à partir de carcinomes prostatiques ont une cellularité modérée à marquée. Les cellules obtenues présentent une anisocaryose, elles sont souvent attachées les unes aux autres et forment des amas. Elles sont rondes à ovales et présentent une dilatation et une irrégularité nucléaires, ainsi qu'une élévation marquée du rapport nucléocytoplasmique. Des nucléoles peuvent être observés. Les membranes cellulaires sont généralement distinctes dans les tumeurs bien différenciées et elles sont invisibles dans les tumeurs peu différenciées (**Rogers et coll., 1986 ; Zinkl, 2006**).

Il existe différents critères de malignité nucléaires et cytoplasmiques, la présence d'au moins 4 critères de malignité suggère un processus néoplasique (**Rogers et coll., 1986**).

Les tumeurs prostatiques métastasent dans les noeuds lymphatiques iliaques et sous-lombaires, il est conseillé d'examiner voire de réaliser des cytoponctions de ces ganglions, en cas de suspicion de processus néoplasique (**Zinkl, 2006**).

4.3. Efficacité diagnostique

Une étude a été faite sur 77 chiens présentant une maladie prostatique : la sensibilité de l'examen de cytoponctions ou de massages- rinçages prostatiques dans la détection d'un carcinome prostatique fut modérée : 67% chacun.

Cependant, la combinaison des 2 techniques produit une très haute spécificité (98%).

Les conclusions cliniques combinées à l'imagerie médicale et aux 2 techniques constituent la meilleure démarche diagnostique d'un cancer prostatique chez le chien (**Teske et Nickel, 1996**).

IV. CALQUES PAR IMPRESSION, ECOUVILLONNAGE, CALQUES A LA CELLOPHANE ADHESIVE ET APPPOSITIONS

1. Calques par impression

Des empreintes peuvent être faites pour les lésions cutanées superficielles. Ces empreintes peuvent être diagnostiquées, mais elles reflètent souvent l'inflammation et la contamination extérieures **(Withrow et MacEwen, 2007)**.

Les calques par impressions consistent à apposer une lame porte-objet sur la surface d'une lésion superficielle tout en appuyant sur cette néoformation de manière à faire ressortir le matériel cellulaire.

La lame microscopique est mise ensuite à sécher, colorée, recouverte d'une lamelle et examinée au microscope sous grossissement croissant jusqu'à l'immersion afin de distinguer les éléments cellulaires. Quand une incision est faite ou qu'une lésion a été enlevée, un calque par impression du plan de coupe peut être fait.

Si une pustule intacte ou une vésicule doivent être prélevées, la peau est tenue entre pouce et index afin d'avoir la lésion sur le dessus. Avec le bord de la lame microscopique, la pustule est ouverte et son contenu appliqué sur la lame. Une autre méthode consiste à découper le "toit" de la lésion avec des ciseaux pointus et fins (Tzanck technique) et à le retourner. Le calque par impression est alors effectué. Chez le chien et le chat, les pustules sont souvent trop petites pour permettre cette technique. Elle peut être tentée en utilisant la pointe d'une aiguille. Vésicules et pustules intactes sont assez rarement observées chez les petits carnivores. Quand elles sont présentes, elles sont plutôt prélevées en vue d'une culture ou d'un examen histologique **(Bourdeau, 1994)**.

L'inconvénient de cette technique c'est qu'elle donne généralement des étalements de qualité médiocre, à fond très hémorragique, contenant majoritairement des polynucléaires neutrophiles.

2. Écouvillonnage

Cette méthode est essentiellement utilisée pour les lésions fistuleuses. L'écouvillon est roulé plusieurs fois sans frotter sur toute la longueur de la lame microscopique. Elle est laissée à sécher quelques minutes et est colorée **(Bourdeau, 1994)**.

Cette technique est peu utile pour le diagnostic de conditions néoplasiques **(Pouletty, 2014)**.

3. Calque à la cellophane adhésive

Il s'agit de l'application d'un morceau de ruban adhésif transparent sur la peau ou une lésion cutanée, afin de prélever des éléments cellulaires, microorganismes et autres débris présents.

Pour le réaliser, on doit Appliquer la partie collante du ruban adhésif directement sur la peau et la retirer d'un mouvement sec. On répète l'opération une à deux fois de suite.

On colle ensuite le morceau d'adhésif à l'extrémité d'une lame, de façon à effectuer une boucle, ou maintenir la boucle avec une pince, colorer, puis le coller sur une lame (face collante contre la lame).

4. Appositions

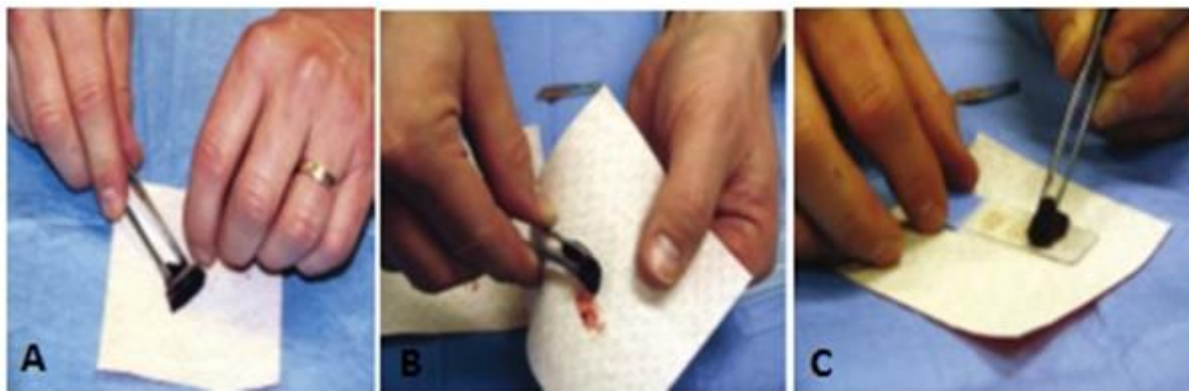
Ce sont des impressions faites suite à l'exérèse de la néoformation à étudier, exérèse chirurgicale ou post-mortem, ou suite à l'obtention d'une biopsie.

Pour y parvenir, le tissu doit d'abord être coupé de sorte qu'une nouvelle surface fraîche soit créée [**Photo 4**].

Après, le sang et le liquide tissulaire excédentaires doivent être enlevés de la surface de la lésion à imprimer en épongeant avec un matériel absorbant propre (papier serviette par exemple)

Le sang et les liquides tissulaires empêchent les cellules du tissu d'adhérer à la lame en verre, produisant une préparation médiocrement cellulaire.

La lésion est pressée ensuite contre le milieu d'une lame porte objet propre et soulevée directement. Ceci devrait être répété plusieurs fois de telle sorte que plusieurs empreintes du tissu soient présentes sur la lame (**Withrow et MacEwen, 2007 ; Cowell et Valenciano, 2014**).



A : Découpe et création d'une surface fraîche ; B : La surface du tissu est éponagée plusieurs fois ; C : La lésion est pressée contre une lame propre plusieurs fois

Photo 4 : Réalisation d'une apposition suite à l'exérèse chirurgicale d'une masse (Cowell et Valenciano, 2014)

V. GRATTAGES

Se fait aussi suite à l'exérèse de la néoformation : consistent à gratter la tranche de section de la masse avec une lame de scalpel, puis à étaler sur une lame porte-objet le matériel cellulaire obtenu par un étalement par étirement. On procède ensuite à une fixation par agitation à l'air et à une coloration.

VI. PASTILLES DE CYTOCENTRIFUGATION

Un fragment de tissu est broyé au travers d'un fin tamis, puis les cellules sont « rincées » et diluées dans un milieu de survie ; on obtient alors une suspension de cellules vivantes. Cette technique est utile surtout pour l'immunocytochimie (**Bricaire, 1996**).

VII. INTERETS DU DIAGNOSTIC CYTOLOGIQUE EN ONCOLOGIE CANINE

1. Avantages et limites de la cytologie

1.1. Intérêts techniques

L'intérêt majeur de cet acte est son caractère non invasif (recueil direct ou brossage) voire faiblement invasif (aiguille fine). De ce fait, il n'existe quasiment aucune contre-indication à cet acte.

Les complications hémorragiques ou infectieuses sont exceptionnelles pour les prélèvements cytologiques (**Kocjan et coll., 2009**). Les techniques standard sont simples, peu coûteuses et peuvent être mises en œuvre rapidement. Les prélèvements se font la plupart du temps sans anesthésie, en ambulatoire, et un examen extemporané est toujours possible. La rapidité des techniques standards permet des délais courts (dans la journée) entre le prélèvement et le diagnostic.

Aussi, des techniques complémentaires sont toujours possibles pour étayer le diagnostic (des méthodes d'immunocytochimie, de biologie moléculaire...).

Ainsi, nous avons pu discerner dans la partie précédente plusieurs possibilités d'application des examens cytologiques et dans de nombreux cas ils sont à réaliser en première intention car ils sont nettement moins invasifs que les examens histologiques. Ainsi, toute suspicion de processus tumoral devrait en théorie exiger la réalisation d'examens cytologiques. Aussi bien que dans les cas de suspicion d'une métastase ou d'une tumeur multicentrique.

1.2. Limites

Bien que la cytologie présente plusieurs avantages, quelques limites sont à signaler dont la rareté du matériel cellulaire dans certains cas de tumeurs avec un degré d'exfoliation peu importante, notamment les tumeurs fibreuses et/ou calcifiées.

Aussi, la qualité des prélèvements, un bon étalement et la rapidité de traitement des prélèvements sont essentielles pour une bonne interprétation.

Par ailleurs, l'examen cytologique ne représente qu'un échantillonnage de la population cellulaire tumorale dépourvu de toute architecture tissulaire. Ceci peut également rendre délicat pour la cytopathologiste l'affirmation d'un diagnostic de certitude.

Une ponction mal faite peut donner des résultats faussement négatifs (ponction zone inflammatoires péri-tumoral ou graisse péri-nucléaire). Ainsi, le pathologiste doit réaliser plusieurs ponctions pour minimiser les risques d'erreurs.

Il faut donc bien connaître les possibilités et les limites d'interprétation des examens cytologiques afin d'éviter ses pièges.

2. Apport diagnostique de la cytologie

Le cytopathologiste souhaite par l'examen cytologique identifier s'il s'agit d'un processus néoplasique, inflammatoire ou infectieux en premier lieu, puis s'il s'agit d'une tumeur, il essayera de déterminer la nature des cellules qu'il observe et d'en tirer si possible une conclusion sur la malignité de la néoplasie. Toutes ces informations peuvent être obtenues, d'autant plus pour les prélèvements de bonne qualité. Et dans les cas où d'autres examens complémentaires sont nécessaires pour affirmer un diagnostic de suspicion, la cytologie orientera le clinicien pour les choisir.

Pour un cytopathologiste expérimenté et prudent, les erreurs sont peu fréquentes, au pire la cytologie n'apportera aucune information.

Dans les cas où le matériel cellulaire est suffisant, la cytologie permet généralement des diagnostics de quasi-certitude : lymphomes, mastocytomes mélanomes, lipomes, ect... et une bonne fiabilité des degrés de malignité.

Dans certains cas, l'examen cytologique permet au clinicien d'écarter quelques hypothèses et de limiter le cercle de suspicion : par exemple pour une masse sous cutané, une cytoponction pourra éliminer en premier lieu l'hypothèse d'un abcès, d'un hématome ou d'un kyste et d'éviter des examens plus approfondis, par exemple de le cas d'un mastocytome cutané les principaux sites métastatiques sont les nœuds lymphatiques de drainage, le foie, la rate et la moelle osseuse. Les métastases pulmonaires sont rares. Le bilan d'extension doit donc comprendre un examen cytologique par ponction du foie, de la rate et des nœuds lymphatiques, un bilan sanguin (qui peut révéler une anémie, une éosinophilie), un myélogramme et une échographie abdominale (foie, rate, nœuds lymphatiques internes).

L'examen cytologique du nœud lymphatique loco-régional est un examen indispensable à cause des métastases ganglionnaires fréquentes. L'absence de métastase à ce niveau permet d'exclure avec une quasi certitude l'existence d'autres métastases à distance. La cytoponction du nœud lymphatique de drainage doit donc être systématique lors du bilan d'extension **(Huet et coll., 2009)**.

La détermination du type cellulaire est un défi pour le cytopathologiste, ce n'est pas toujours facile à déterminer. Certaines tumeurs sont classées dans un groupe plus ou moins homogène : « tumeurs à cellules fusiformes », « adénocarcinomes », etc..., d'autres sont tout simplement attribués à une conclusion générale telles que « tumeur maligne à cellules rondes ».

Dans certains cas où l'histologie est irréalisable (dans le cas de lésions extrêmement nécrotiques, site difficile à biopsier ...), la cytologie pourra être le seul recours au pathologiste et pourra conclure au diagnostic définitif.

3. Apport pronostique de la cytologie

L'association d'un bon examen cytologique qui permet au pathologiste de conclure un diagnostic précis d'une tumeur et de préciser le degré de malignité, d'un examen clinique approfondi de l'animal et d'une bonne connaissance des commémoratifs permet au pathologiste d'en déduire un pronostic. De plus, un bilan d'extension loco-régional et à distance peuvent être déterminés par ponctions de nœuds lymphatique ou par l'analyse cytologique d'un liquide d'épanchement, par la réalisation d'un myélogramme ou des ponctions échoguidées.

Lors d'une laparotomie exploratrice, et en présence de plusieurs lésions suspectes sur différents organes, le pathologiste peut éviter des biopsies répétées en ayant recours à des cytoponctions, minimisant ainsi les risques pour l'animal.

L'estimation du pouvoir proliférant d'une tumeur représente aussi une méthode pour obtenir des informations pronostiques. L'index mitotique et le marquage de l'antigène ki67 représentent les deux techniques utilisées en cytologie vétérinaire pour apprécier ce pouvoir :

- L'index mitotique :

La plupart des cancers ont un grand nombre de cellules en division. L'index mitotique, défini par le nombre de mitoses par unité de champs microscopique à un grossissement donné, contribue à l'évaluation pronostique de certaines tumeurs. En fait, tous les cancers n'ont pas un index mitotique élevé, de même que nombreuses mitoses peuvent être observées en pathologie non tumorale. Cependant, dans certains types de tumeurs, le diagnostic de malignité est fondé sur cet index mitotique (**Andrieu et coll., 1997**).

- Le marquage de l'antigène ki67 :

C'est un antigène exprimé par les cellules, au niveau du noyau des cellules prolifératives, en phase G1, S, G2 et M. en cytologie, cet index permet au pathologiste, dans certains cas de classer les tumeurs en tumeurs de bas grade (ki67 faible) ou de haut grade (ki67 élevé).

4. Apport thérapeutique de la cytologie

Le pathologiste peut arriver à établir un diagnostic, à préciser un pronostic et à planifier une stratégie thérapeutique grâce à l'examen cytologique seul. La cytologie peut servir à :

- Décider de procéder ou non à une exérèse chirurgicale.
- Choisir la thérapeutique la plus convenable au processus tumoral : une exérèse chirurgicale seule (rhabdomyosarcome), une exérèse chirurgicale associée à une chimiothérapie (carcinome mammaire), ou à une radiothérapie (mastocytome de grade II), ou une thérapie strictement médicale (lymphome).
- Présumer la réponse du néoplasme vis-à-vis d'une éventuelle chimiothérapie : si l'index ki67 est faible, la tumeur sera sans doute peu chimiosensible, alors qu'en revanche, si cet index est élevé il faudra prévoir l'éventualité d'un syndrome de lyse tumorale aiguë.
- Donner des conseils vis-à-vis de l'ampleur de l'exérèse chirurgicale (par exemple au moins 3 cm pour un mastocytome).

Vue son caractère peu invasif, la cytologie est conseillée pour le contrôle post-thérapeutique pour la détection d'éventuels récidives ou métastases.

Pour conclure, dans la majorité des cas, les clés de réussite d'un examen cytologique ne sont que la réalisation de bons prélèvements et un œil expérimenté du pathologiste.

La cytologie gagne une place de plus en plus importante en anatomo-pathologie canine vu ses nombreux avantages malgré que certaines limites existent toujours d'où l'intérêt de l'examen histologique objet de la deuxième partie de notre thèse.

PARTIE II :

L'EXAMEN HISTOLOGIQUE EN

ONCOLOGIE CANINE

« Histologie » signifie étymologiquement « science des tissus ». Le concept de tissu, de derme, a été inauguré fin XVII^{ème}/début XVIII^{ème} par Xavier Bichat, sans microscope. Ce concept a été élaboré grâce à ses travaux de dissection anatomique.

A partir du début du XIX^{ème} siècle, et surtout vers 1840, le microscope optique est perfectionné et l'optique bénéficie de grandes améliorations. Des lentilles beaucoup plus performantes sont fabriquées, ce qui permet d'obtenir des images beaucoup plus proches de la réalité. C'est à cette époque que les techniques histologiques se mettent en place.

L'examen histopathologique est un examen médical invasif permettant, à partir d'un prélèvement tissulaire ayant subi une technique de préparation histologique en laboratoire, d'obtenir des lames histologiques qui seront ensuite analysées par un médecin ou un vétérinaire spécialisé en anatomie pathologique (appelé anatomopathologiste ou, plus communément, pathologiste). Après lecture et interprétation, ce dernier fournit un ou plusieurs diagnostics morphologiques qui serviront à poser un diagnostic final et à établir un pronostic.

I. TECHNIQUES EN HISTO-PATHOLOGIE

1. Technique de préparation standard en histopathologie : l'inclusion en paraffine

1.1. Prélèvement

En histologie, le prélèvement peut se faire sur un cadavre (le plus rapidement possible après le décès), sur pièces opératoires ou encore après une biopsie. On utilise des instruments bien tranchants (le Scalpel), afin de ne pas écraser les tissus et donc d'éviter la formation d'artefacts.

1.2. Fixation

Le but de la fixation est de conserver les structures. En effet, le prélèvement des tissus provoque leur mort : les cellules déversent leurs enzymes, ce qui provoque une autodigestion du tissu. De plus, à l'air ambiant, les prélèvements peuvent être contaminés par des bactéries, ce qui entraîne une putréfaction des tissus (**Michael et Wojciech, 2011**).

Le fixateur le plus commun et le plus utilisé dans le monde est le formol (formaldéhyde à 37%), à différents dilutions (**Michael et Wojciech, 2011**).en deuxième position on trouve le liquide de Bouin (mélange de formol et d'acide picrique) dont l'utilisation est aussi fréquente (**Bacha et Bacha, 2012**).

La fixation présente plusieurs avantages, elle permet une immobilisation des constituants tissulaires/cellulaires, elle prévient l'autolyse cellulaire et la putréfaction bactérienne post-mortem et permet la technique histologique et les colorations ultérieures. (**Michael et Wojciech, 2011**).

La durée de fixation est variable et la quantité de fixateur utilisée doit être au moins dix fois plus importante que le volume de tissu à fixer : quelques heures suffisent donc pour fixer les petits fragments.

En pratique, On commence d'abord par une préfixation qui consiste à mettre le prélèvement dès son arrivée dans du formol à 10% pendant au moins 24 heures, ensuite on l'enlève du fixateur et on procède à la coupe d'un petit morceau de 0,5 cm. Enfin la fixation proprement dite consiste à déposer le petit morceau dans du formol à 10% pendant 24 heures.

1.3. Déshydratation et inclusion à la paraffine

Pour que la lumière puisse passer à travers le tissu à examiner, celui-ci doit être très fin. Or les tissus sont mous, il faut donc leur donner une consistance solide. C'est le principe de l'inclusion : l'inclusion en paraffine consiste à infiltrer et à enrober les tissus à examiner avec de la paraffine.

Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant (70°, 80°, 90°, 95°, 99°, puis enfin 100°) puis L'alcool (éthanol) est ensuite remplacé par un solvant miscible à la paraffine : il s'agit soit de xylène, soit de toluène (hydrocarbures). Ces substances éliminent l'éthanol (**Bacha et Bacha, 2012**).

En pratique, on utilise un automate formé de 12 bacs dans lesquels se trouvent des solutions différentes. Les cassettes sont placées dans le premier bac puis automatiquement elles changent de bac toutes les 2 h. Dans cet appareil les prélèvements passent d'un bain à l'autre pendant une période totale de 20 à 24 heures.

Ensuite, on le fait coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage à 56°C et devenue liquide, la chaleur provoque l'évaporation du solvant (et sa dissolution dans la paraffine) : les espaces ainsi libérés sont remplis par la paraffine. Puis la paraffine est placée dans de petits moules, à température ambiante, ce qui provoque son durcissement et donc la rigidification des fragments tissulaires prélevés. On procède alors au démoulage : on obtient des fragments tissulaires inclus dans un bloc de paraffine.

Dans certains cas, on utilise d'autres milieux d'inclusion comme la résine qui permet de coupe plus fines pouvant atteindre 0,5 à 2 µm (**Stevens et Lowe, 1997**).

1.4. Coupe des blocs et collage des coupes

On isole ensuite des coupes dans le bloc de paraffine. On utilise pour cela un microtome, qui fait avancer le bloc sur un rasoir. En microscopie optique classique, les coupes faites suite à l'inclusion à la paraffine mesurent de 2 à 7 µm (**Stevens et Lowe, 1997**).

Chaque section successive adhère à la précédente, d'où la formation d'un ruban continu dans lequel on retrouve des coupes sériées de prélèvement tissulaire (**Bacha et Bacha, 2012**).

1.5. Etalement et collage des coupes sur des lames de verre

Par la suite, une ou plusieurs sections sont soigneusement séparées du ruban et transférées à la surface de l'eau chaude dans un bain marie à 37°C. Cela adoucit la paraffine et aplatit la section et élimine des rides. La section aplatie est flottée sur une lame, qui est ensuite placée sur une plaque chauffante à 56°C pour que la préparation sèche et la section adhère à la surface de la lame (**Bacha et Bacha, 2012**).

1.6. Déparaffinage et réhydratation

En effet, la paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes nécessite un déparaffinage et de réhydratation. Cette étape est assurée par une succession de bains, d'abord dans un solvant permettant l'élimination de la paraffine (toluène ou xylène) puis dans des alcools de titre décroissant, de 100% (compatible avec le solvant précédent) jusqu'à 70% (compatible avec l'eau), avant un bain dans l'eau pure assurant la réhydratation finale. (**Michael et Wojciech, 2011**) Chaque bain dans un solvant est fait dans un flacon cylindrique adapté appelé tube de Borel mais n'importe quel flacon cylindrique fait l'affaire.

1.7. Coloration

Les tissus de l'organisme ne sont pas spontanément colorés, ce qui rend les observations difficiles. De ce fait, les coupes doivent être colorées pour être visibles (**Stevens et Lowe, 1997**). Les colorants utilisés en histologie sont plus ou moins sélectifs. La plupart sont des composants acides ou basiques en milieu aqueux qui forment des sels avec les radicaux ionisés des tissus. Des composants acides sont utilisés pour les zones tissulaires basophiles, et des composants basiques sont utilisés pour les zones tissulaires acidophiles.

On distingue les colorations standards et les colorations spéciales. Les colorations standards utilisent les mêmes colorants que l'industrie textiles, les colorations spéciales sont utilisées pour mettre en évidence des constituants enzymatiques ou chimiques intracellulaires particuliers (**Stevens et Lowe, 1997**).

1.7.1. Coloration à l'Hématéine Eosine (H.E.)

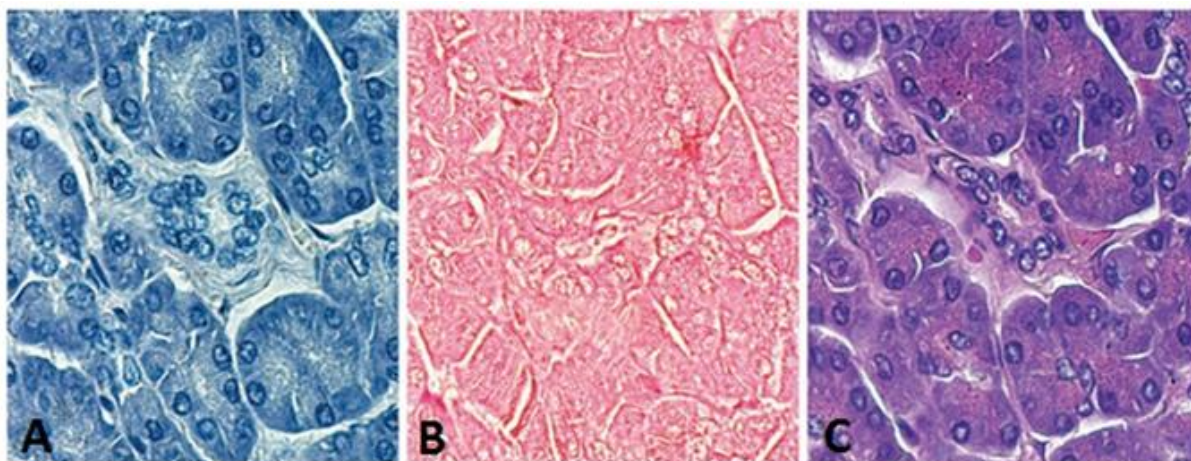
L'Hématéine Eosine (H.E.) associe l'hématéine qui colore les noyaux en violet et l'éosine qui colore les cytoplasmes en rose. (**Bacha et Bacha, 2012**).

La coloration à l'hématoxyline seulement donne une coloration globale générale de l'échantillon, les composants et les structures qui ont une forte affinité pour le colorant sont plus fortement teintés, par exemple, l'ADN et les zones cytoplasmiques de la cellule contenant des composants nucléaires d'ARN. L'utilisation de l'éosine, la coloration de contraste, a également un effet global de coloration lorsqu'il est utilisé seul. Cependant, les noyaux sont moins visibles que dans l'échantillon coloré à l'hématoxyline seul.

La meilleure visualisation de toutes les structures est obtenue après une coloration combinée de H & E [**Figure 16**].

Méthode :

- Rinçage des lames à l'eau distillée- hydratation des lames
- Coloration par l'hématoxyline de Hains fraîchement filtrée (15 secondes)
- Rinçage à l'eau courante
- Immersion dans de l'eau ammoniacale (5 gouttes d' NH_3 dans 300 ml d'eau de robinet) 10 secondes ou plus, jusqu'à ce que la section soit macroscopiquement bleue
- Rinçage à l'eau courante
- Contre-coloration à l'éosine (10 secondes) (**Challis, 1997**).



A : Coloration à l'hématoxyline seulement ; B : L'effet de la coloration à l'éosine seulement ;
C : L'effet de coloration combinée de H & E.

Figure 16 : Effet de la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine utilisés seuls et celle de l'hématoxyline et l'éosine utilisés en combinaison (série d'échantillons du pancréas (sections adjacentes), chien) (Michael et Wojciech, 2011)

1.7.2. Coloration à l'Hématéine-Eosine-Safran (H.E.S)

Les colorations trichromiques usuelles sont l'Hématéine-Eosine-Safran (H.E.S.) par ajout de safran colorant en jaune les fibres de collagène, et le trichrome de Masson (TM) qui associe un colorant nucléaire (hématoxyline), un colorant cytoplasmique et un colorant bleu ou vert colorant les fibres de collagène.

1.7.3. Coloration à l'Acide Périodique de Schiff (A.P.S. ou P.A.S.)

Cette coloration permet la mise en évidence des glucides complexes (mucus des cellules mucipares, glycoprotéines des basales et du glycocalyx des bordures en brosse) et du glycogène. L'acide périodique entraîne une oxydation des glucides (libération de fonctions aldéhyde) permettant au réactif de Schiff de se fixer et de les colorer en rouge-pourpre. Une contre-coloration est effectuée pour visualiser l'ensemble de la préparation.

1.7.4. Giemsa

C'est un colorant spécifique des acides nucléiques, constitué d'un mélange de deux colorants (bleu de méthylène et éosine) qui donne une coloration violette aux territoires riches en acides nucléiques. Cette coloration met aussi en évidence les granulations des mastocytes.

1.8. Déshydratation

Opération inverse de celle menée au début, avant de pouvoir faire le montage dans la résine qui est hydrophobe (par bains d'alcool de degré croissant puis bains de toluène).

1.9. Montage

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. On dispose alors d'une « préparation microscopique » (simplement appelée « lame » dans le langage courant) prête à être observée au MO.

Le délai moyen requis entre la soumission du prélèvement et la lecture de la lame est de 23 minutes (**Whitehair et coll., 1993**).

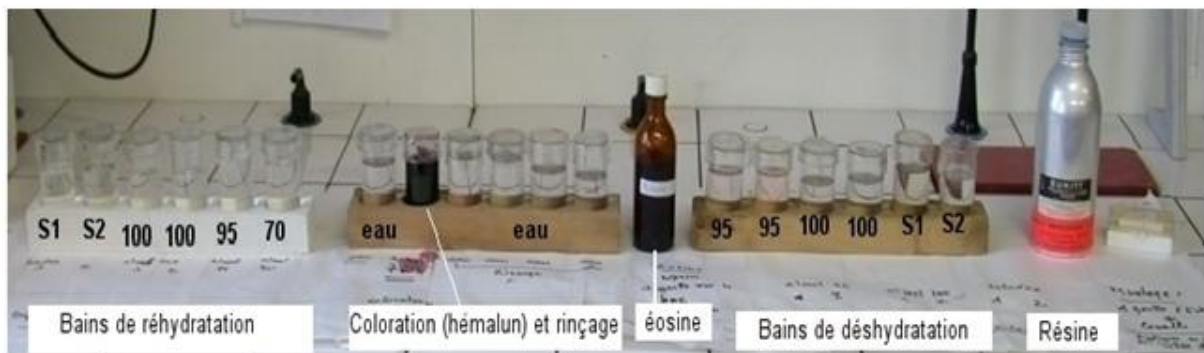


Photo 5 : Bains, colorants et résine de montage
(<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/histo.htm>)

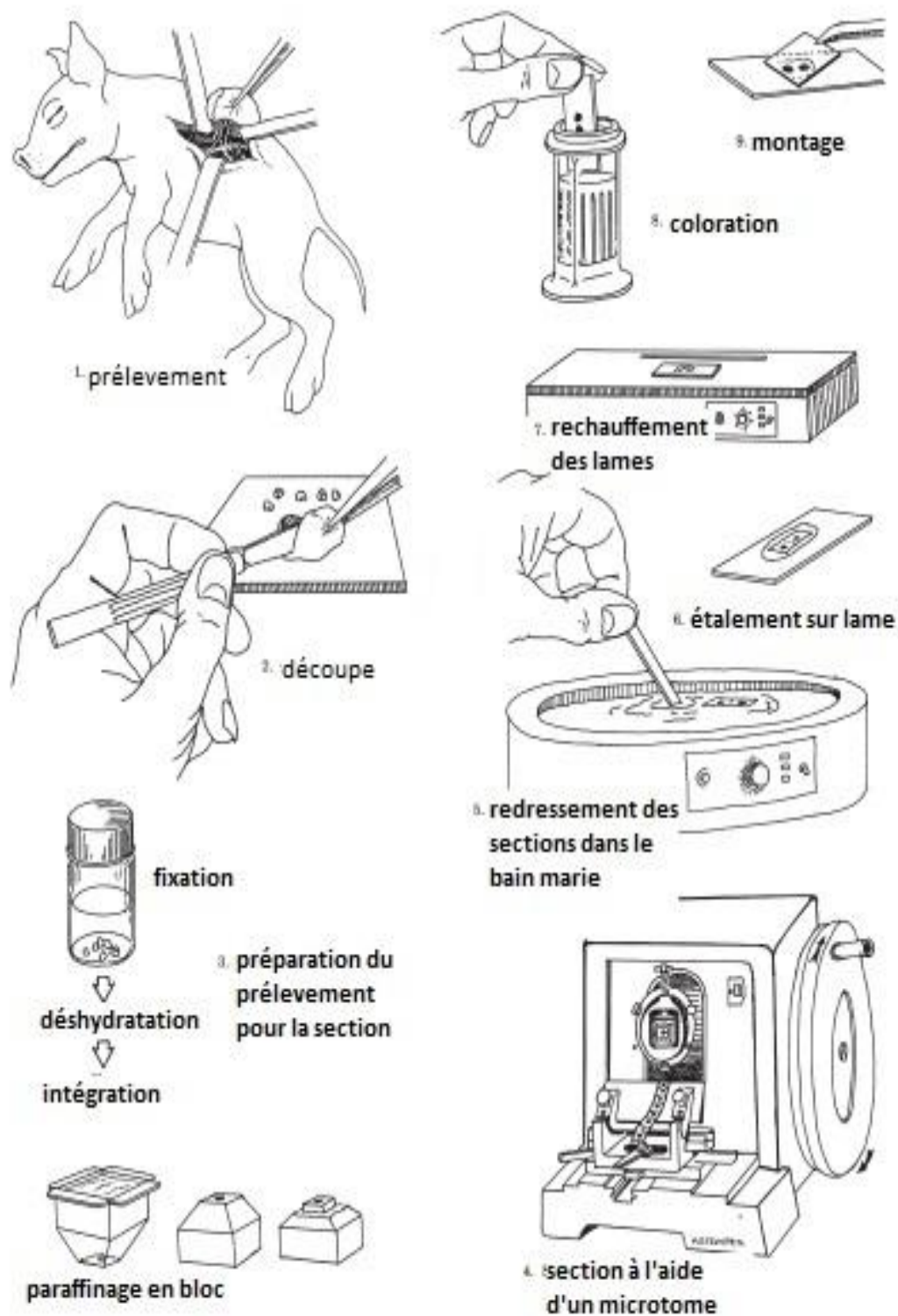


Figure 17 : Différentes étapes de préparation d'une lame histologique par la méthode de paraffine (Bacha et Bacha, 2012)

2. Techniques complémentaires en histologie : techniques spéciales de détection *in situ*

2.1. Enzymologie et immunohistochimie

Des techniques enzymatiques et immunohistochimiques rendent plus aisée l'identification du type cellulaire impliqué dans un infiltrat ou un néoplasme. Le tableau 6 présente les principaux marqueurs disponibles pour reconnaître les différentes cellules [Tableau 6].

Tableau VI : Exemples de marqueurs utilisés afin d'identifier le type cellulaire (Moore et Rosin, 1986 ; Scott et coll., 2001)

Marqueur cellulaire	Type cellulaire identifié
α naphthyl acétate estérase chloracétate estérase phosphatase acide estérase non spécifique lysozyme α -1-antitrypsine α -1-antichymotrypsine 5'nucléotidase	monocyte, histiocyte, plasmocyte, c. de Langerhans neutrophiles, mastocytes monocyte, histiocyte, plasmocyte monocyte, histiocyte monocyte, histiocyte (macrophage++), c. bronchique et rénale, glande mammaire monocyte, histiocyte macrophage, c. du tractus gastro-intestinal cellules endothéliales
Immunohistochimie Cytokératine Vimentine Desmine Protéine S100 Myoglobine Laminine	Epithéliums squameux et glandulaires Fibroblastes, c. de Schwann, c. endothéliales, lymphocyte, monocyte, histiocyte, mélanocyte, c. de Langerhans muscles lisses et striés mélanocyte, c. du tissu nerveux, c. de Langerhans, c. myoépithéliale, canaux et glandes sudoripares muscle strié membrane basale

L'immunohistochimie consiste à détecter dans les tissus, le site de la liaison d'un anticorps spécifique avec la protéine contre laquelle il est dirigé. Les anticorps spécifiques

sont polyclonaux ou monoclonaux. La spécificité des anticorps monoclonaux est supérieure à celle des sérums polyclonaux, mais leur sensibilité peut être inférieure. Les modes de révélation de la liaison antigène-anticorps sont nombreux. Il existe de nombreuses variantes techniques correspondant aux différents modes de révélation de la liaison antigène-anticorps ou à des procédés permettant d'améliorer la qualité des résultats. Parmi ces derniers, l'utilisation d'un anticorps secondaire réagissant avec l'anticorps primaire et/ou le démasquage de sites antigéniques grâce à une digestion par une enzyme protéolytique et/ou le chauffage des lames au four à micro-ondes.

Il existe quatre indications essentielles en cancérologie :

- Le diagnostic
- La recherche de cancer primitif
- La recherche de facteurs pronostiques
- La recherche de facteurs prédictifs de la réponse aux traitements.

2.2. Immunophénotypage

La technique d'immunophénotypage fait appel à l'utilisation d'anticorps qui se fixent sur les antigènes cellulaires. Elle permet de caractériser les différents types de lymphocytes (cytotoxiques, auxiliaires...), les cellules présentant l'antigène et les macrophages, mais n'indique pas si les cellules concernées sont ou non néoplasiques. Elle s'utilise donc en complément de l'étude histologique traditionnelle. Cette technique s'utilise dans l'idéal sur des coupes de tissus congelés, sur des frottis cellulaires ou sanguins non fixés, ou sur des fluides (sang principalement). Malheureusement, l'acheminement des prélèvements congelés est un peu compliqué à mettre en œuvre. C'est pourquoi, elle est dans certains cas pratiquée, par défaut, sur des tissus fixés dans le formol. Or cette substance modifie la structure des protéines. Certains antigènes ne sont donc plus identifiables par les anticorps. L'efficacité de la technique est alors réduite.

L'utilisation de l'immunomarquage est essentielle au diagnostic différentiel de certaines affections d'aspect histologique très semblable. En oncologie canine, elle est surtout utilisée pour la classification des lymphomes canins (**Brousse et coll., 1997 ; Harris et coll., 2001**).

Des anticorps, capables de détecter des marqueurs spécifiques (antigènes de différenciation, immunoglobulines de surface...) des lymphocytes canins, permettent de différencier les lymphomes B, T et nul.

Le marquage des lymphocytes B est fondé principalement sur l'identification de la molécule CD79a par des anticorps monoclonaux anti-CD79. Le marquage des lymphocytes T est réalisé par un anticorps polyclonal anti-CD3 dirigé contre la molécule CD3. Il existe de nombreux marqueurs [Tableau 7] (Teske et coll., 1994 a ; Fournel et coll., 1997 a ; Kiupel et coll., 1999 ; Ponce et coll., 2004).

Tableau VII : Principaux marqueurs cellulaires employés chez le chien

Antigène	Spécificité cellulaire	Références
CD3	Tous les lymphocytes T	Ferrer et coll., 1992 Fisher et coll., 1995
CD4	Lymphocytes T helper	Chabanne et coll., 1994 Fisher et coll., 1995
CD8	Lymphocytes T cytotoxiques	Chabanne et coll., 1994 Fisher et coll., 1995
CD21	Lymphocytes B matures	Moore et coll., 1990 Fisher et coll., 1995 Teske et coll., 1994 a
CD34	Précurseurs hématopoïétiques B	Gelain et coll., 2008
CD79a	Lymphocytes B tous stades	Jones et coll., 1993 Fournel et coll., 2002
CD18	Leucocytes	Gelain et coll., 2008
CD45	Leucocytes	Caniatti et coll., 1996 Fisher et coll., 1995 Vernau et coll., 1999
CD14	Leucocytes et monocytes	Brodersen et coll., 1998
Ig (chaîne légère)	Lymphocytes B matures	Sandusky et coll., 1986

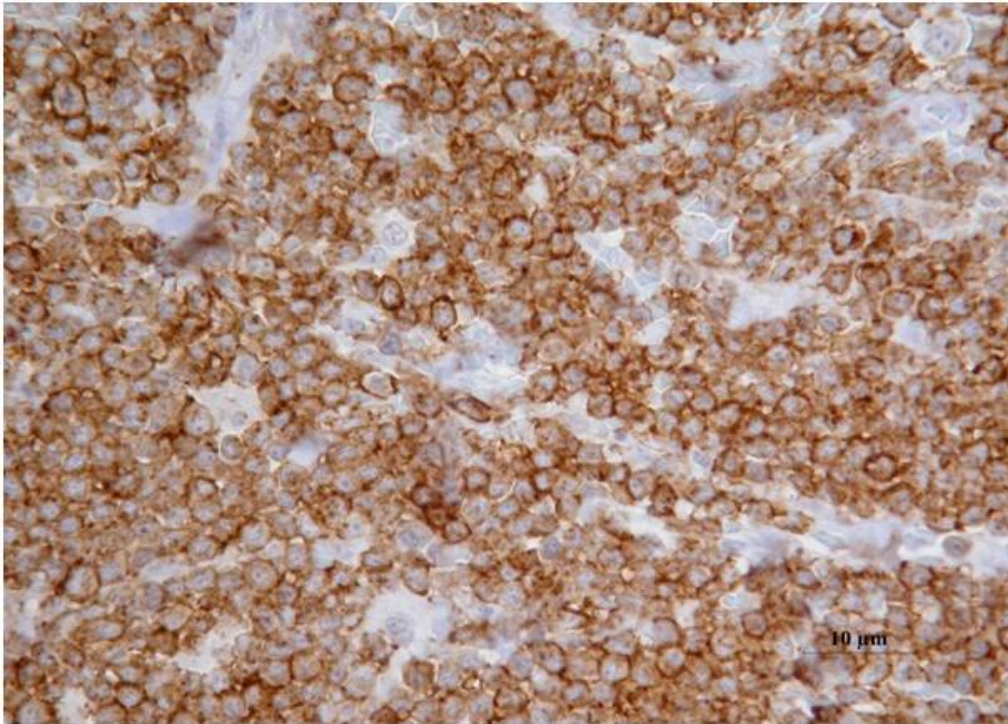


Figure 18 : Immunophénotypage (lymphome canin, nœud lymphatique, chien) : Notez la surface uniforme des cellules suite à l'expression des CD79a spécifiques aux cellules B (CD79 a/ DAB; HP oil, X 200) (Raskin et Meyer, 2010)

L'immunophénotypage a permis de faire progresser nos connaissances concernant les tumeurs canines. Cependant, malgré son apport précieux dans le domaine du diagnostic et du pronostic, cette technique est encore réservée, dans le domaine vétérinaire, à quelques laboratoires spécialisés (**Moore et coll., 2000**). En pratique, elle est utilisée en recherche fondamentale pour élucider la pathogénie des désordres prolifératifs (lymphocytaires ou histiocytaires), mais son coût élevé la rend peu utilisable dans le domaine du diagnostic vétérinaire.

3. Difficultés d'interprétation : artéfacts

Il faut se méfier des artéfacts, images artificielles créées par la technique. Dans une préparation histologique de routine, il peut exister des artéfacts de prélèvement (pinces, ciseaux, coagulation, gelures), de fixation (dessèchement, retard de fixation, fixateur trop ou trop peu concentré), d'inclusion (vides artificiels dus à la rétraction des cellules ou des tissus), de coupe (stries de rasoir, coupes trop épaisses ou trop minces), de collage (décollements, plis

et replis de la coupe), de montage (bulles d'air entre la lame et la lamelle), de coloration (empâtements, dépôts, taches de colorant) [Figures 19, 20].

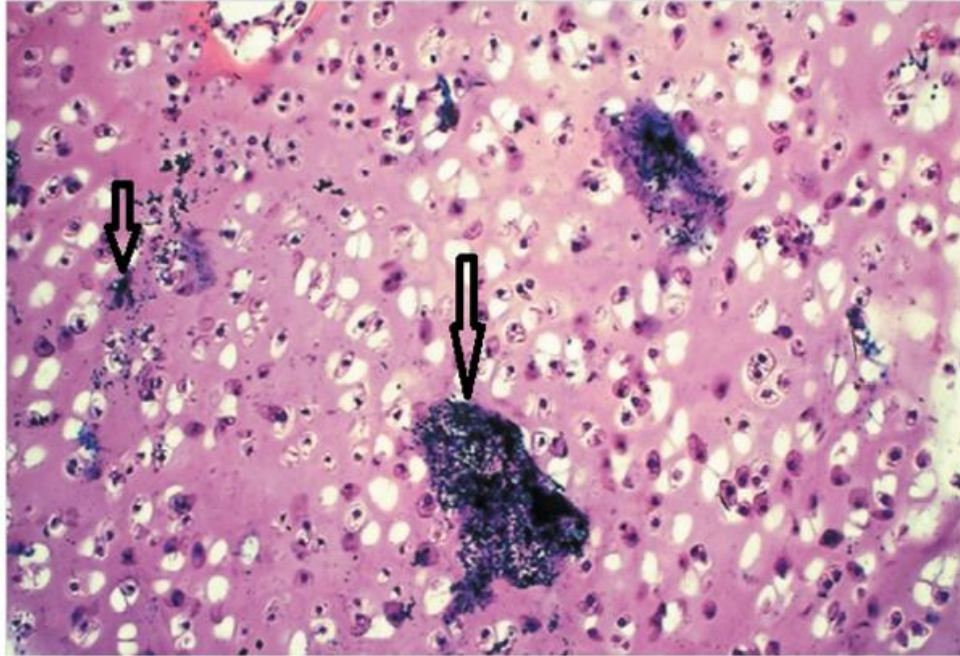


Figure 19 : Exemple d'artefact : dépôts de colorant (Cartilage, chien) : Notez la présence d'une tache de colorant sur la lame (flèches) (HE, X 400) (Bacha et Bacha, 2012)

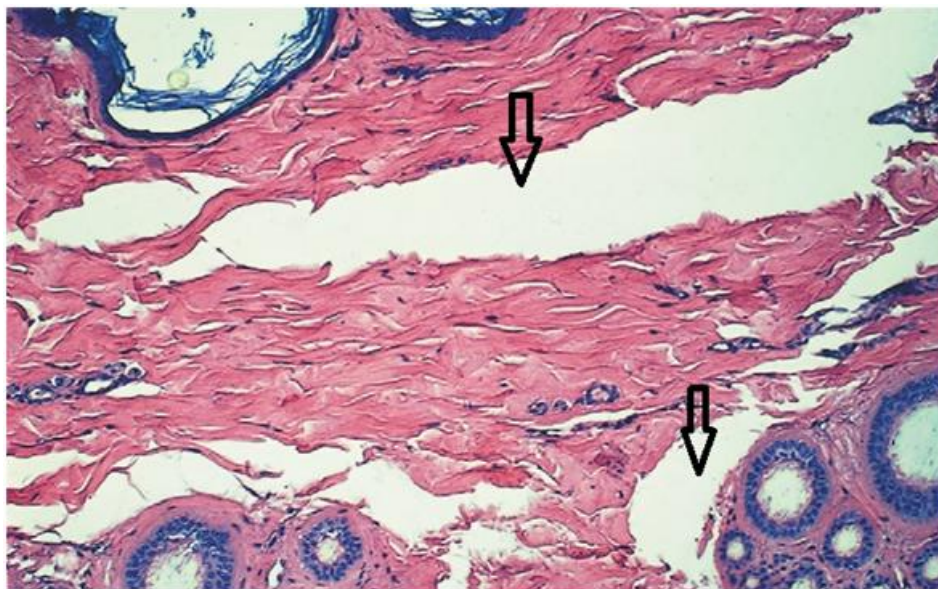


Figure 20 : Exemple d'artefact : séparation, espace (Peau, chien) : Notez la présence d'un espace vide (flèches) (HE, X 400) (Bacha et Bacha, 2012)

II. APPLICATIONS GENERALES ET EFFICACITE DIAGNOSTIC

L'ensemble des composants de chaque tumeur (cellules tumorales et stroma) est responsable d'aspects particuliers qui peuvent être regroupés par types histologiques. Les tumeurs d'un même type présentent des critères histologiques communs, définis dans des manuels d'histopathologie (notamment de l'Organisation Mondiale de la Santé).

La reconnaissance de ces critères et le classement de la tumeur dans le type correspondant est à la base du diagnostic anatomopathologique de toute tumeur.

1. Diagnostic histologique d'une tumeur

Le diagnostic histologique est reflété par les critères topographiques de la tumeur auquel s'ajoutent les critères morphologiques, complétés par des critères d'agressivité.

1.1. Critères topographiques

Les tumeurs peuvent être classifiées de plusieurs façons ; toutefois, pour les cliniciens et les registres de cancers, une des plus important items de l'information, est la topographie de la tumeur (siège anatomique).

L'infiltration est par contre, le critère architectural le plus important de la malignité. L'infiltration s'adresse soit aux éléments périphériques de la tumeur, soit aux vaisseaux surtout lymphatiques où l'effraction aboutit à la formation d'emboles.

Par exemple pour les lymphomes cutanés chez le chien, la discussion est différente selon la topographie des infiltrats : On distingue alors le lymphome cutané épithéliotrope à lymphocytes T (LCET) qui est une affection néoplasique rare (**Fontaine et coll., 2009**). Cette affection cutanée se caractérise par une infiltration de lymphocytes T néoplasiques ayant un tropisme particulier pour l'épiderme et ses annexes [**Figures 21, 22**] (**Goldschmidt et Shoffer, 1992 ; Scott et coll., 2001 ; Gross et coll., 2005**). Le LCET doit être différencié du lymphome cutané non épithéliotropique ou lymphome dermique (lymphome à cellules T ou B) [**Figure 23**]. Ce lymphome non épithéliotropique peut être primaire (d'origine dermique) ou secondaire à la dissémination cutanée d'un lymphome systémique (**Scott et coll., 2001 ; Gross et coll., 2005**).

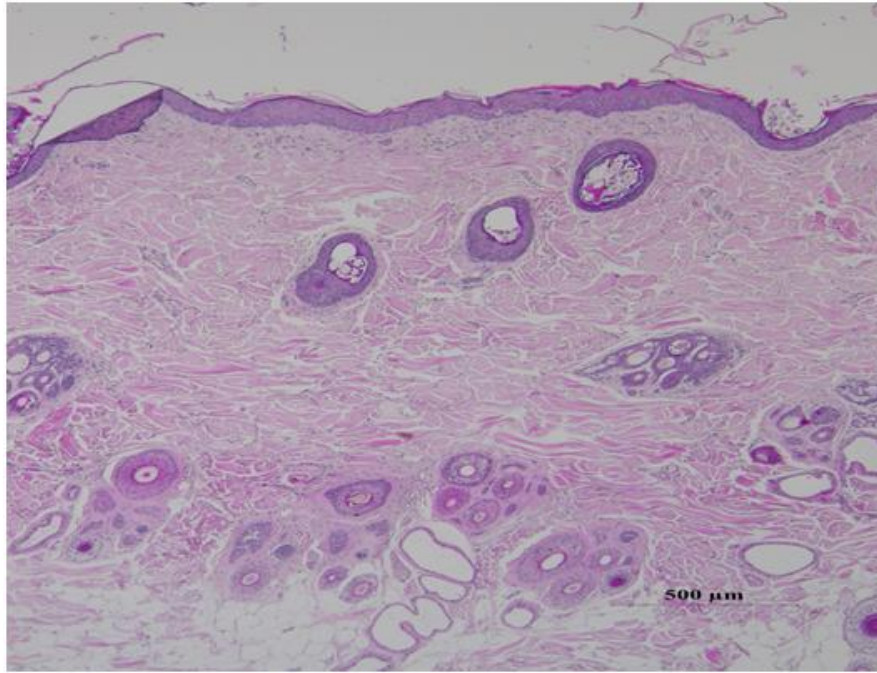


Figure 21 : Epithéliotropisme (lymphome cutané, chien) : notez la concentration des lymphocytes tumoraux au niveau de l'épiderme (HE, X 200) (Service d'anatomie pathologique de l'ENMV)

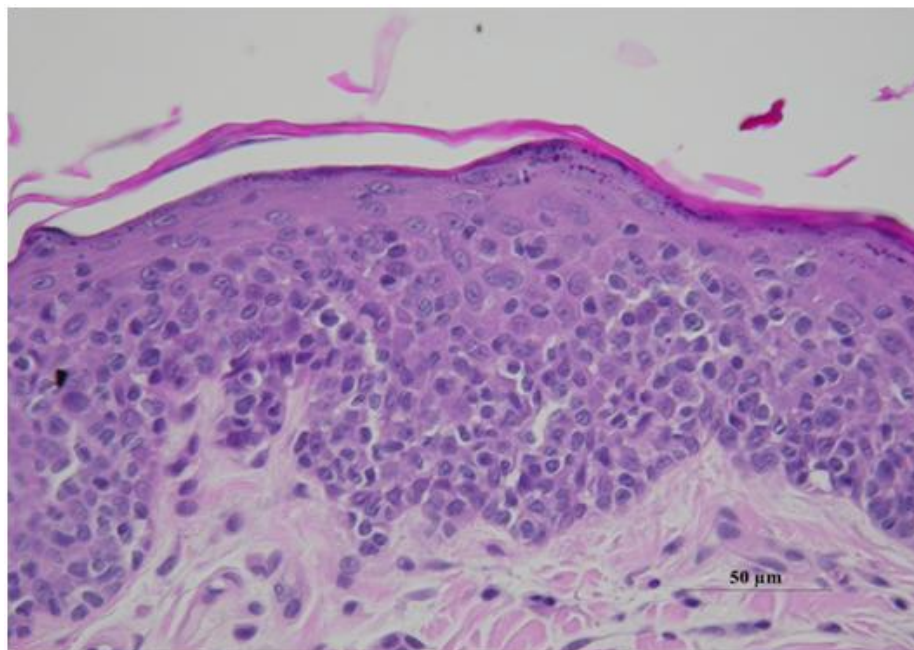
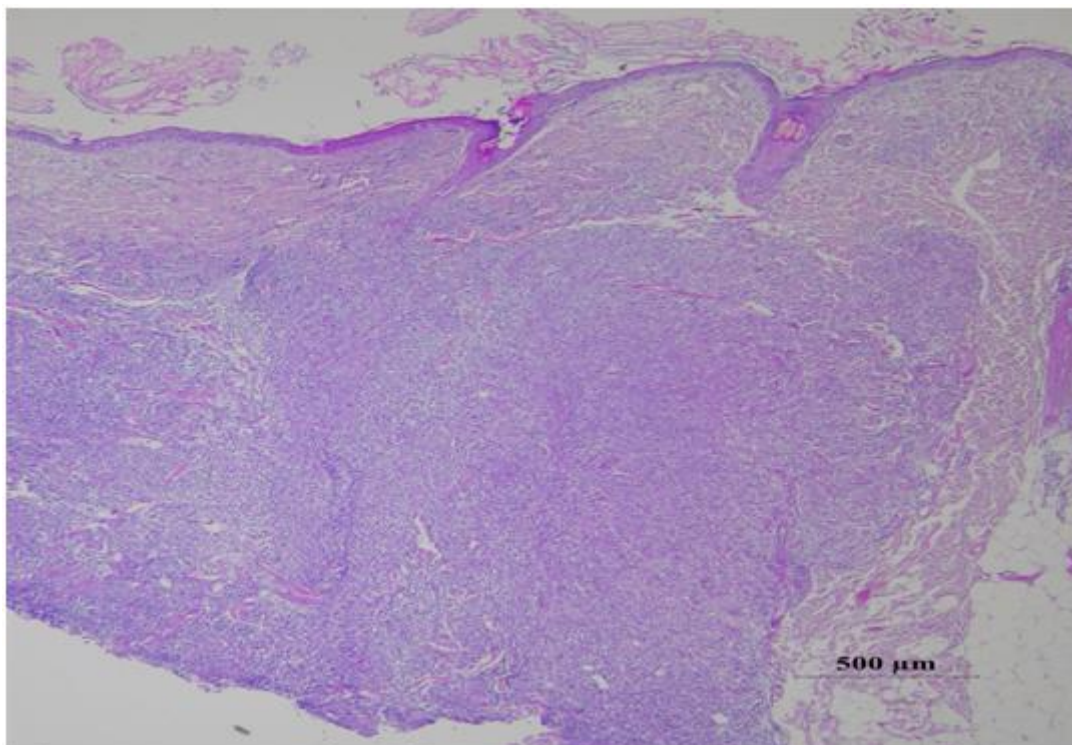


Figure 22 : Tropisme épidermique (lymphome cutané, chien) : Notez la présence de nombreux lymphocytes tumoraux en position intra-épidermique (présence de petite logettes appelées micro-abcès de Pautrier) (HE, X 400) (Service d'anatomie pathologique de l'ENMV)



**Figure 23 : Atteinte épidermique, dermique et annexielle (lymphome cutané, chien)
(HE, X 100) (Service d'anatomie pathologique de l'ENMV)**

1.2. Critères morphologiques

Il n'est pas toujours facile de distinguer une cellule maligne. En effet, il n'existe pas de critère constant de malignité. Il faut se baser sur un ensemble de critères morphologiques, en considérant d'abord la population dans son ensemble puis en examinant chaque cellule anormale avec soin.

A l'échelon cellulaire, on examine dans l'ordre : la taille des cellules, les anomalies nucléaires et enfin les modifications cytoplasmiques.

1.2.1. Taille des cellules

Dans un tissu tumoral, les cellules cancéreuses sont souvent de taille inégale entre elles : anisocytose.

La taille de la cellule suspecte est généralement augmentée et cela peut aller jusqu'au gigantisme [Figure 25] (Rubiales, 2009).

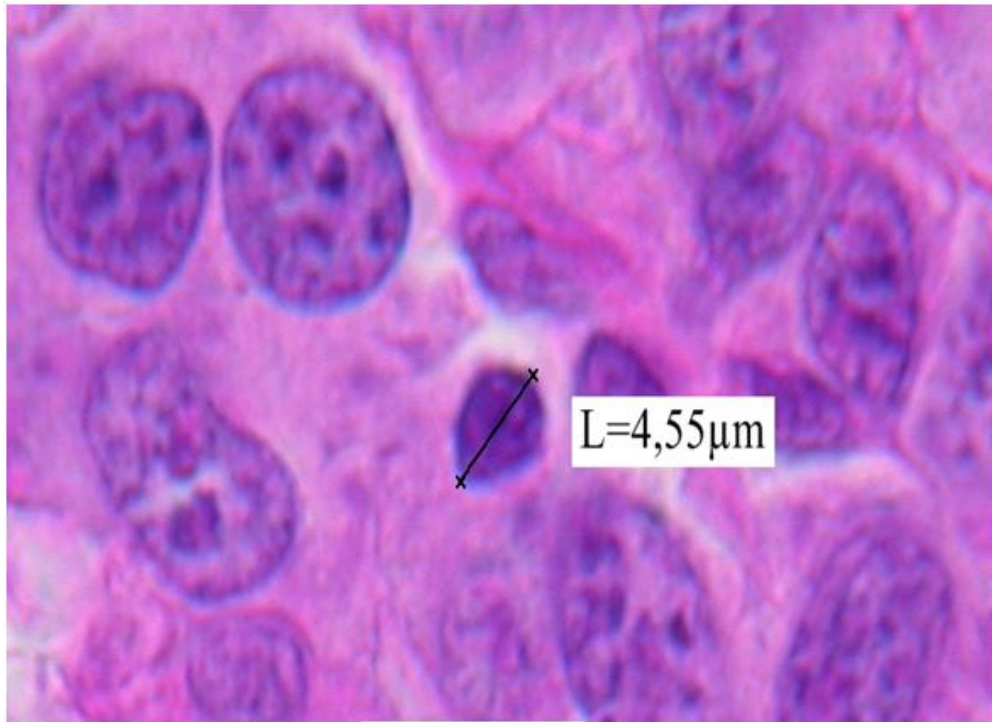


Figure 24 : Taille d'un lymphocyte réactionnel (chien, dermatite) : on note que la taille du lymphocyte réactionnel ne dépasse pas 4,5 à 5,5 μm (HE, X 1000) (Service d'anatomie pathologique de l'ENMV)

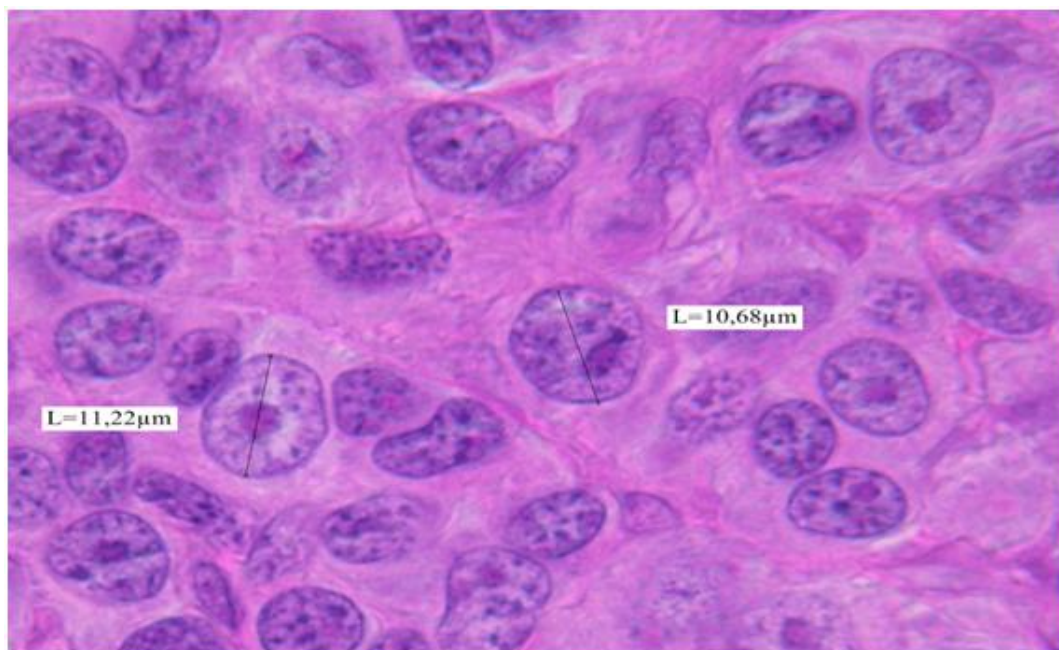


Figure 25 : Taille des cellules lymphomateuses (lymphome cutané, chien) : on note que la taille des cellules lymphomateuses peut atteindre 10,5 à 11,5 μm (HE, X 400) (Service d'anatomie pathologique de l'ENMV)

1.2.2. Forme du noyau

L'irrégularité de la forme et des contours du noyau est un critère à rechercher dans les cellules cancéreuses. Certaines cellules très actives peuvent être binucléées, d'autres, plus rares se trouvent plurinucléées [Figure 26].

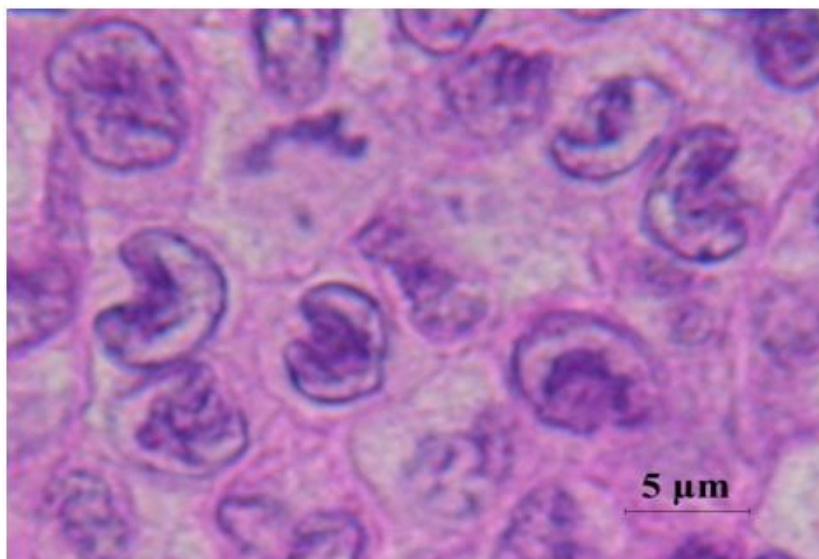


Figure 26 : Formes irrégulières des noyaux (lymphome cutané, chien) : Notez la variation des formes des noyaux (HE, X 1000) (Service d'anatomie pathologique de l'ENMV)

1.2.3. Importance de la nucléolation

L'augmentation de la taille, la multiplicité et anomalies de forme des nucléoles sont des critères de malignité [Figure 27].

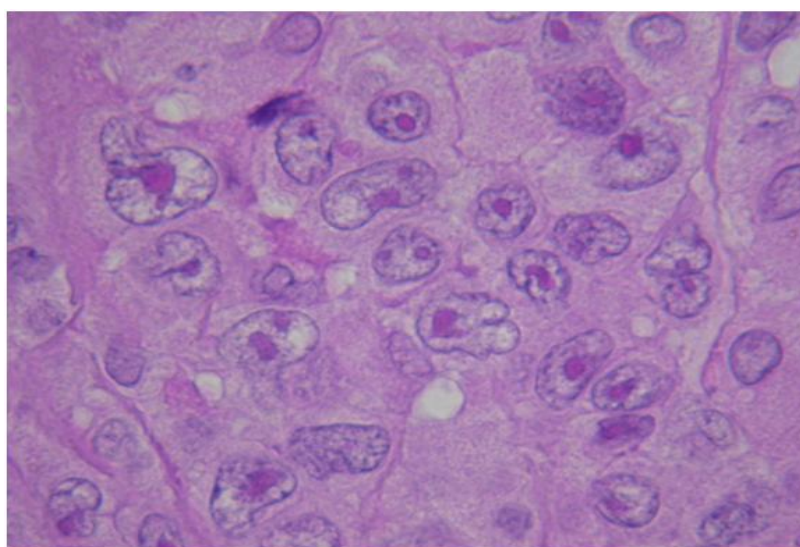


Figure 27 : Importance de la nucléolation : (lymphome cutané, chien): on note le volume important des nucléoles (HE, X 400) (Service d'anatomie pathologique de l'ENMV)

1.2.4. Aspect de la chromatine

On peut mettre en évidence un Hyperchromatisme ou euchromatisme nucléaire. La répartition de la chromatine peut varier, elle peut être distribuée en mottes grossières, finement dispersée et uniforme, grenue, réticulée... **[Figure 28]**.

On peut aussi observer une hyperchromatose marginale (irrégularité et épaissement de la bordure nucléaire).

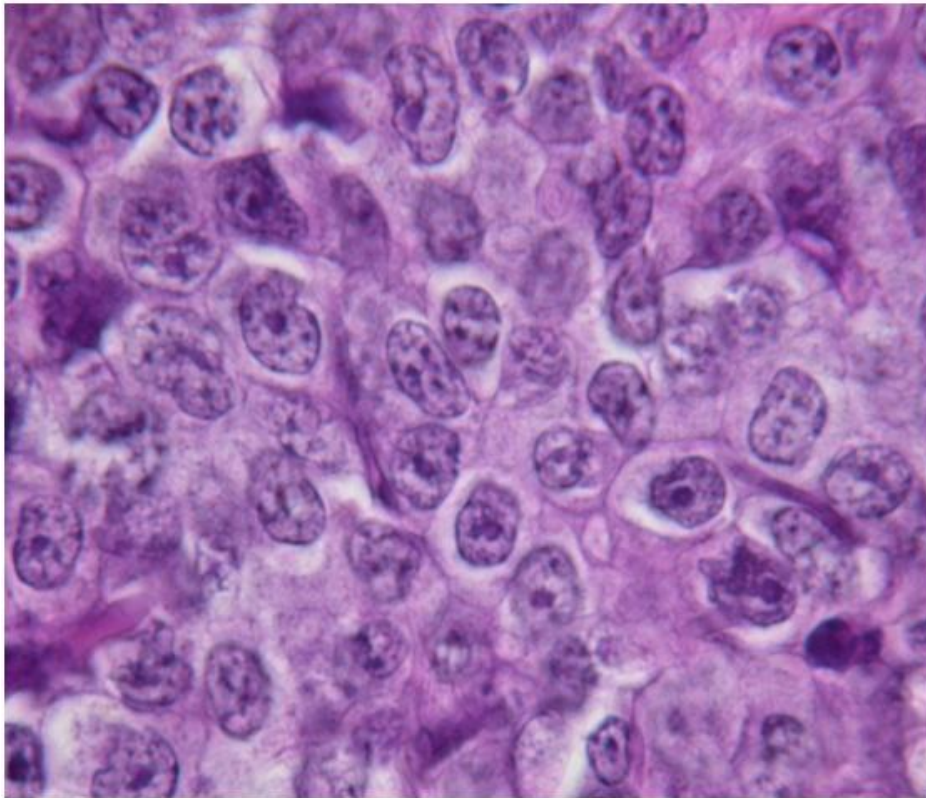


Figure 28 : Aspect de la chromatine (lymphome cutané, chien) : notez disposition en amas de la chromatine (HE, X 400) (Service d'anatomie pathologique de l'ENMV)

1.2.5. Extension du cytoplasme et ses caractéristiques tinctoriales

Les modifications cytoplasmiques sont souvent moins spécifiques mais fréquemment observées tout de même comme un cytoplasme moins abondant suite à l'augmentation du rapport nucléocytoplasmique, une exagération de la basophilie, une vacuolisation allant jusqu'à la cellule en bague à chaton, la présence de granulations atypiques **[Figure 29]**.

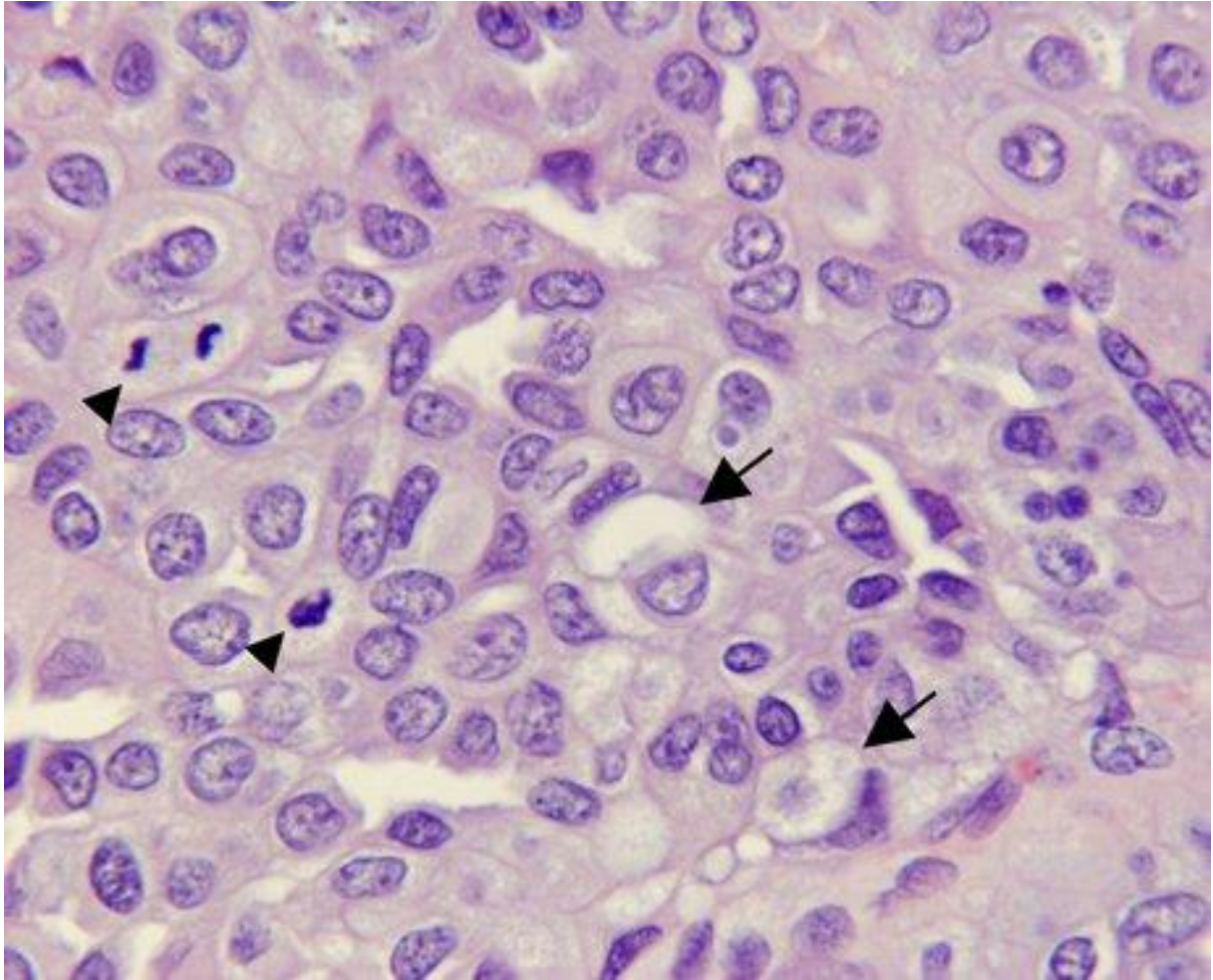


Figure 29 : Vacuoles cytoplasmiques : (tumeur rénale, chien) : Notez la présence de vacuoles cytoplasmiques et de nombreuses figures de mitose (HE X 400) (Service d'anatomie pathologique de l'ENMV)

1.3. Critères d'agressivité

1.3.1. Etude de la prolifération : techniques et intérêts en oncologie canine

1.3.1.1. Index mitotique

1.3.1.1.1. Principe général

La détermination par comptage du nombre de figures de mitose représente la méthode la plus ancienne d'évaluation de la prolifération cellulaire **[Figure 30]**. Et bien qu'aujourd'hui de très nombreuses techniques d'évaluation de la prolifération cellulaire soient 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, l'index mitotique intervient dans la quasi-totalité des systèmes de grading histopathologique des néoplasmes chez le chien (Abadie, 2003).

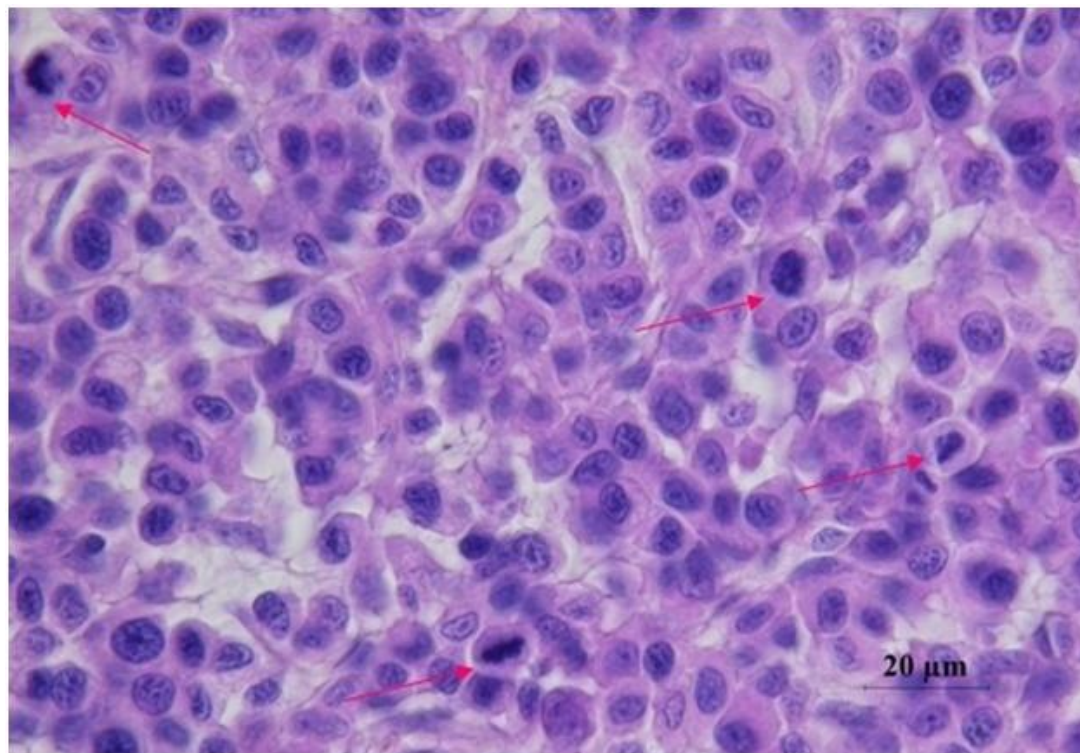


Figure 30 : Index mitotique élevé (lymphome cutané, chien) : Notez la présence de plusieurs cellules en mitose (HE, X 400) (Service d'anatomie pathologique de l'ENMV)

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, comme l'un si ce n'est le critère pronostique déterminant.

1.3.1.1.2. Limites en cancérologie canine

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.

Ainsi, 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. **(Abadie, 2003).**

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 grossissement 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. 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 **(Sarli et coll., 1999).**

1.3.1.2. Organismes nucléolaires (AgNORs)

1.3.1.2.1. Biologie

Le nucléole est un organelle nucléaire jouant un rôle dans le contrôle de la prolifération et les synthèses protéiques cellulaires. Les régions des organismes nucléolaires (ou Nucléolar organisations) sont les régions des chromosomes, étroitement liées aux nucléoles, correspondant à des segments d'ADN contenant les gènes codant pour l'ADN ribosomiaux.

Ces régions ont donc un rôle majeur dans la régulation des synthèses protéiques (Abadie, 2003).

Les organisateurs nucléaires peuvent être révélés en microscopie photonique en mettant à profit la forte argyrophilie des protéines non histones qu'ils contiennent, ce qui rend possible leur mise en évidence par des techniques de coloration à l'argent.

1.3.1.2.2. Utilisation de l'index

Les techniques d'imprégnation argentique, qui ont conduit à la création du terme « AgNORs », permettent de détecter les NORs dans les chromosomes en métaphase et dans les cellules interphasiques où les AgNORs apparaissent sous la forme de grains noirs localisés dans les nucléoles. La mise en évidence et la quantification des organisateurs nucléaires par l'argent est apparue comme 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.

L'intensité de la coloration dépend de l'activité de transcription des cellules, le nombre, la taille et la surface des NORs observés dans un tissu dépendraient du taux de prolifération et de différenciation cellulaire ou d'une transformation tumorale (Ploton et coll., 1988).

1.3.1.2.3. Intérêts en cancérologie canine

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 **[Figure 31]**. 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**).

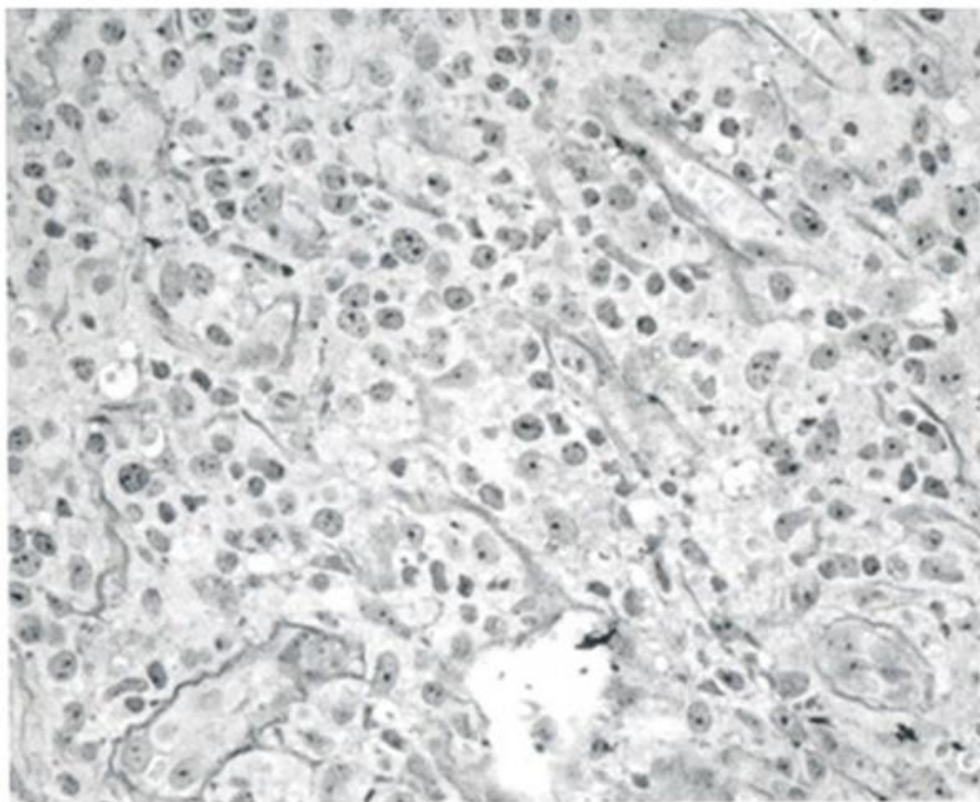


Figure 31 : Mise en évidence des NORs par coloration argentique, cas de mastocytome cutané canin (Abadie, 2003)

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**).

1.3.1.2.4. Limites de l'utilisation de l'index AgNOR

Cette technique doit être parfaitement maîtrisée et surtout en ce qui concerne l'épaisseur des coupes histologiques, la distinction entre les AgNOR et les précipitations non spécifiques des sels d'argent, ainsi que d'autres paramètres (**Abadie, 2003**).

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.

Certains auteurs ont proposé d'utiliser le nombre moyen d'AgNOR par noyau comptés sur 50 ou 100 cellules tumorales alors que d'autres ont proposé de mesurer les surfaces occupées par les AgNORs.

Ainsi, le nombre moyen d'AgNOR tend à être supérieur dans les tissus tumoraux que dans les tissus normaux correspondants, mais n'a pas encore été démontré si ce paramètre représentait un indicateur pronostique indépendant.

1.3.1.3. Détection immunohistochimique des marqueurs de prolifération cellulaire PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et l'antigène Ki-67

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.

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 techniquées selon les règles classiques de l'histopathologie (**Abadie, 2003**).

1.3.1.3.1. Antigène nucléaire de prolifération cellulaire ou proliferating cell Nuclear Antigen (PCNA)

1.3.1.3.1.1. Biologie, structure et fonction

L'antigène nucléaire de prolifération cellulaire est une protéine, de poids moléculaire de 36k Da, de localisation nucléaire agissant comme cofacteur de l'ADN polymérase (**Bravo et coll., 1987**). 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., 1987**). Il a été démontré aussi que cette protéine intervienne dans les phases de correction des erreurs de réplication de l'ADN (**Abadie, 2003 ; Maga et Hubscher, 2003**).

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 (phase de synthèse d'ADN).

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, deux anticorps ont été principalement utilisés dans la plupart des études publiées : les anticorps PC10 et 19A2. (**Abadie, 2003**).

1.3.1.3.1.2. Intérêts en cancérologie canine

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**).

Ensuite, plusieurs études se sont intéressées à l'intérêt pronostique de la détection de ces marqueurs en pathologie tumorale canine spontanée. Trois types tumoraux ont, du fait de

leurs fréquence et leur importance clinique, particulièrement retenus l'attention : les tumeurs mammaires, le mastocytome cutané canin et les lymphomes du chien.

1.3.1.3.1.2.1. Tumeurs mammaires

L'évaluation de l'intérêt du marqueur PCNA dans l'étude pronostique des tumeurs mammaires chez le chien a été faite pour la première fois depuis une vingtaine d'années (**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.

Ainsi, 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 (**Preziosi et coll., 1995**).

Ensuite, dans une seconde étude, les auteurs ont comparés la valeur pronostique de trois techniques de détermination de la fraction proliférative sur les mêmes prélèvements de tumeurs mammaires canines (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 s'est révélé significativement corrélé avec les risques de récurrence tumorale (**Lohr et coll., 1997**).

En 1998, l'efficacité de ce paramètre a été encore prouvée suite à une étude faite sur 96 chiennes : pour les tumeurs malignes, l'indice de PCNA avait une corrélation positive avec le grade histologique et le grade nucléaire (**Peña et coll., 1998**).

Cette valeur pronostique du marqueur PCNA pour ce type de tumeurs a été confirmée dans une étude plus récente où l'activité télomérase fut également proposée comme marqueur significatif de malignité **(Funasoki et coll., 2000)**.

1.3.1.3.1.2.2. Mastocytome cutané canin

Vu sa forte incidence, sa variabilité d'évolution et sa gravité potentielle, le mastocytome cutané canin a mérité une attention particulière, plusieurs études visant l'évaluation de la valeur pronostique du PCNA pour ce type tumoral ont été faites.

Cet index a été utilisé dans plusieurs recherches dans le but d'évaluer la malignité des MCC des chiens **(Maga et Hubscher, 2003 ; Bergman et coll., 2004 ; Scase et coll., 2006 ; Webster et coll., 2007)**.

Dans une étude menée sur 120 chiens, Abadie a trouvé que les chiens morts de leurs mastocytomes ont eu un index PCNA nettement élevés que les autres. Pour les chiens morts, la valeur trouvée de cet index était de 618 ± 169 et de 426 ± 235 pour les autres. Dans la même étude il n'a pas eu une corrélation significative entre l'index PCNA et le grade histologique des MCC **(Abadie, 2001)**.

Contrairement à Abadie, Hung et coll. ont montré dans leur étude expérimentale portant sur 14 chiens, l'existence d'une corrélation entre l'index PCNA et le grade histologique des MCC **(Hung et coll., 2000)**.

D'autres auteurs ont proposé la mise en œuvre de techniques alternatives au grading histopathologique conventionnel, dans une étude rétrospective, pour préciser l'évolution biologique souvent incertaine de ce type néoplasique. Le grading histologique, le nombre moyen d'AgNOR par cellule, et l'index d'anti-antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) ont été évalués comme des indicateurs de pronostic. Les résultats pour chaque indicateur à part, différaient 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 **(Simoes et coll., 1994)**.

En revanche, une autre étude faite dans ce sujet, cette étude visait à une analyse immunohistochimique de divers marqueurs de prolifération cellulaire en vue de l'évaluation de l'utilité pronostic de chacun de 3 marqueurs (Ki-67, PCNA et MCM-3). L'index mitotique a été aussi évalué. Les résultats obtenus permettent de conclure qu'il existe une relation forte entre tous les marqueurs de cellules. Toutefois, en raison de la très forte réaction et la réaction positive dans la majorité des tumeurs l'index PCNA est à ne pas recommander comme un indicateur de pronostic par contre l'index Ki-67 et MCM-3 peuvent être utilisées avec succès dans l'évaluation des tumeurs à mastocytes canines (**Kandefer et coll., 2015**).

1.3.1.3.1.2.3. Lymphomes canins

Des études consacrées à l'évaluation de la valeur pronostique de la détermination de la prolifération des lymphomes malins chez le chien à l'aide de la détection du marqueur PCNA ont été établis.

La signification pronostique du PCNA pour la durée de survie dans les lymphomes canins est reconnue dans une étude (**Kiupel et coll., 1999**) mais ne l'est pas dans d'autres (**Kiupel et coll., 1998 ; Phillips et coll., 2000**) : l'index PCNA ne semblait pas avoir une valeur pronostique en termes de durée de survie, avec ou sans traitement, pour les chiens atteints de lymphomes malins (**Kiupel et coll., 1998**), 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 ; Kiupel et coll., 1999**).

1.3.1.3.1.3. Limites de l'index PCNA

L'absence de méthodes standards pour l'utilisation de cet indicateur de prolifération fait que les résultats varient lors d'interprétations des différentes études, surtout si ces dernières sont faites avec 2 types d'anticorps différents. En effet, les anticorps PC 10 et 19 A2 ont des caractéristiques différentes ce qui rend l'interprétation et la comparaison entre les différentes études un peu délicat. Ainsi, la technique de fixation des prélèvements affecte la réactivité du clone 19A2 et beaucoup moins celle de PC10 (**Waseem et Lane, 1990 ; Abadie, 2003**) : une fixation supérieure à 30 heures peut altérer la détection de ces antigènes avec les deux types d'anticorps par une forte diminution de leur réactivité (**Abadie, 2003**).

Par ailleurs, il existe de grandes variations dans l'intensité du marquage qui sont observées entre cellules du même prélèvement lors de l'utilisation du clone PC10 (**Abadie, 2003**).

D'autre part, si l'expression du marqueur PCNA est corrélée aux autres indices de prolifération dans le cas de tissus normaux, cette corrélation est absente dans le cas des tissus néoplasiques à cause d'une probable dérégulation de son expression dans la tumeur et les tissus voisins causée par une sécrétion autocrine et paracrine de facteurs de croissance par les cellules tumorales (**Abadie, 2003**).

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 (**Maga et Hubscher, 2003**). 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.

1.3.1.3.2. Antigène Ki-67

1.3.1.3.2.1. Biologie, structure et fonction

L'antigène Ki-67 correspond à une molécule de localisation nucléaire de nature protéique non-histone, dont deux isoformes respectivement de 320 et 359 kD ont été isolées. 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 (**Endl et Gerdes, 2000**).

Toutes deux présentent également une partie centrale très grande, constituée d'un motif 16 fois répété, qui devrait pouvoir former une hélice de type alpha (**Guinebretière et Sabourin, 1997**).

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., 1989 ; 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 Guillaud, 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**).

Selon certains auteurs, la fonction précise de l'antigène ki-67 n'est pas encore aujourd'hui totalement élucidée (**Endl et Gerdes, 2000 ; abadie, 2003**) d'autres auteurs affirment que cette protéine joue un rôle essentiel dans le contrôle et la synchronisation de la prolifération cellulaire (**Sasaka et coll., 1987 ; Schonk et coll., 1989 ; Duchrow et coll., 1995**).

Quoiqu'il en soit, il reste indispensable à la prolifération cellulaire (**Laprie, 1996 ; Abadie, 2001**).

Le marquage de cet antigène nécessite des anticorps spécifiques qui doivent être résistants à la fixation et à l'inclusion. Parmi ces anticorps on trouve le MIB1 (molecular immunology Borstel) considéré comme étant le chef de file (**Cattoretti et coll., 1992 ; Key et coll., 1993**).

1.3.1.3.2.2. Utilisation de l'antigène ki-67

L'antigène ki 67 se caractérise par la variation de son expression selon les phases du cycle cellulaire. En effet, 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 (**Abadie, 2003**) Ceci en fait donc un marqueur hautement spécifique de la prolifération 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 Hall., 1992**). Sa quantité est de toute façon maximale en début de mitose pour décroître ensuite.

L'expression de l'antigène Ki-67 détectée par immunohistochimie présente aussi des variations topographiques au cours des différentes phases du cycle. En effet, pendant la phase G1, le marquage est au début nucléoplasmique puis il devient rapidement nucléaire ou périnucléaire ; alors que pendant la phase S, le marquage s'étend à l'ensemble du nucléoplasme tout en restant en grande partie au niveau du nucléole. Pendant la phase G2, la répartition concerne l'ensemble du noyau cellulaire **(Abadie, 2003)**.

La variation d'expression de la ki 67 selon les phases du cycle cellulaire, a permis l'utilisation du marquage de cet antigène pour estimer le degrés de prolifération cellulaire.

Contrairement à la PCNA, la demi vie de l'antigène ki 67 est brève, elle est alentour de 20 minutes. Par conséquent, cette protéine est rapidement catabolisée après la fin de la mitose **(Endl et Gerdes, 2000)**. 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 Hall., 1995)** d'où la fiabilité de la technique de marquage de l'antigène Ki67 comme méthode d'estimation de la prolifération cellulaire tumorale.

Parce qu'il est présent uniquement dans les cellules en prolifération, l'antigène Ki-67 permet de déterminer le coefficient de prolifération ou index Ki-67 : il s'agit du nombre de cellules Ki-67 positives sur le nombre total de cellules.

A noter qu'il existe des méthodes différentes de détermination de l'indice de prolifération Ki67 selon les équipes (par exemple quantification par le nombre de cellules marquées par unité de surface dans la littérature outre-atlantique ou pourcentage de cellules immunopositives par rapport à la population tumorale totale, dans l'article princeps consacré au marqueur Ki67.

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 justifiant l'utilisation de ce marqueur dans la quantification de la prolifération néoplasique **(Silvestrini et coll., 1988 ; Deshmukh et coll., 1990)**.

1.3.1.3.2.3. Intérêts de l'antigène ki67 en cancérologie canine

La détection immunohistochimique du marqueur de prolifération Ki-67 sur tissus animaux a été déterminée dès 1989 (**Falini et coll., 1989**). Son utilisation sur prélèvements de tissus tumoraux canins a été pour la première fois proposée en 1994 (**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 néoplasiques.

Les études faites pour évaluer l'intérêt pronostique de ce marqueur ont concerné surtout les tumeurs mammaires, le mastocytome cutané canin, les lymphomes et les mélanomes, vue leurs incidences cliniques importantes.

1.3.1.3.2.3.1. Tumeurs mammaires

Deux études ont 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 (**Pena et coll., 1998 ; Perez Alenza et coll., 2000**).

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 récives 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.

Plusieurs études ont été menées, afin de quantifier par immunohistochimie cette protéine. Le but de ces travaux était de préciser la valeur pronostique de l'index Ki-67 en recherchant de possibles corrélations avec des paramètres cliniques et histologiques. Ki-67 est présent en plus grande quantité dans les tumeurs malignes que dans les tumeurs bénignes et l'index de prolifération augmente avec la malignité. Cependant, aucune valeur seuil précise n'a pu être attribuée à l'index Ki-67 pour séparer ces deux types tumoraux (**Lohr et coll., 1997 ; Pena et coll., 1998 ; Geraldès et coll., 2000 ; Morris et coll., 2008**).

D'autres études ont comparé le taux du Ki-67 et le comportement post-chirurgical des lymphomes canins. Il s'est révélé que plus l'index de prolifération Ki-67 augmente, plus l'apparition de métastases dans le suivi post-opératoire est probable [**Tableau 8**] (**Pena et coll., 1998 ; Nieto et coll., 2000**).

Tableau VIII : Pourcentage de chiennes ayant développé des métastases durant le suivi postchirurgical en fonction de l'index Ki-67 (Pena et coll., 1998)

Index Ki-67	Probabilité d'apparition de métastases durant le suivi post chirurgical
> 24%	99%
Entre 11,5% et 24%	25%
< 11,5%	5%

Différentes études, qui s'intéressaient aux taux de survie, ont montré que, des valeurs élevées de l'index Ki-67 sont liées à des taux de survie faibles (**Pena et coll., 1998 ; Zuccari et coll., 2004 ; Ettinger et coll., 2006**).

1.3.1.3.2.3.2. Lymphomes canins

L'évaluation de l'expression de l'antigène Ki-67, sur coupes tissulaires a une forte valeur pronostique pour les lymphomes canins, et représente un grand intérêt dans l'évaluation du comportement biologique de ces tumeurs. 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 **[Figures 32, 33] (Fournel et coll., 1997b)**. 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.

Dans une autre étude, la détermination de l'index Ki-67 a été montrée comme corrélée au temps de survie sans récurrence après chimiothérapie : un index élevé est associé à une durée de rémission plus courte (**Philipps et coll., 2000**).

Dans une étude plus récente, la corrélation entre l'index ki-67, le grading de kiel et celle de l'index mitotique a été confirmée et ceci pour plusieurs types de lymphomes canins (**Sokolowska et coll., 2012**).

Dans l'étude de Kiupel et coll., cet index est controversé et n'est pas considéré comme un facteur pronostique fiable (**Kiupel et coll., 1999**).

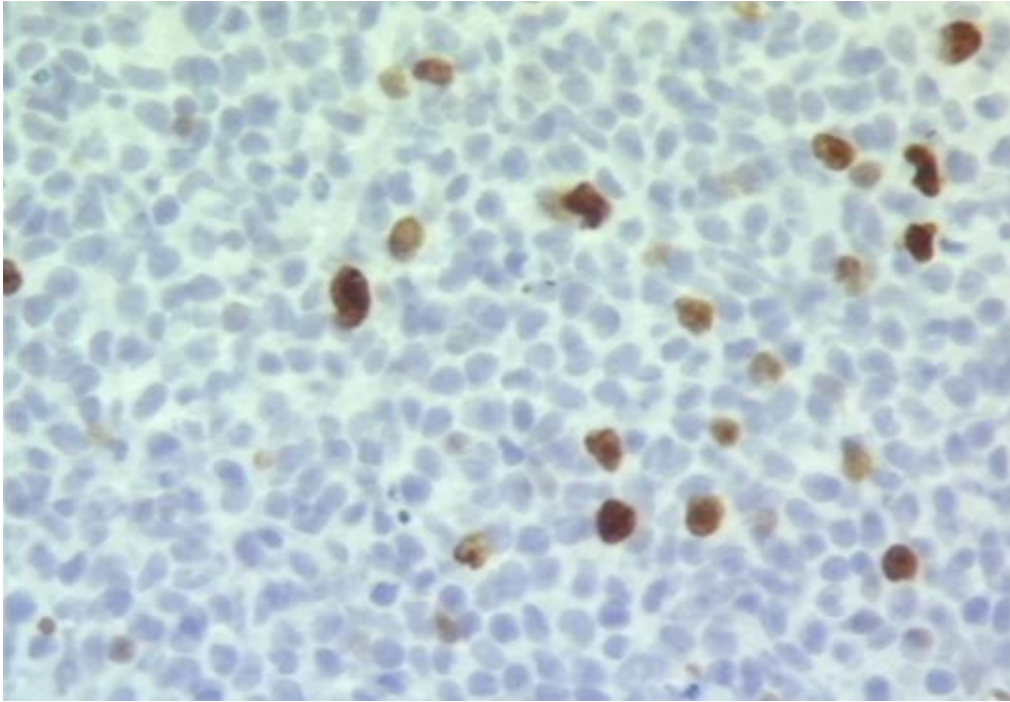


Figure 32 : Lymphome cutané canin avec un index ki67 inférieur à 21 % (bas grade) (Muller et coll., 2014)

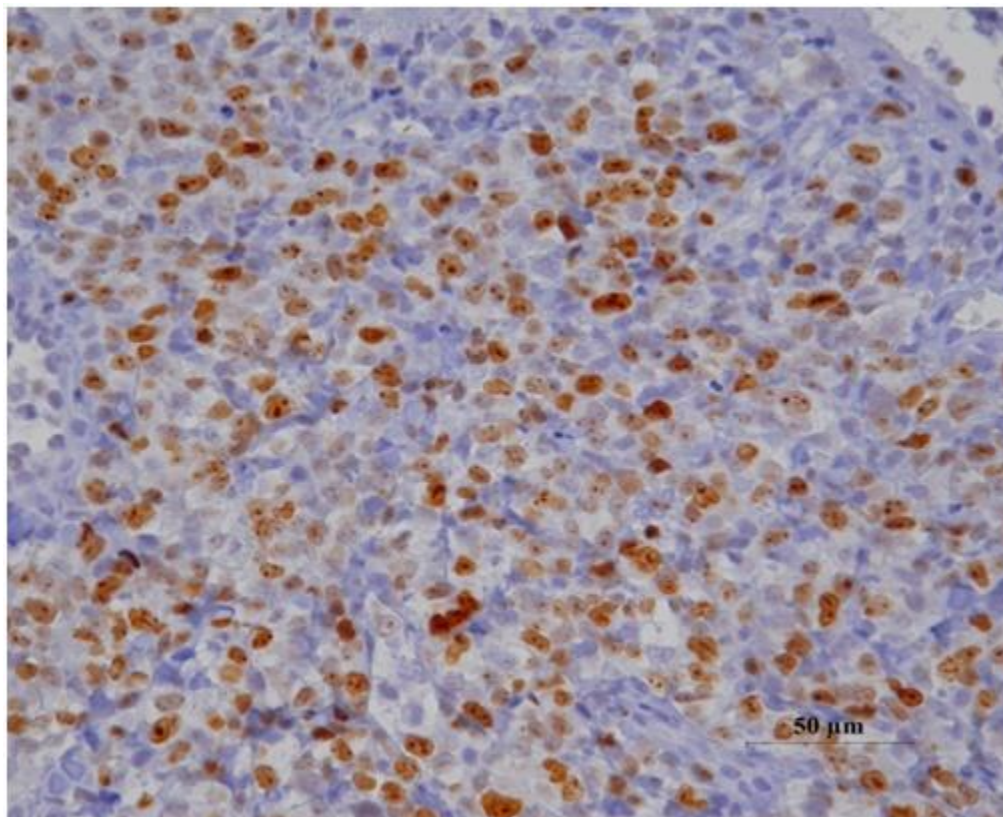


Figure 33 : Lymphome cutané canin avec un index ki67 supérieur à 21 % (haut grade) (Muller et coll., 2014)

1.3.1.3.2.3. Mastocytome cutané canin

Plusieurs études ont démontré l'intérêt pronostique de la détermination de l'index de prolifération ki 67 pour ce type tumoral (**Abadie et coll., 1999 ; Scase et coll., 2006 ; Maglennon et coll., 2008 ; Vascellari et coll., 2013**).

Le classement histopathologique du mastocytome cutané canin n'est pas toujours fiable comme critère pour poser un pronostic. Plus particulièrement, pour les mastocytomes de grade II dont le pronostic est le plus gênant et difficile à prévoir. Une étude s'est intéressé à évaluer l'intérêt pronostique de l'index ki67 (entre autres) dans les cas de MCC et à chercher une corrélation entre l'index ki 67 et le taux de survie post-chirurgicale, la Positivité du Ki67 s'est avéré un marqueur fiable pour l'estimation de la survie globale dans les cas d'excision chirurgicales (**ozaki et coll., 2007**).

A noter que pour les MCC, étant susceptibles de présenter des densités cellulaires très variables et dans un souci de standardisation, l'évaluation en pourcentage sur les champs microscopiques les plus prolifératifs de la tumeur est à privilégier, sachant qu'en théorie chaque laboratoire devrait définir sa propre valeur seuil en fonction du protocole immunohistochimique précis qu'il utilise pour cette détermination (**Abadie et Rubiales, 2012**).

Abadie a montré dans une étude que les chiens mourant de leur mastocytome ont un index Ki 67 (pourcentage de noyaux positifs de cet antigène) très élevé par rapport au ceux qui survivent. Il a montré aussi que cet index est en corrélation avec le grade histologique de la tumeur : plus le grade est élevé, plus la valeur de cet index est élevé [**Tableau 9**] (**Abadie et coll., 1999**).

Tableau IX : Index ki67 en fonction du grade histologique selon Abadie (établie par comptage sur 1000 noyaux) (Abadie et coll., 1999)

	Grade I	Grade II	Grade III
Index Ki67	3,1 ± 1,6	9,3 ± 6,7	20,4 ± 9,5

Selon Abadie, le taux de survie un an après l'exérèse est de 88% pour les chiens atteints de MCC de grade II avec un index Ki 67 inférieur à 9,3 ; alors que le taux de survie est de 37% pour les chiens présentant un index supérieur à 9,3.

Dans cette étude aussi, 88% des chiens ayant un MCC de grade II avec un index ki67 inférieur à 10% ont survécu pendant deux ans alors que 34% seulement avec un index supérieur à 10% ont survécu durant la même période [Figure 34] [Tableau 10] (Abadie et coll., 1999).

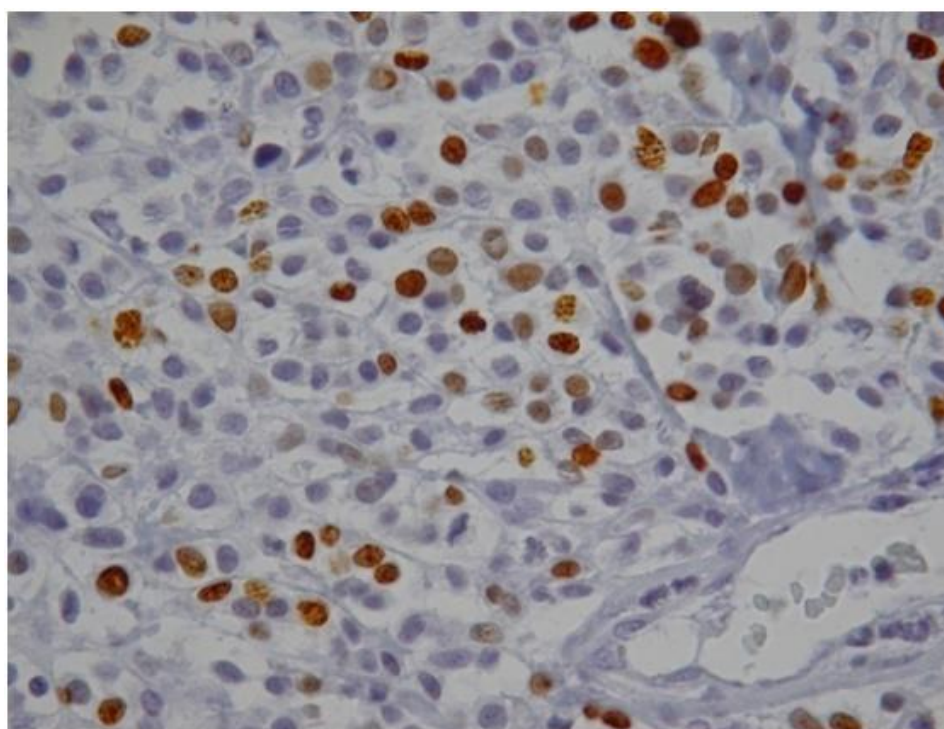


Figure 34 : Mastocytome cutané avec un index ki67 supérieur à 10% (Muller et coll., 2014)

Tableau X : Taux de survie à deux ans en fonction de l'index Ki67 et le grade histologique (Abadie et coll., 1999)

	Ki-67 < 10%	Ki-67 >10%
Pourcentage de survie pendant deux ans pour tous grades	92%	24%
Pourcentage de survie pendant deux ans pour MCT de grade II	88%	34%

1.3.1.3.2.3.4. Mélanome du chien

Une étude faite par Roels et coll. ont montré que l'index de prolifération Ki-67 représente un facteur pronostic indépendant significatif, en termes de prédiction de la durée de survie, pour ce type tumoral chez les carnivores domestiques **(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.

1.3.1.3.2.4. Limites du ki 67

Les limites de l'index de prolifération ki 67 restent celles de l'immunohistochimie. L'utilisation en routine de la détection immunohistochimique du ki 67 nécessite la mise en œuvre 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 **(Abadie, 2003)**.

1.3.2. Importance de l'apoptose

La croissance d'une tumeur dépend à la fois de son taux de prolifération cellulaire mais également de son taux de destruction cellulaire. Il peut donc paraître opportun de s'intéresser aux marqueurs cellulaires de l'apoptose aussi bien qu'aux marqueurs de prolifération cellulaires.

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisé pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme. Le dérèglement des mécanismes de régulation de la mort cellulaire par apoptose est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses tumeurs.

En histologie, la cellule apoptotique apparaît comme une cellule isolée des autres, rétractée, avec un cytoplasme éosinophile, comportant des fragments de chromatine nucléaire dense. À un stade débutant, la chromatine est condensée en périphérie du noyau **[Figure 35]**.

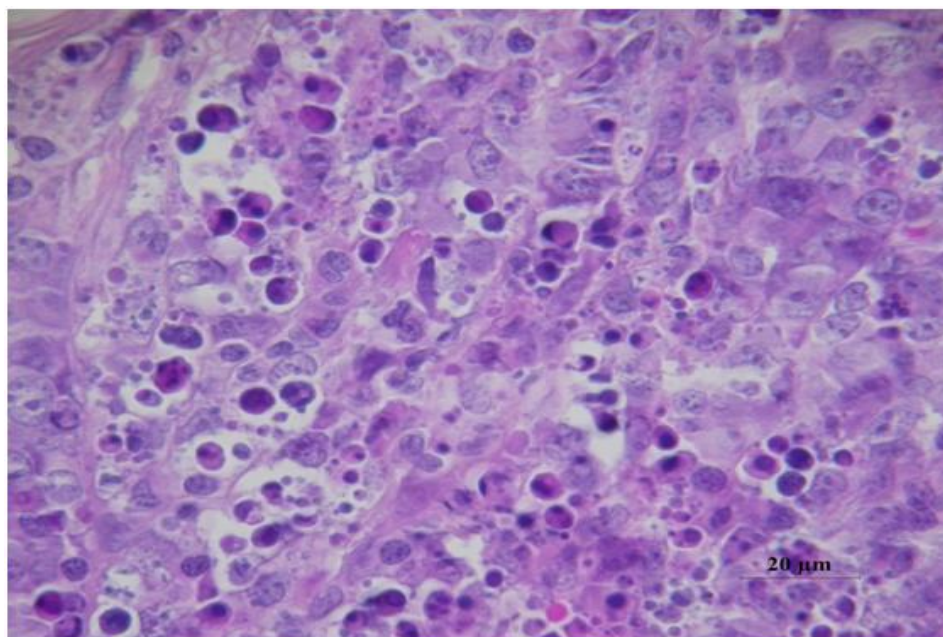


Figure 35 : Apoptose importante (lymphome cutané, chien) : Notez la présence de nombreuses cellules apoptotiques (HE, X 400) (Service d'anatomie pathologique de l'ENMV)

Chez l'homme, de nombreuses études associent le degré d'apoptose au pronostic. Roels et coll. rapportent à ce sujet une étude chez l'homme montrant que l'expression de Bcl-2, oncoprotéine inhibant l'apoptose, est associée à une survie plus courte (**Roels et coll., 2001**).

En oncologie canine, la valeur pronostique de ce paramètre est un sujet controversé : une étude faite sur 41 chiens atteints de lymphome canin a montré qu'un Index d'apoptose élevé est associé à un pronostic plus sombre. Plus l'index est élevé, plus la durée de première rémission est courte (**Phillips et coll., 2000**).

En effet, les altérations génomiques conduisent à des perturbations des relations entre les facteurs de croissance et les éléments de régulation cellulaire. Ceci a pour conséquence des perturbations de l'apoptose.

En revanche, une autre étude rétrospective sur 121 échantillons histologiques de mastocytomes cutanés canins de tous grades a montrée qu'aucune association significative entre les marqueurs d'apoptose cellulaire et la survie n'a été montrée (**Scase et coll., 2006**).

Une autre étude faite pour évaluer la valeur pronostique de l'index apoptotique chez 31 chiens atteints d'un carcinome nasal : aucune corrélation significative entre cet index cellulaire et la survie n'a été montrée (**Fu et coll., 2014**).

1.3.3. Recherche d'emboles

La présence d'emboles tumoraux signifie la présence d'amas de cellules tumorales dans les vaisseaux : cette atteinte signifie que la tumeur a accès à la circulation, et donc risque d'être déjà disséminée. Leur présence traduit donc le potentiel métastatique de la tumeur et rend le pronostic plus péjoratif [Figure 36].

Une étude récente a montré que pour les tumeurs mammaires de la chienne la présence d'emboles vasculaires est importante à connaître car elle influe sur la durée de survie : aucune chienne dont l'analyse histologique a mis en évidence des emboles vasculaires n'est en vie deux ans après la chirurgie. Egalement lors de carcinome in situ sans embolie (même de grade élevé), le taux de récurrence à 2 ans est de 7% seulement et la survie médiane dépasse les 2 ans (Lanore, 2014).

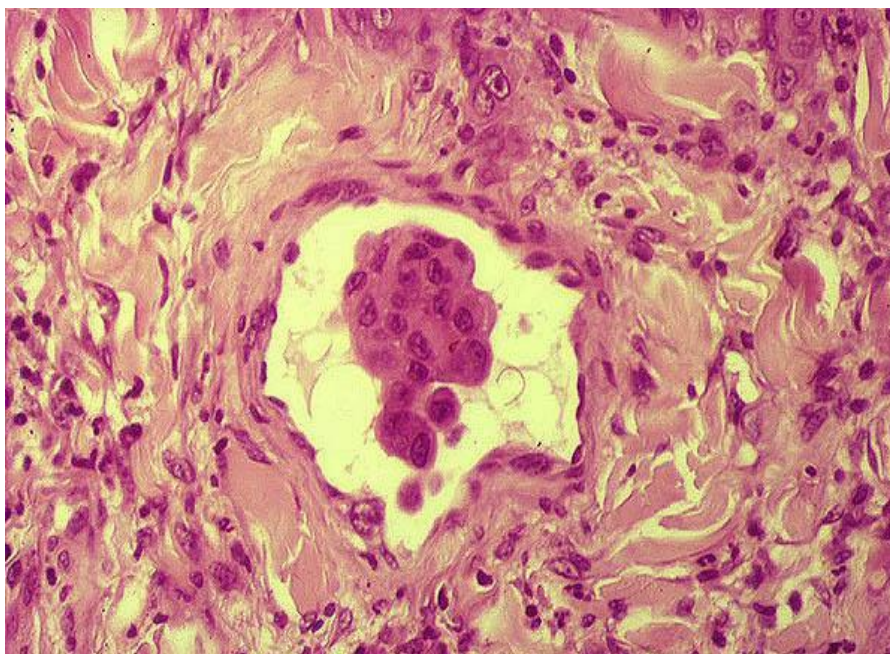


Figure 36 : Embolie vasculaire (Mastocytome cutané, chien) : Notez la présence d'embolie vasculaire (HE, X 400) (service d'anatomie pathologique de l'ENMV)

2. Bilan d'extension

2.1. Bilan d'extension Loco-régional

Il correspond à l'examen clinique du lymphocentre drainant l'organe affecté. La présence ou l'absence d'adénopathie est une notion à nuancer. Une hypertrophie ganglionnaire peut aussi être la manifestation d'une inflammation (lymphadénite). De même, l'absence d'adénopathie ne présume en rien l'absence de métastases d'où l'importance des examens anatomo-pathologiques : la cytologie et l'histologie.

La présence de métastases dans les nœuds lymphatiques loco-régionaux est un facteur pronostique fort. La présence de métastases lymphatiques est associée à un pronostic de survie plus faible (**Meuten, 2002**).

2.2. Bilan d'extension général

C'est la recherche des métastases à distance, qui constituent un facteur pronostique fort. Il concerne plusieurs organes cibles.

On peut prévoir le siège des métastases en fonction de la tumeur primitive [**Tableaux 11, 12, 13, 14**]. Pour éviter les biopsies multiples, les pathologistes commencent par d'autres méthodes diagnostiques pour mettre en évidence les métastases. Mais l'examen histologique reste l'examen de référence.

Tableau 1 : Métastases type leucémie (Magnol et coll., 1998)

Point de départ		« Métastases »	Mise en évidence
Moelle osseuse	Aiguë	Foie, Rate, +/- Sang	Myélogramme, palpation, imagerie
	Chronique	Sang, Foie, Rate	Hémmogramme, palpation, imagerie

Tableau XII : Métastases types mastocytomes malins (Magnol et coll., 1998)

Point de départ	« Métastases »	Mise en évidence
Peau	Ganglions lymphatiques	Palpation des aires ganglionnaires +/- cytoponctions
	Rate et foie	Palpation, imagerie
	Moelle osseuse et sang	Myélogramme, hémogramme
	Infiltration du poumon et épanchements pleuraux très rares	Cytologie de l'épanchement

Tableau XIII : Métastases type lymphome malins ganglionnaire (Magnol et coll., 1998)

Point de départ	« Métastases »	Mise en évidence
Ganglions lymphatiques superficiels et profonds	Amygdales	Inspection
	Rate et foie	Palpation, imagerie
	Moelle osseuse et sang	Myélogramme

**Tableau 2 : "Métastases" type cancers épithéliaux, mésenchymateux, mélanique
(Magnol et coll., 1998)**

Siège de la tumeur primitive	Métastases	Mise en évidence
Presque tous les cancers à l'exception des leucémies, lymphomes et mastocytomes malins	Plèvre, poumons	Radiographie, cytologie lors d'épanchement
Cancers qualifiés de lymphophiles (carcinomes, quelques sarcomes,...)	Ganglions lymphatiques	Clinique, radiographique, échographie, tomодensitométrie, cytologie
Prostate, mamelle, thyroïde	Os	Radiographie, scintigraphie
Mamelle (en particulier carcinome...) mais aussi hémangiosarcome, dysgerminome ovarien...	Peau (muqueuses)	Clinique, biopsies
Pratiquement tous les cancers en particulier ceux du tube digestif, du pancréas, de la rate...	Foie	Echographie et biopsies échoguidées
Presque tous les cancers	Reins	
Mélanome malin, cancers mammaires	Cerveau	Tomodensitométrie
Cancers abdominaux : hémangiosarcome de la rate, tumeurs ovariennes	Greffes en semilles sur les séreuses péritonéales	Laparotomie exploratrice Cytologie lors d'épanchement

III. EVALUATION DU PRONOSTIC DES CANCERS

La classification des tumeurs en fonction de l'organe d'origine et de leur type histologique fournit des informations importantes pour évaluer leur pronostic. Toutefois, d'autres paramètres permettent de préciser le potentiel évolutif. Il s'agit du degré d'extension (stade) et du degré de différenciation (grade) de la tumeur.

1. Degré d'extension : système de stadification TNM

En 1980, l'organisation mondiale de la santé a adapté la classification des tumeurs malignes chez l'homme pour les tumeurs des animaux domestiques. Ce système de classification dit « TNM » s'appuie sur des caractéristiques cliniques objectives et codifiées. Cette classification est un outil permettant au praticien d'orienter son pronostic, en fonction de la clinique.

Les trois éléments majeurs étudiés dans le système TNM sont :

- La taille de la tumeur primitive et/ou son extension aux tissus et organes de voisinage (T)
- L'importance de la dissémination aux ganglions lymphatiques régionaux (N)
- La présence ou l'absence de métastases (M).

Le système de stadification TNM est actuellement le plus communément utilisé dans le monde. Chacune de ces trois lettres est suivie d'un chiffre variant de 0 (absent) à 4 au maximum, ou d'un X en cas d'impossibilité d'évaluation. Ces chiffres peuvent être suivis d'une lettre, qui apporte une précision supplémentaire. Le score est précédé de la lettre c si l'évaluation du stade est clinique ou de la lettre p si elle est faite par un pathologiste.

La classification TNM constitue un moyen pratique afin de donner une première évaluation du pronostic. Plus le stade TNM augmente, plus le pronostic est sombre.

Prenant l'exemple de cette classification pour les tumeurs mammaires des animaux domestiques, établie par l'OMS en 1980 [Tableau 15] :

Tableau XV 3 : Classification TNM pour les tumeurs mammaires des animaux domestiques établie par l'OMS en 1980 (Magnol et coll., 1998)

T = tumeur primitive	
T0 : pas de tumeur décelable	
T1 : tumeur < 3 cm	a : non fixée à la peau
	b : fixée à la peau
	c : fixée aux muscles
T2 : tumeur de 3 à 5 cm	a : non fixée à la peau
	b : fixée à la peau
	c : fixée aux muscles
T3 : tumeur > 5 cm	a : non fixée à la peau
	b : fixée à la peau
	c : fixée aux muscles
T4 : tumeurs de toute taille avec extension directe à la peau et aux parois thoracique ou abdominale	
N = nœuds lymphatiques régionaux	
N0 : pas d'adénopathie perceptible cliniquement	
N1 : une ou plusieurs adénopathie(s) unilatérale(s)	a : non fixée
	b : fixée
N2 : adénopathies bilatérales	a : non fixée
	b : fixée
M = métastases	
M0 : absence de métastases à distance	
M1 : présence de métastases à distance	

A partir des critères décrits dans le tableau ci dessus, on peut déterminer 4 stades cliniques. A chaque observation du praticien, est attribuée une note et c'est le score global qui définit le stade clinique. Par convention, le stade tumoral est noté en chiffres romains (I, II, III, IV) [Tableau 16].

Tableau 4 : Détermination du stade TNM pour les tumeurs mammaires d'une chienne (Magnol et coll., 1998)

Stade TNM	Association TNM correspondante		
I	T1	N0, N1a	M0
II	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0, N1a	M0
III	T3	qqs N	M0
	qqs T	qqs N	M0
IV	qqs T	qqs N	M1

Légende : qqs : quelque soit

⇒ Plus le stade TNM augmente, plus le pronostic est sombre. La classification TNM constitue un moyen pratique afin de donner une première évaluation du pronostic.

Il y a 4 stades qui globalement s'appuient sur le TNM et que l'on peut décrire ainsi :

- Le stade 1 qui correspond à une tumeur unique et de petite taille.
- Le stade 2 qui correspond à un volume local plus important.
- Le stade 3 qui correspond à un envahissement des ganglions lymphatiques et/ou des tissus avoisinants.
- Le stade 4 qui correspond à une extension plus large et/ou une dissémination dans l'organisme sous forme de métastases.

Des tumeurs de même type tumoral au même stade peuvent avoir une agressivité très différente d'où l'utilité d'un grading histologique permettant de distinguer ces tumeurs.

2. Degré de différenciation : le grade histologique

En cancérologie, le grade histologique est une mesure du progrès d'une tumeur. C'est un indicateur de la rapidité avec laquelle une tumeur est susceptible de se développer et de se propager. Il se fonde sur des critères histologiques tels le degré de différenciation tumorale, l'activité mitotique, le degré d'atypies cyto-nucléaires ou l'extension de la nécrose. Le caractère du stroma tumoral, l'existence d'invasions vasculaires ou d'invasion périneurale, de zones de nécrose tumorale, ont également leur importance.

Le grade d'un cancer se fonde sur des critères histologiques tels le degré de différenciation tumorale, l'activité mitotique, le degré d'atypies cyto-nucléaires ou l'extension de la nécrose. Il est défini différemment pour chaque type de tumeur.

Par convention, le grade est noté en chiffres arabes (1, 2, 3, 4). Pour plusieurs cancers, le grade est quantifié de 1 à 3. Pour d'autres, il peut l'être de 1 à 4 ou de 1 à 5. Il peut arriver qu'une tumeur volumineuse contienne des cellules de différents grades.

Deux types tumoraux chez le chien ont bénéficiés de plus de travaux de recherche que les autres concernant l'efficacité pronostic de différentes échelles de grading proposés pour chaque type tumoral : le mastocytome cutané canin et les tumeurs mammaires.

2.1. Mastocytome cutané canin

Plusieurs auteurs ont élaboré une échelle de grading tel que Hottendorf et Nielsen en 1969, Bostock en 1973, plus récemment Patnaik en 1984 et Kiupel et coll. en 2011.

2.1.1. Grading de Patnaik

Le grade de Patnaik a été utilisé pour la plupart des études épidémiologiques et thérapeutiques des MCC. il est défini par :

- ✓ L'index mitotique
- ✓ Le degré de différenciation cellulaire
- ✓ L'extension de la tumeur dans les tissus profonds
- ✓ La densité cellulaire
- ✓ Morphologie cellulaire
- ✓ Nature et intensité du stroma réaction

Le grading de Patnaik est directement corrélé au pronostic, c'est-à-dire que chaque grade est associé à un taux de survie qui diminue du grade I à III.

Des études ont montré qu'il existe une association significative entre ce grade d'une part, et la durée de rémission et la durée de survie d'autre part (**Jaffe et coll., 2000 ; Murphy et coll., 2004 ; Preziosi et coll., 2004 ; Scase et coll., 2006**).

Selon une étude de Northrup et coll. qui s'intéressaient à l'étude de 20 mastocytomes de chaque grade par 10 anathomo-pathologistes en se basant sur le grading de Patnaik, les résultats ont montré que les pathologistes ont attribué le même grade à 7% seulement des mastocytomes examinés. Les résultats ont montré aussi que 10% des tumeurs ont eu les trois grades attribués et 80% des pathologistes ont attribué le même grade à 50% des mastocytomes. Ces auteurs ont confirmé que malgré l'utilisation du même grading, la concordance entre leurs interprétations n'était pas à 100% ce qui indique le caractère subjectif de ce système et la nécessité de trouver une échelle de gradation plus objective (**Northrup et coll., 2005**). Ceci a posé l'idée d'abandonner le grading de Patnaik au profit de celui de Kiupel.

2.1.2. Grading de Kiupel

Une étude récente a comparé la capacité du grading Kiupel celle de Patnaik à estimer le taux de survie chez des chiens atteints de MCC. Cependant, les marges d'exérèse sont inconnues et le risque de développer de nouveau un MCC ou une métastase n'a pas été étudié. L'étude a concerné 137 chiens dont leurs MCC sont excisés, une relation a été établie entre le grade histologique et le taux de survie. Selon Patnaik, 18 cas soit (13,1%) ont été classés comme grade I, 83 cas soit (60,6%) classé comme grade II et 36 cas soit (26,3%) comme étant grade III. Ce dernier a été associé à un mauvais pronostic, mais il n'y a aucune différence significative entre les grades II et III concernant le pronostic.

La classification selon ce grading a été basée sur une classification de consensus entre trois pathologistes compte non tenu les variations entre eux. Selon le grading de Kiupel, tous les MCC de grade I ont été considérés de grade inférieur « low grade », alors que les MCC de grade III ont été considérés de grade supérieur « high grade ».

Pour les MCC de grade II : 71cas soit (85,6%) ont été classés comme « low grade » contre 12 (14,4%) considérés comme « high grade » avec un taux de survie d'un an soit respectivement de 94% et 46%.

Le système à deux grades de Kiupel avait une haute valeur pronostique et a pu correctement prévoir les résultats négatifs d'une certaine catégorie de MCC de grade II. Les données confirment que la classification histologique ne peut pas prévoir le comportement biologique de chaque MCC et devrait être complétée par des méthodes moléculaires pour un pronostic plus précis (**Sabattini et coll., 2014**).

2.2. Tumeurs mammaires

La forte concentration des carcinomes mammaires de la chienne dans le groupe des adénocarcinomes ou carcinomes infiltrants a rendu nécessaire l'utilisation d'un grading histologique à valeur pronostique. Deux systèmes de grading sont actuellement utilisés chez la chienne : le grading de Scarff, Bloom et Richardson et celui de Gilbertson.

La diversité des classifications présentées montre qu'aucune ne fait l'unanimité dans la communauté scientifique. Les multiples paramètres histologiques à analyser sur des tumeurs, parfois très hétérogènes, rendent cette classification dépendante de l'histopathologiste. Le grading de Scarff, Bloom et Richardson a une valeur pronostique démontrée pour ces tumeurs. De même, le grading de Gilbertson, prenant en compte des critères cliniques et la détection d'embolies vasculaires et/ou lymphatiques, propose également un pronostic fiable.

2.2.1. Grading de Scarff, Bloom et Richardson

Une étude, menée par Lagadic et coll. en 1990, a étudié le taux de survie pour les 3grades Cette étude a montré que la mortalité est plus fréquente et précoce pour les grades II et III que dans les grades I. La survie à trois ans est de 63% pour les grades I, 43% pour les grades II et 17% pour les grades III (**Lagadic et coll., 1990**). Cependant, il faut noter que la quasi-totalité des chiennes mortes après deux ans sont décédées de maladies intercurrentes dans lesquelles la responsabilité du cancer est difficile à déterminer. Le degré de différenciation est inversement proportionnel à l'agressivité de la tumeur.

90% des tumeurs peu différenciés ont des métastases ou des récives moins de deux ans après la chirurgie, contre 63% pour des tumeurs moyennement différenciées et 20% pour les tumeurs bien différenciées. Plus le degré de différenciation est faible, plus l'apparition de métastases est fréquente et plus la malignité tumorale augmente (**MacEwen, 1990**).

Ces différents résultats montrent que la malignité augmente avec le grade histologique. Mais, il montre également que le grade I, bien que moins agressif, reste malin.

Ces études démontrent l'intérêt pronostique de ce grading pour les tumeurs mammaires chez la chienne. Plus le grade de Scarff, Bloom et Richardson est élevé, plus le pronostic est sombre.

2.2.2. Grading de Gilbertson

Cette classification repose donc sur l'étude de plusieurs caractéristiques morphologiques des tumeurs épithéliales :

- Le degré de prolifération des canaux épithéliaux et le degré d'atypie pour les néoplasmes non invasifs
- Le degré de différenciation nucléaire des lésions de prolifération maligne
- La réaction cellulaire lymphoïde
- Le degré d'extension de la maladie

La valeur pronostique de ces caractéristiques a été testée dans une étude, menée sur 232 chiennes atteintes de tumeurs mammaires (**Gilbertson et coll., 1983**).

Le tableau suivant [**Tableau 17**] rapporte les valeurs obtenues lors de cette étude. Les auteurs ont étudié le pourcentage de récurrence ou de développement de carcinome invasif, pendant 2 ans après la mastectomie, selon le type histologique initial.

Tableau XVII 5 : Pourcentage de chiennes ayant développé une récurrence ou un nouveau carcinome infiltrant dans les 2 ans suivant la mastectomie (Gilbertson et coll., 1983)

Stade/Grade	Pourcentage de récurrence ou tumeur
stade 0	25%
stade I	72%
grade 1	94%
grade 2-3	58%
stade II	95%
grade 1	100%
grade 2	86%

Le groupe de chiennes développant un cancer infiltrant, associé à des embolies vasculaires ou à une métastase loco-régionale, présente le pronostic le plus sombre.

L'identification d'atypies marquées ou modérées est importante pour le pronostic. En effet, la présence de ces lésions constitue un critère de malignité de la tumeur **(Gilbertson et coll., 1983)**.

D'autre part, le taux de 95% de récurrences pour le stade II illustre bien l'impact considérable des embolies vasculaires et des métastases des ganglions régionaux, sur le pronostic **(Gilbertson et coll., 1983)**.

L'analyse du pronostic selon le degré de différenciation nucléaire est significative si l'on compare le grade 1 (carcinome indifférencié), aux grades 2 et 3 regroupés (carcinome différencié). Mais si l'on tient compte du stade de la maladie, la différence n'est vraiment significative qu'au stade I avec 94% de récurrences pour le grade 1 et 58% pour les grades 2 et 3. La différenciation nucléaire représente un indice structural de l'agressivité intrinsèque des cellules cancéreuses : plus le degré de différenciation nucléaire est bas, plus les potentialités malignes de la tumeur sont élevées **(Gilbertson et coll., 1983)**.

Le défaut majeur de cette étude est de fournir un pronostic non sous la forme d'un taux de survie à deux ans, mais sous la forme d'un pourcentage de récurrences locales et/ou d'apparition d'un nouveau cancer infiltrant dans les deux ans suivant la mastectomie **(Magnol et coll., 1998)**.

IV. HISTOLOGIE EN THERAPEUTIQUE DES TUMEURS CHEZ LE CHIEN

Le traitement des cancers en médecine vétérinaire est en perpétuelle évolution, profitant du progrès des moyens thérapeutiques de la cancérologie humaine. La chirurgie est une technique incontournable et représente le plus souvent la première étape du traitement d'un processus tumoral. Si nécessaire, elle est complétée par une chimiothérapie ou une radiothérapie.

L'avancée spectaculaire des connaissances en histopathologie a permis un choix des stratégies thérapeutiques et un suivi post-thérapeutique plus aisés.

1. Histologie et décision thérapeutique

Les tumeurs du chien sont nombreuses, et encore, certaines tumeurs sont divisées en groupes très hétérogènes dans lequel il est possible d'identifier des sous-groupes associés à des pronostics et des réponses aux traitements différents.

Dans ces cas, la détermination du phénotype, est une étape clé pour poser un pronostic et une stratégie thérapeutique.

Prenant l'exemple des lymphomes canins : Le phénotypage dans ce cas est important car il donne des informations pronostiques en permettant, en association avec les critères morphologiques, de classer le lymphome. Ainsi, plusieurs études récentes permettent de dégager les informations suivantes concernant la thérapeutique:

- Les lymphomes B centroblastiques sont généralement associés à une bonne réponse à la chimiothérapie et à de bonnes médianes de survie avec chimiothérapie.
- Les lymphomes B des zones marginales ont généralement une évolution indolente et sont associés à des médianes de survie longue (**Valli et coll., 2006**).
- Les lymphomes T à petites cellules claires (bas grade) ont également une évolution indolente (**Fleury-Fournel et coll., 2002 ; Valli et coll., 2006**).
- Les lymphomes de haut grade et de phénotype T sont associés à un mauvais pronostic et à une mauvaise réponse à la polychimiothérapie classique (**Fleury-Fournel et coll., 2002**).
- Les lymphomes hépato-spléniques NK sont associés à une clinique agressive et à une très mauvaise réponse à la chimiothérapie.

Pour certains types de cancer canins, la classification histologique et la détermination d'un grade histologique joue un rôle important dans la planification du traitement et peut également permettre de prévoir l'évolution de la maladie après le traitement.

Le tableau ci-dessous [**Tableau 18**] représente un exemple : la stratégie thérapeutique dans le cas d'un mastocytome cutané canin reposant sur le grade histologique établi :

Tableau 6 : Conduite du traitement d'un mastocytome en fonction de son grade histologique (Huet et coll., 2009)

Grade I	Grade II	Grade III
Chirurgie large avec réintervention si marges infiltrées	• Si comportement bénin (Ki67 < 10%) Chirurgie large avec réintervention éventuelle ± corticothérapie et cimétidine • Si comportement péjoratif (Ki67 > 10%) : chimiothérapie indiquée (Vinblastine)	• Pour agressivité locale : chirurgie large plus radiothérapie adjuvante • Pour risque généralisation : chimiothérapie obligatoire

2. Evaluation histopathologique des marges d'exérèse : intérêts et limites

S'il est difficile pour certains types de tumeurs de définir macroscopiquement les limites entre tissu tumoral et tissu sain, l'examen microscopique permet de savoir si la résection a été effectuée en zone saine ou non. Les auteurs définissent ainsi également une « marge microscopique » qui est la distance visible au microscope entre le tissu lésionnel et le bord sain du prélèvement.

La largeur de cette « marge microscopique » peut être minime, il suffit d'observer la présence de tissu sain autour du tissu tumoral pour conclure à des marges saines dans la zone précise étudiée (**Huet et coll., 2009**).

Un prélèvement envoyé au laboratoire pour examen histologique avec analyse des marges d'exérèse peut être tatoué à l'encre de Chine avant la recoupe. Le prélèvement est pour cela immergé dans l'encre qui pénètre dans les tissus en périphérie (et marque donc les limites de l'exérèse chirurgicale).

Ainsi, lors de l'observation des coupes histologiques au microscope, le bord tatoué par l'encre désigne la zone de séparation entre le tissu prélevé et le tissu resté en place. Cette technique permet de distinguer les marges de l'exérèse et les limites tissulaires résultant de la recoupe des prélèvements au laboratoire, ou d'artéfacts de déchirure des coupes histologiques.

Si le tissu tumoral ne dépasse pas la zone tatouée, on en déduit que le prélèvement a été fait en zone saine donc que la totalité du tissu tumoral, à cet endroit précis, a été retirée. On parle alors de « marges saines ». Si au contraire on observe la présence de tissu tumoral

jusqu'en bordure de la coupe (atteignant donc la zone tatouée), on en déduit qu'il subsiste du tissu tumoral dans la zone de prélèvement et que les marges ne sont pas « saines ». Il est alors nécessaire de réintervenir plus largement dans le but de retirer les résidus de tissu tumoral. Si on observe quelques microns entre les cellules cancéreuses et le tissu sain on parle de marges limites [Figure 37].

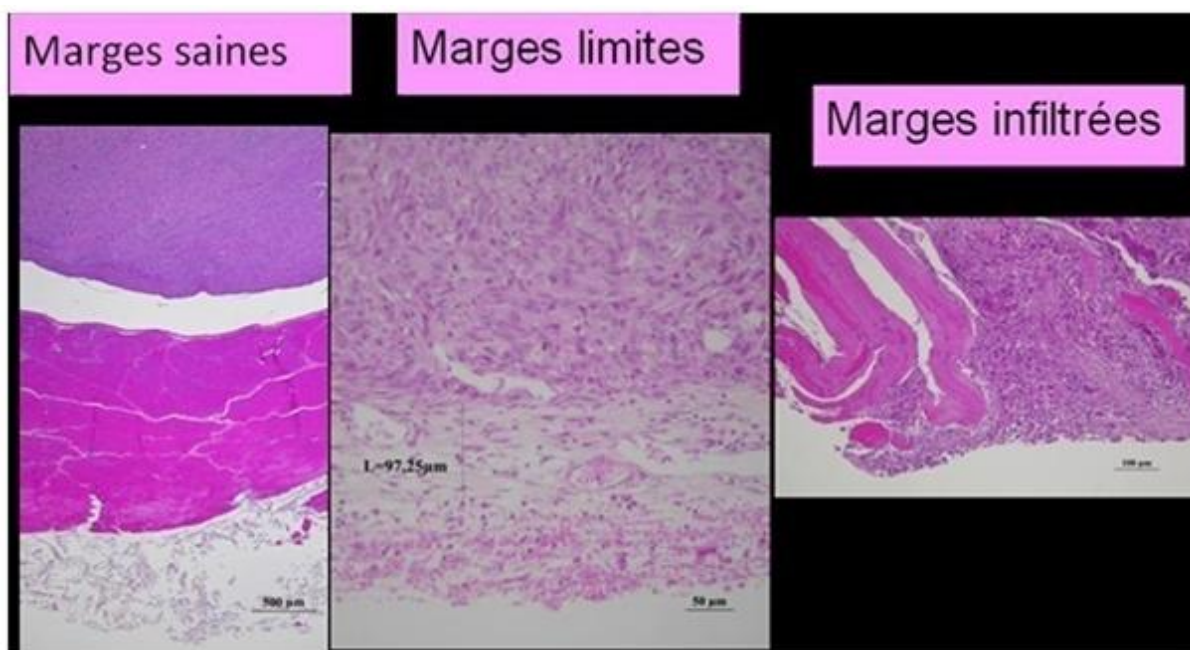


Figure 37 : Marges d'une tumeur : différentes images possibles (Magnol et coll., 1998)

Cependant, une coupe histologique ne constitue qu'un plan de coupe d'une structure tridimensionnelle. Elle offre donc une vision limitée et n'est pas représentative de l'ensemble du prélèvement. L'évaluation des marges microscopiques dépend beaucoup de la façon dont la pièce chirurgicale est recoupée. Ainsi, pour augmenter la fiabilité de l'analyse des marges, il est nécessaire de pratiquer plusieurs sections du prélèvement et de les analyser.

Actuellement, en routine en médecine vétérinaire, le diagnostic le pronostic et la stratégie thérapeutique des tumeurs chez le chien dépendent essentiellement de facteurs cliniques et histologiques. L'étude des nouvelles techniques de marquage moléculaire ouvre de nouvelles perspectives d'avenir. Des études supplémentaires sont encore nécessaires, mais l'étude de ces molécules semble constituer des paramètres d'avenir dans l'établissement d'un pronostic plus précis lors de tumeurs canines.

CONCLUSION

Vu leur fréquence, leur incidence croissante et leur issue parfois fatale, les tumeurs canines constituent une préoccupation majeure en médecine vétérinaire.

Caractérisé par un grand polymorphisme clinique, le diagnostic des tumeurs chez le chien doit obéir à une démarche diagnostique bien déterminée. Ainsi, l'examen clinique doit être complété systématiquement par un examen cytologique ou histologique afin d'identifier les cellules tumorales.

La cytologie permet un diagnostic rapide et une bonne fiabilité à partir de types très variés de prélèvements. Elle permet également une analyse cytologique fine des cellules. Cette technique présente toutefois certaines limites que le pathologiste doit connaître afin d'éviter ses pièges.

L'examen histologique représente l'étape cruciale de l'analyse anatomopathologique, il offre une meilleure fiabilité diagnostique que la cytologie. Il permet de confirmer la tumeur et de lui attribuer un pronostic, à partir duquel une stratégie thérapeutique sera choisie.

Sur le plan pronostique, le bilan d'extension est un critère important qui permet de déterminer le choix thérapeutique. Aussi, l'attribution d'un grade à un néoplasme canin qui dépend de plusieurs paramètres dont le plus important est l'index mitotique. Ce paramètre peut être déterminé à travers les marqueurs de prolifération cellulaire.

Notre travail, fondé sur une étude bibliographique, confirme l'importance de la cytologie et de l'histologie dans le diagnostic des tumeurs canin et souligne l'importance d'attribuer un pronostic avec rigueur avant la mise en place d'une stratégie thérapeutique.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abadie J. (2001) :** Les marqueurs de prolifération en oncologie vétérinaire, application à l'étude pronostique du mastocytome cutané canin. Thèse Méd. Vét., Toulouse.
2. **Abadie J. (2003) :** Techniques de détection et de quantification de la prolifération en histopathologie animale. *Rev. Fr. Histotechnol.*, **16**(1), 45-60.
3. **Abadie J.J., Amardeilh M.A., Delverdier M.E. (1999):** Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J. Am. Vet. Assoc.*, **215**: 1629-34.
4. **Abadie J., Rubiales F.D (2012) :** Diagnostic cytopathologique et histopathologique : conséquences pronostiques. *Prat. Vét.*, **47**: 186-189.
5. **Allen S.W., Prasse K.W., Mahaffey E.A. (1986):** Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. *Vet. Pathol.*, **23**: 649-655.
6. **Andrieu J.M., Colonna P., Lévy R. (1997):** Cancers: guide pratique d'évaluation de traitement et de surveillance. Éditions ESTEM Paris, p. 293.
7. **Bacha W.J, Bacha L.M. (2012) :** Color atlas of veterinary histology. Third edition, 4.
8. **Baker R., Lumsden J.H. (2001):** Atlas de cytologie canine et féline. Masson, Paris, 7-20, 304.
9. **Barsanti J.A., Finco D.R. (1995) :** Prostatic diseases. In : Ettinger S.J., Feldman E.C. : Textbook of veterinary internal medicine. 4th ed., WB Saunders, Philadelphia, 1662-1685.
10. **Bauer T., Thomas W.P. (1983):** Pulmonary diagnostic techniques. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, **13**: 273-282.
11. **Bergeaud P., Masson L. (2015):** Lavage broncho-alvéolaire: indications et technique. *Sem. Vét.*, **1633**, 05/06/2015.
12. **Bergman P.J., Craft D.M., Newman S.J., Baer K., Camps-Palau M.A., McKnight J.A., Leibman N.F., Brenn S., Finora K., Hohenhaus A.E., Bartick T., Patnaik A.K., Scase T. (2004):** Correlation of histologic grading of canine mast cell tumors with Ki67/PCNA/AgNOR/c-Kit scores: 38 cases (2002-2003). *Vet. Comp. Oncol.*, **2**: 98.
13. **Besso J. (1996):** Biopsies et ponctions échoguidées. Encyclopédie Vétérinaire, Paris (Elsevier), 1-7.
14. **Bielecki W., Malicka E., Krawiec M., Pinsinski W. (1997):** Fine needle aspiration biopsy in the diagnosis of neoplasms comparison with histopathology. *Magazyn-Weterynaryjny*, **6**(4): 250-251.

15. **Bourdeau P. (1994):** Les examens complémentaires en dermatologie. *Point Vét.*, Numéro spécial "Biologie Clinique". **26** : 481-493.
16. **Bravo R., Frank R., Blundell P.A., MacDonald-Bravo H. (1987):** Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase. *Nature*, **326**: 515-517.
17. **Bricaire P. (1996):** Lymphomes malins et leucémies lymphoïdes de l'homme et du chien : corrélation entre la clinique, la morphologie et l'immunophénotype des cellules, Proposition d'une base de travail pour le traitement des lymphomes malins. Thèse Doct. Vét., Lyon.
18. **Brodersen R., Bijlsma F., Gori K., Jensen K.T., Chen W., Dominguez J., Haverson K., Moore P.F., Saalmüller A., Sachs D., Slierendrecht W.J., Stokes C., Vainio O., Zuckermann F., Aasted B. (1998):** Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterized monoclonal antibodies with specificities against various leucocyte surface antigens of human and 11 animal species. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **64**: 1-13.
19. **Brousse N., Gaulard P., Peuchmaur M. (1997) :** Méthodes histologiques et immunohistochimiques d'étude des lymphomes, in Lymphomes : lymphomes non hodgkiniens et maladie de Hodgkin, P. Solal-Céligny et al., Editors. Frison Roche: Paris. p. 90-111.
20. **Caniatti M., Roccabianca P., Scanziani E., Paltrinieri S., Moore P.F. (1996):** Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet. Pathol.*, **33**: 204-212.
21. **Carter R.F., Harris C.K., Withrow S.J. (1987):** Chemotherapy of canine lymphoma with histopathological correlation: Doxorubicin alone compared to COP as first treatment regimen. *J. Am. Anim. Hosp. Ass.*, **23**: 587-596.
22. **Cast M. (1994) :** Analyse de 142 cytoponctions de tumeurs d'organes superficiels chez les carnivores domestiques : valeur diagnostique et indications. Thèse Doct. Vét., (Toulouse).
23. **Cattoretti G., Becker M.H., Key G., Duchrow M., Schlüter C., Galle J., Gerdes J. (1992):** Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J. Pathol.*, **168**: 357-363.
24. **Celis J.E., Madsen P., Celis A., Nielsen H.V., Gesser B. (1987):** Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase) is a central component of the pathway(s) leading to DNA replication and cell division. *FEBS Lett.*, **220**: 1-7.

25. **Chabanne L., Marchal T., Kaplanski C., Fournel C., Magnol J.P., Monier J.C., Rigal D. (1994):** Screening of 78 monoclonal antibodies directed against human leukocyte antigens for cross-reactivity with surface markers on canine lymphocytes. *Tissue Antigen*, **43**: 202-205.
26. **Challis D. (1997):** Broadsheet number 41: frozen section and intra-operative diagnosis. *Pathology*, **29**(2): 165-74.
27. **Chrisman C.L. (1992):** Cerebrospinal fluid analysis. *Vet. Clin. North Am (Small Anim Pract)*, **22**(4): 781-810.
28. **Christopher M.M. (2003):** Cytology of the spleen. *Vet. Clin. North Am: Small Anim. Pract.*, **33**: 135-52.
29. **Clercx C., Wallon J., Gilbert S., Snaps F., Coignoul F. (1996):** Imprint and brush cytology in the diagnosis of canine intranasal tumours. *Anim. Pract.*, **37**: 423-437, 1996.
30. **Cloet-Chabre B. (2000):** Les prélèvements et le microscope. *Prat. Med. Chir. Anim. Comp.*, **35**(1), 9-14.
31. **Cobb M. (1998):** Manual of small animals clinical pathology. *BASVA*, 187-198.
32. **Collas G. (1996):** Pathologies des cavités nasales et sinusales chez le chien. *Prat. Med. Chir. Anim. Comp.*, **31**, 479-499.
33. **Cook J.R., DeNicola D.B. (1988):** Cerebrospinal fluid. *Vet. Clin. North Am. Small An. Pract.*, **18**(3): 475-99.
34. **Corcoran O.B. (1998):** Cytological collection techniques. In: V. L. Fuentes, S. Swift Manual of Small Animal Cardio-respiratory Medicine and Surgery Cheltenham, *BSAVA*, 75-78.
35. **Cordonnier N., Chateau-Joubert S., Huet H., Laloye E., Rakotovo F., Reyes-Gomez E. (2012) :** Techniques en anatomo-cytopathologie et en hématologie vétérinaires. *J. Amer. Vet. Med. Assn.*, **4**: 125-126.
36. **Couto C.G. (1998):** Cerebrospinal fluid analysis. In: Nelson R.W., Couto C.G. (eds), *Small Animal Internal Medicine*, Mosby, 956-960.
37. **Cowell R.L., Valenciano A.C. (2014):** Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat. Cowell and Tyler's, 4th ed, Mosby Elsevier, 1-3-6-11.
38. **Crespo E.T. (2015) :** Les tumeurs périanales chez le chien. *Le monde vétérinaire*, **#148** | Février 2015, 36-37.

- 39. Crystal M.A., Pennick D.G., Matz M.E., Pearson S.H., Freden G.O., Jakowski R.M. (1993):** Use of ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy and automated core biopsy for the diagnosis of gastrointestinal diseases in small animals. *Vet. Radiol. Ultrasound*, **34**(6): 438-444.
- 40. Davidson M., Else R., Lumdsen J. (1998):** Manual of small animal pathology. Ed, Bsava, Shurdington.
- 41. Delverdier M., Buchet B., Van Haverbeke G. (1988):** Histologie et cytologie des lymphomes malins canins: Etude comparative des classifications actuelles. *Rev. Méd. Vét.*, **139**(12): 1141-1150.
- 42. Dervan P.A., Magee H.M., Buckley C., Carney D.N. (1992):** Proliferating cell nuclear antigen counts in formalin-fixed paraffin-embedded tissue correlate with Ki-67 in fresh tissue. *Am. J. Clin. Pathol.*, **97**: S21-S28.
- 43. Deshmukh P., Ramsey L., Garewal H.S. (1990):** Ki-67 labeling index is a more reliable measure of solid tumor proliferative activity than tritiated thymidine labeling. *Am. J. Clin. Pathol.*, **94**: 192-195.
- 44. Duchrow M., Schlüter C., Key G., Kubbutat M.H., Wohlenberg C., Flad H.D., Gerdes J. (1995):** Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, **43**: 117-121.
- 45. Dunn J. (2014)** Manual of diagnostic cytology of the dog and cat. 1st ed Oxford, 79-80, 129, 161-167.
- 46. Else R.W., Simpson J.W. (1988):** Diagnostic value of exfoliative cytology of body fluids in dogs and cats. *Vét. Rec.*, **123**: 70-76.
- 47. Endl E., Gerdes J. (2000):** The Ki-67 Protein: Fascinating Forms and an Unknown Function. *Exp. Cell Res.*, **257**: 231-237.
- 48. Ettinger S.N., Scase T.J., Oberthaler K.T., Craft D.M., McKnight J.A., Leibman N.F., Charney S.C., Bbergman P.J. (2006) :** Association of argyrophilic nucleolar organizing regions, Ki-67, and proliferating cell nuclear antigen scores with histologic grade and survival in dogs with soft tissue sarcomas: 60 cases (1996-2002). *J.A.V.M.A.*, **228**: 1053-1062.

49. **Falini B., Flenghi L., Fagioli M., Stein H., Schwarting R., Riccardi C., Manocchio I., Pileri S., Pelicci P.G., Lanfracone L. (1989):** Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. *J. Histochem. Cytochem.*, **37**: 1471-1478.
50. **Feldman B.F. (2000):** Cerebrospinal fluid evaluation. In: Ittinger S.J.; Feldman E.C (eds) textbook of veterinary internal medicine, W.B, Saunders company, Philadelphia, 572-57.
51. **Ferrer L., Fondevila D., Rabanal R., Ramis A. (1992):** Detection of T lymphocytes in canine tissue embedded in paraffin wax by means of antibody to CD3 antigen. *J. Comp Pathol.*, **106**: 311-314.
52. **Fisher D.J., Naydan D., Werner L.L., Moore P.F. (1995):** Immunophenotyping lymphomas in dogs: a comparison of results from fine needle aspirate and needle biopsy samples. *Vet. Clin. Pathol.*, **24**(4): 118-123.
53. **Fleury-Fournel C., Ponce F., Felman P., Blavier A., Bonnefont C., Chabanne L., Marchal T., Cadore J.L., Goy-Thollot I., Ledieu D., Ghernati I., Magnol J.P. (2002):** Canine T Cell Lymphomas: a morphological, immunological and clinical study of 46 new cases. *Vet. Pathol.*, **39**: 92-109.
54. **Fontaine J., Bovens C., Bettenay S., Mueller R. (1992):** Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review. *Vet. Comp. Oncol.*, 2009, **7**, 1-14. Goldschmidt M.H., Shoffer F.S. Skin tumors of the dog and cat. Pergamon Press: Oxford, 252-264.
55. **Forrester S.D., Purswell B.J. (1997):** Diseases of the prostate. In: M. S. Leib and W. E. Monroe. Practical Small Animal Internal Medicine. Philadelphia, WB Saunders Company: 367-382.
56. **Fournel F.C., Jongh O., Ranchere D., Magnol J.P. (1990):** Cytologie des épanchements cancéreux. *Rev. Méd. Vét.*, **166**(11): 983-993.
57. **Fournel F.C., Magnol J.P., Guelfi J.F. (1994):** Atlas en couleur de cytologie du cancer chez le chien et le chat, PMCAC Editions, Paris, 1-17.
58. **Fournel F.C., Magnol J.P., Bricaire P. Chabanne L., Delverdier A., Bryon P.A., Felman P. (1997a):** Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkins lymphomas. *J. Comp. Pathol.*, **117**(1): 35-59.

- 59. Fournel F.C., Magnol J.P., Chabanne L., Ghernati I., Marchal T., Bonnefond C., Bryon P.A., Felman P. (1997b):** 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.
- 60. Fournel F.C., Ponce F., Felman P., Blavier A., Bonnefont C., Chabanne L., Marchal T., Cadore J.L., Goy-Thollot I., Ledieu D., Ghernati I., Magnol J.P. (2002):** Canine T-cell lymphoma: a morphological, immunological and clinical study of 46 new cases. *Vet. Pathol.*, **39**: 92-109.
- 61. Fu D.R., Kato D., Watabe A., Endo Y., Kadosawa T. (2014):** Prognostic utility of apoptosis index, Ki-67 and survivin expression in dogs with nasal carcinoma treated with orthovoltage radiation therapy. *J. Vet. Med. Sci.*, **76**(11): 1505-12.
- 62. Funasoki Y., Nakayama H., Uetsuka K., Nishimura R., Sasaki N., Doi K. (2000):** Cellular proliferation and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Vet. Pathol.*, **37**: 177-183.
- 63. Gallois B.H. (1993) :** étude cytologique des voies respiratoires chez les carnivores domestiques. Thèse Doct. Vét., Alfort.
- 64. Gamet Y. (2001) :** Technique du lavage broncho-alvéolaire chez le chat et le chien. *Nouv. Prat. Vét.*, **3** : 29.
- 65. Garcia R.L., Coltrera M.D., Gown A.M. (1989):** Analysis of proliferative grade using anti PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. *Am. J. Pathol.*, **134**: 733-739.
- 66. Gelain M.E., Mazzilli M., Riondato F., Marconato L., Comazzi S. (2008):** Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by low cytometry. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **121**: 179-188.
- 67. Geraldès M., Gartner F., Schmitt F. (2000):** Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumors. *Vet. Rec.*, **146**: 403-406.
- 68. Gilberson S.R., Kurzman I.D., Zachrav R.E. (1983):** Canine mammary epithelial neoplasms. Biologic implication of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet. Pathol.*, **20**: 127-142.
- 69. Grindem C.B., Neel J.A., Juopperi T.A. (2002):** Cytology of bone marrow. *Vet. Clin. North Am. (Small Anim. Pract.)*, **32**: 1313-1374.

70. **Gross T.L., Ihrke P.J., Walder E.J., Affolter V.K. (2005):** Lymphocytic tumors. *In:* Gross T.L., Ihrke P.J., Walder E.J., Affolter V.K., Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis. Second edition. Blackwell: Oxford, 866-893.
71. **Guinebretière J.M., Sabourin J.C. (1997) :** Ki-67, marqueur de prolifération. *Ann. Pathol.*, **17**: 25-30.
72. **Hager D.A., Nyland T.G., Fisher P. (1985):** Ultrasound-guide biopsy of the canine liver, kidney, and prostate. *Vet. Radiol. Ultrasound*, **26**(3): 82-88.
73. **Harris N.L. (2001):** Mature B-cell neoplasms: introduction. *In:* World Health Organization Classification of tumours. Pathology & genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, E.S. JAFFE, et al., Editors. IARC Press: Lyon. p. 121-126.
74. **Hellmen E., Lindgren A. (1989):** The accuracy of cytology in diagnosis and DNA analysis of canine mammary tumors. *J. Comp. Path.*, **101**: 443-450.
75. **Hendrix D.V., Gelatt K.N., Smith P.J., Brooks D.E., Whittaker C.J., Chmielewski N.T. (1998):** Ophtalmic disease as the presenting complaint in five dogs with multiple myeloma. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, **34**: 121-128.
76. **Huet F., Riviere D., Lanore D. (2009) :** Masses cutanées chez un chien La démarche diagnostique. *L'essentiel*, N°134 du 23 au 29 avril.
77. **Hung L.C., Pong V.F., Cheng C.R., Wong F.L., Chu R.M. (2000):** An improved system for quantifying AgNOR and PCNA in canine tumors. *Anticancer Res.*, **20**(5A): 3273-80.
78. **Isaacson P. (2000):** The current status of lymphoma classification. A review. *Br. J. Haematol.*, **109**: 258-266.
79. **Jacobs R.M., Messick J.B., Valli V.E. (2002):** Multiple myeloma. *In :* Meuten DJ, editor, Tumors in Domestic Animals, 4th ed, North Carolina State Univ., Raleigh : Willey-Blackwell, 163-164.
80. **Jacques D., Cauzinille L., Bouvy B., Dupre G. (2002):** A retrospective study of 40 dogs with polyarthritis. *Vet. Surg.*, **31**(5): 428-34.
81. **Jaffe T.J. (1998):** Diagnostic sampling and treatment techniques. *In:* D.M. MC CURNIN Clinical textbook for veterinary technicians Philadelphia, W. B. Saunders Company, p. 224-225.

- 82. Joland P.Y. (1990) :** Cytologie des néoformations superficielles et des adénopathies des carnivores : Apport au diagnostic et au pronostic en cancérologie Clinique. Thèse Doct. Vét. (Lyon).
- 83. Jones M., Cordell J.L., Beyers A.D., Tse A.G., Mason D.Y. (1993):** Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive antipeptide antibodies. *J. Immunol.*, **150**: 5429-5435.
- 84. Jongh O. (1989) :** Contribution au diagnostic cytologique des épanchements cancéreux des séreuses coelomiques. Thèse Doct. Vét. Lyon, n°39, 54.
- 85. Jongh O. (2012):** Les prélèvements cytologiques de la conjonctive et de la cornée, Congrès National AFVAC 2012 – Vetagro-Sup, F-69280.
- 86. Kandefer-Gola M., Madej J.A., Dzimira S., Nowak M., Janus I., Ciaputa R. (2015):** Comparative analysis of markers of cell proliferation in canine mast cell tumours according to current classifications. *Pol. J. Vet. Sci.*, **18**(2): 241-7.
- 87. Kennedy C.P. (1995):** Pathology of lower urinary tract and prostate. *In*: Ling GV: Lower urinary tract diseases of dogs and cats. London, Mosby 108-113.
- 88. Key G., Becker M.H., Baron B., Duchrow M., Schlüter C., Flad H.D., Gerdes J. (1993):** 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.*, **68**: 629–636.
- 89. Kiupel M., Bostock D., Bergmann V. (1998):** The prognostic significance of AgNOR counts and PCNA-positive cell counts in canine malignant lymphomas. *J. Comp. Pathol.*, **119**(4): 407-18.
- 90. Kiupel M., Teske E., Bostock D. (1999):** Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet. Pathol.*, **36**(4): 292-300.
- 91. Kocjan G., Chandra A., Cross P., Denton K., Giles T., Herbert A., Smith P., Remedios D., Wilson P. (2009):** BSCC code of practice–fine needle aspiration cytology *Cytopathology*, **20**: 283-296.
- 92. Krawiec D.R., Heflin D. (1992):** Study of prostatic diseases in dogs: 177 cases (1981-1986). *JAVMA*, **200**: 1119-1122.
- 93. Kristensen A.T., Klausner J.S., Weiss D.J., Hardy R.M. (1990):** Liver cytology in cases of canine and feline hepatic disease. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, **12**(6): 797-809.

94. **Kubbutat M., Key G., Duchrow M., Schlüter C., Flad H., Gerdes J. (1994):** Epitope analysis of antibodies recognizing the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki- 67 (Ki-67 protein). *J. Clin. Pathol.*, **47**: 524-528.
95. **Kuchler (2002) :** Cytologie normale des organes profonds du chien et du chat. Thèse Doct. Vét., Université Claude-Bernard, Lyon, 106.
96. **Lagadic M., Estrada M., Camadro J.P., Durand P., Goebel J. (1990) :** Tumeurs mammaires de la chienne : critères du pronostic histologique et intérêt d'un grading. *Rec. Méd. Vét.*, **166**: 1035-1042.
97. **Landberg G., Tan E.M., Roos G. (1990):** Flow cytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen/cyclin and Ki-67 antigen : a new view of the cell cycle. *Exp. Cell. Res.*, **187**: 111-118.
98. **Lanore D. (2014) :** Tumeurs mammaires : Facteurs pronostiques et prise en charge raisonnée. *L'essentiel*, **319** : 18-20, du 13 au 19 février.
99. **Lappin M.R., Latimer K.S. (1988):** Hematuria and extreme neutrophilic leukocytosis in a dog with renal tubular carcinoma. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **192**: 1289-1292.
100. **Laprie C. (1996) :** Expression tissulaire de l'épitope Ki-67 chez le chien à l'état normal. Thèse Doct. Vét., Toulouse, 66.
101. **Ledieu D. (2004) :** la cytologie des épanchements : indications, méthodologie principaux diagnostics chez le chien et le chat. *Nouv. Prat. Vét.*, **20** : 14.
102. **LeFoll C. (2011):** Indications du myélogramme et de la biopsie médullaire. *La semaine vétérinaire*. **1474** : 42.
103. **Leveille R., Partington B.P., Biller D.S., Miyabayashi T. (1993):** Complications after ultrasoundguided biopsy of the abdominal structures in dogs and cats: 246 cases (1984-1991). *J. Amer. Vet. Med. Assn.*, **3**: 413-415.
104. **Linder J., Radio S.J., Robbins R.A, Ghafouri M., Rennard S.I (1987):** Bronchoalveolar lavage in the cytologic diagnosis of carcinoma of the lung: *Acta Cytologica*, **31**: 796-801.
105. **Lohr C.V., Teifke J.P., Failing K., Weiss E. (1997):** 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.*, **34**: 212-221.
106. **Mac Ewen E.G. (1990):** Spontaneous tumours in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Rev.*, **9**: 125-136.

107. **Mac Ewen E.G., Patnaik A.K., Hurvitz A.I., Bradley R., Claypoole T.F., Withrow S.J., Erlandson R.A., Lieberman P.H. (1984):** Nonsecretory multiple myeloma in two dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **184**(10): 1283-1286.
108. **Mac Neill A.L. (2011):** Cytology of canine and feline cutaneous and subcutaneous lesions and lymph nodes. *Top. Comp. Anim. Med.*, **26**(2): 62-76.
109. **Maga G., Hubscher U. (2003):** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell. Sci.*, **116**: 3051-3060.
110. **Maglennon G.A., Murphy S., Adams V., Miller J., Smith K., Blunden A., Scase T.J. (2008):** Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Vet. Comp. Oncol.*, **6**(4): 268-74.
111. **Magnol J.P., Marchal T., Delisle F., Devauchelle P., Fournel C. (1998):** Cancérologie clinique du chien. Saint-pierre la palud, France : Th Marchal, 217-229 et 317-318.
112. **Mai W. (2001) :** Prélèvements échoguidés : matériel et technique. *Point Vét.*, **217** : 68-72.
113. **Masserdotti C., De Lorenzi D. (1998):** Non-neoplastic bronchopulmonary diseases in dogs and cats: diagnostic approach by cytological examination. *Veterinaria*, **12**: 33-39.
114. **Mc Cullough S., Brinson J. (1999):** Collection and interpretation of respiratory cytology. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, **14**: 220-226.
115. **Meinkoth J.H., Rochat M.C., Cowell R.L. (1997):** Metastatic carcinoma presenting as hind-limb lameness: diagnosis by synovial fluid cytology. *J. Am. Anim. Hosp. Ass.*, **33**(4): 325-328.
116. **Menard M., Fontaine M., Morin M. (1986):** Fine-needle aspiration biopsy of malignant tumors in dogs and cats: a report of 102 cases. *Can. Vet. J.*, **12**: 504-510.
117. **Menard M., Papageorges M. (1995):** Ultrasound corner technique for ultrasound-guided fine-needle biopsies. *Vet. Radiol. Ultrasound*, **36**: 137-138.
118. **Menard M., Papageorges M. (1996):** Ultrasound-guided liver fine-needle biopsies in cats: results of 307 cases. *Vet. Pathol.*, **33**(5): 570.
119. **Meuten D.J. (2002):** Tumors in Domestic Animals. 4th ed, Iowa State Press A Blackwell Publishing Company, 27.
120. **Michael H.R., Wojciech P. (2011):** Histology A Text and Atlas: with Correlated Cell and Molecular Biology sixth edition” 1-3.

121. **Montali G., Solbiah L., Croce F. Ierace T., Ravetto C. (1982):** Fine-needle aspiration biopsy of liver focal lesions ultrasonically guided with a real-time probe. Report on 126 cases. *Br. J. Radiol.*, **55**(658): 717-723.
122. **Moore P.F., Rosin A. (1986):** Malignant histiocytosis of Bernese Mountain dogs. *Vet. Pathol.*, **23**: 1-10.
123. **Moore P.F., Rossitto P.V., Danilenko D.M. (1990):** Canine leukocyte integrins: characterization of a CD 18 homologue. *Tissue Antigens*, **36**: 211-220.
124. **Moore P.F., Affolter V.K., Vernau W. (2000):** Immunophenotyping in the dog. In: BONAGURA J.D.: Kirk and current veterinary therapy-XIII. Small animal practice. Philadelphia: W.B. Saunders 505-509.
125. **Morris J.S., Nixon C., King O.J.A., Morgan I.M., Philbey A.W. (2008):** Expression of the Top BP1 in canine mammary neoplasia in relation to histological type, Ki-67, ER and p53. *Vet. J.*, doi : 10.1016/j.tvjl.2007.10.025.
126. **Morrison W.B. (2002):** Cancer in dogs and cats: medical and surgical management. 2nd ed. Jackson, Wyoming: Williams & Wilkins, 795.
127. **Muller A., Guaguère E. (2006):** Métastases cutanées : Guide pratique de dermatologie canine. Kalianxis, Paris 521-525.
128. **Muller A., Guaguère E. et Degorce-Rubiales F. (2014) :** Mast cell tumor. Practical Canine Dermatology, Guide 37, 485-493.
129. **Neer M.T. (1996):** Clinical approach to splenomegaly in dogs and cats. *The Compendium*, **18**(1): 35-46.
130. **Nelson R.W., Couto C.G., Bunch S.E., Grauer G.F., Hawkins E.C., Johnson C. A., Lappin M.R., Taylor S.M., Ware W.A., Willard W.D. (1998):** Diagnostic tests for the lower respiratory tract, In : Nelson R.W., Couto C.G Small Animal Internal Medicine St. Louis, Mosby, 254-296.
131. **Nieto A., Pena L., Perez Alenza M.D. (2000):** Immunohistochemical detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathological associations and prognostic significance. *Vet. Pathol.*, **37**: 239-247.
132. **Norris A.M., Laing E.J., Valli V.E., Withrow S.J., Macy D.W., Ogilvie G.K., Tomlinson J., McCaw D., Pidgeon G., Jacobs R.M. (1992):** Canine bladder and urethral tumors: a retrospective study of 115 cases (1980-1985). *J. Vet. Intern. Med.*, **6**(3): 145-53.

133. **Ogilvie G.K., Haschek W.M., Withrow S.J., Richardson R.C., Harvey H.J., Henderson R.A., Fowler J.D., Norris A.M., Tomlinson J., McCaw D., Klausner J.S., Reschke R.W., Mackiernan B.C. (1989):** Classification of primary lung tumors in dogs: 210 cases (1975-1985). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **195**(1): 106-8.
134. **Olson P.N., Wrigley R.H., Thrall M.A., Husted P.W. (1987):** Disorders of the canine prostate gland: pathogenesis, diagnosis, and medical therapy. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.*, **9**(6): 613-623.
135. **Ozaki K., Yamagami T., Nomura K., Narama I. (2007):** Prognostic significance of surgical margin, Ki-67 and cyclin D1 protein expression in grade II canine cutaneous mast cell tumor. *J. Vet. Med. Sci.*, **69**(11): 1117-21.
136. **Papageorges M., Gavin P.R., Sande R.D., Barbee D.D. (1988):** Ultrasound-guided fine needle aspiration: An inexpensive modification of the technique. *Vet. Radiol.*, **29**: 269-271.
137. **Pastor M., Chalvet-Monfray K., Marchal T., Keck G., Magnol J.P., Fournel-Fleury C., Ponce F. (2009):** Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J. Vet. Intern. Med.*, **23**(2): 301-310.
138. **Patel R.T., Caceres A., French A.F., Mc Manus P. (2005):** Multiple myeloma in 16 cats: a retrospective study. *Vet. Clin. Pathol.*, **34**(4): 341-352.
139. **Pedersen T.S., Gronwall S., Hohn H.H. (1984):** Ultrasonically guided fine-needle aspiration of gastrointestinal mass lesions. *J. Ultrasound Med.*, **3**: 65-68.
140. **Peña L.L., Nieto A.I., Pérez-Alenza D., Cuesta P., Castaño M. (1998):** Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**(3): 237-246.
141. **Pennick D.G., Moore A.S., Tidwell A.S., Matz M.E., Freden G.O. (1994)** Ultrasonography of alimentary lymphosarcoma in the cat. *Vet. Radiol. Ultrasound*, **35**(4): 299-304.
142. **Pennick D.G., Finn-Bodner S.T. (1998):** Updates in interventionnal ultrasonography. *Vet. Clin. N. Amer.- Small Anim. Pract.*, **28**: 1017-1021.
143. **Perez Alenza M.D., Pena L., del Castillo N., Nieto A.I. (2000):** Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J. Small Anim. Pract.*, **41**: 287-291

- 144. Phillips B.S., Kass P.H., Naydan D.K., Winthrop M.D., Griffey S.M., Madewell B.R. (2000):** Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J. Vet. Diagn Invest.*, **12**(2): 111-7.
- 145. Ponce F., Magnol J.P., Ledieu D., Marchal T., Turinelli V., Chalvet-Monfray K., Fournel-Fleury C. (2004):** Pronostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet. J.*, **167**(2): 158-166.
- 146. Pouletty N. (2014) :** Prélèvement cytologique de lésions solides : Ponction à l'aiguille fine, impression, grattage et écouvillon. . *Vet. Diagn Invest.*, **15**(2): 1-7
- 147. Prelich G., Tan C.K., Kostura M., Mathews M.B., So A.G., Downey K.M., Stillman B. (1987):** Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase auxiliary protein. *Nature*, **326**: 517-520.
- 148. Preziosi R., Sarli G., Benazzi C., Marcato P.S. (1995):** Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. *J. Comp. Pathol.*, **113**: 301-313.
- 149. Pumarola M., Balasch M. (1996):** Meningeal carcinomatosis in a dog. *Vet. Rec.*, **138**: 21, 523-524.
- 150. Radin M., Judith D.,Maxey L., Wellman C., (2004):** Interpretation of Canine and Feline Cytology, Clinical Handbook Series, Wilmington-Delaware, 30-31.
- 151. Raskin R.E., Meyer D.J. (2010):** Canine and feline cytology a color Atlas and interpretation guide W. B.Saunders company 2nd ed, Philadelphia, p 1-17, 231-252.
- 152. Rebar A.H., DeNicola D.B., Muggenburg B.A. (1980):** Bronchopulmonary lavage cytology in the dog: normal findings. *Vet. Pathol.*, **17**: 294-304.
- 153. Reyes, F. (2001)** Les lymphomes malins non hodgkiniens. s.l.: John Libbey Eurotext, Paris, 9.
- 154. Riviere D. (2001):** Cytologie des masses thoraciques chez le chien. *L'essentiel*, **237** : 22.
- 155. Robbins B.A., de la Vega D., Ogata K., Tan E.M., Nakamura R.M. (1987):** Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **111**: 841-84518.
- 156. Roels S.L., Tilmant K., Ducatelle R. (1999):** PCNA and Ki-67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *J. Comp. Pathol.*, **121**: 13-24.

157. **Rogers K.S., Wantschek L., Lees G.E (1986):** Diagnostic evaluation of the canine prostate. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.*, **8**(11): 799-811.
158. **Root-Kusritz M.V., Klausner J.S. (2000):** Prostatic diseases. In: Ettinger S.J. and Feldman. E.C. Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia, WB Saunders Company. 2: 1687-1698.
159. **Ross W., Hall P.A. (1995):** Ki-67 from antibody to molecule to understanding. *J. Clin. Pathol. Clin. Mol. Pathol.*, **218**: M113-M117.
160. **Rubiales F.D. (2009) :** Notions de cytologie cutanée tumorale. L'indispensable de dermatologie canine et féline. 061-072 Article 06_BATCLC BAG 10 septembre 2009. 61-72.
161. **Sandusky G.E., Horton P.J., Wightman K.A. (1986):** Use of monoclonal antibodies to human lymphocytes to identify lymphocyte subsets in lymph nodes of the rhesus monkey and dog. *J. Med. Primatol.*, **15**: 441-451.
162. **Sapierzyński R., Micuń J. (2009):** Lymphadenomegaly in dogs--cytological study. *Pol. J. Vet. Sc.*, **12**(2): 263-268.
163. **Sarli G., Benazzi C., Preziosi R., Della Salda L., Bettini G., Marcato P.S. (1999):** Evaluating mitotic activity in canine and feline solid tumors: standardizing the parameter. *Biotech. Histochem.*, **74**: 64-76.
164. **Sarli G., Benazzi C., Preziosi R., Marcato P.S. (1995):** Assessment of proliferative activity by anti-PCNA monoclonal antibodies in formalin-fixed, paraffin-embedded samples and correlation with mitotic index. *Vet. Pathol.*, **32**: 93-96.
165. **Sasaka K., Murakami T., Kawasaki M., Takahashi M. (1987):** The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J. Cell. Physiol.*, **133** : 579-584.
166. **Saunders H.M. (1996):** The role of ultrasound-guided biopsy in clinical practice. *Vet. Annual*, **36**: 86-97.
167. **Sawhney N., Hall P.A. (1992):** Ki-67. Structure, function and new antibodies. *J. Pathol.*, **168**: 161-162.
168. **Scase T.J., Edwards D., Miller J., Henley W., Smith K., Blunden A., Murphy S. (2006):** Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *J. Vet. Intern. Med.*, **20**(1): 151-8.

- 169. Schonk D.M., Kuijpers H.J., van Drunen E., van Dalen C.H., Geurts van Kessel A.H., Verheijen R., Ramaekers F.C. (1989):** Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum. Genet.*, **83**: 297-299.
- 170. Schrader S.C. (1995):** The use of laboratory in the diagnosis of joint disorders of dogs and cats. In: Bonagura, editors, Kirk's current veterinary therapy XII, small animal practice. Philadelphia: WB Saunders, 1167-1169.
- 171. Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E. (2001):** Lymphohistiocytic neoplasms. In: Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E., Muller and Kirk's small animal dermatology. Sixth edition. W.B. Saunders: Philadelphia, 1330-1357.
- 172. Seigneurin D., Guillaud P. (1991) :** L'antigène Ki-67, marqueur du cycle cellulaire et de la prolifération tumorale. *Pathol. Biol.*, **39**: 1020-1028.
- 173. Silvestrini R., Costa A., Vereroni S., Del Bino G., Persici P. (1988):** Comparative analysis of different approaches to investigate cell kinetics. *Cell Tissue Res.*, **21**: 123-131.
- 174. Simoes J.P., Schoning P., Butine M. (1994):** Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet. Pathol.*, **31**: 637-647.
- 175. Smith S. (1989):** Ultrasound-guided biopsy. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, **4**(1): 95-104.
- 176. Sokółowska J., Micun J., Malicka E., Lechowski R. (2012):** Proliferation activity in canine lymphomas. *Pol. J. Vet. Sci.*, **15**(4): 727-34.
- 177. Spilmont C., Cadoré J.L. (2007):** Examens endoscopique et perendoscopique de la trachée et des bronches. EMC – Vétérinaire: 1-8 [Article 3300].
- 178. Stevens A., Lowe J. (1997) :** Histologie humaine. De Boeck Supérieur, 2nd ed, 6-7.
- 179. Tamburro R., Spinella G., Bettini G., Capitani O. (2008):** Néoplasie mésoenchymateuse de l'appareil urinaire du chien. *Point Vét.*, **39**(285) : 59-62.
- 180. Tartar-Zamolo M.D., Marsan C. (1985) :** difficultés de diagnostic cytologique des ascites. *Arch. Anat. Cyto. Path.*, **33**(1): 39-46.
- 181. Taylor S.M. (2003):** Clinical manifestations of and diagnostic tests for joint disorders. In: Nelson RW, Guillermo-Couto C, editors, Small animal internal medicine, 3rd ed, Saint-Louis : Mosby, 1071-1078.
- 182. Teske E., de Vos J.P., Egberink H.F., Vos J.H. (1994a):** Clustering in canine malignant lymphoma. *Vet. Q.*, **16**(2): 134-136.

- 183. Teske E., Wisman P., Moore P.F., van Heerde P. (1994b):** Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas. *Exp. Hematol.*, **22**(12): 1179-87.
- 184. Teske E., Nickel R.F. (1996):** The accuracy of cytology in the diagnosis of prostatic cancer in the dog. *Kleintierpraxis*, **41**(4): 239-247.
- 185. Teske E., Van Heerde P. (1996):** Diagnostic value and reproducibility of fine-needle aspiration cytology in canine malignant lymphoma. *Vet. Quarterly*, **18**(3): 112-115.
- 186. Thrall M.A. (1981):** Lymphoproliferative disorders. Lymphocytic leukemia and plasma cell myeloma. *Vet. Clin. North Am. (Small Anim. Pract.)*, **11**(2): 321-347.
- 187. Tyler R.D., Cowell R.L., Meikoth J.H. (2006):** Moelle osseuse: Guide pratique de cytologie et hématologie du chien et du chat. New York: Elsevier Inc, 254-283.
- 188. Valli, V.E., Jacobs R.M., Parodi A.L., Verneau W., Moore P.F. (2002):** Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology and the World Health Organization Washington D.C.
- 189. Valli V.E., Vernau W., de Lorimier L.P., Graham P.S., Moore P.F. (2006):** Canine Indolent Nodular Lymphoma. *Vet. Pathol.*, **43**: 241-56.
- 190. Van Bockstaele D.R., Lan J., Snoeck H.W., Korthout M., De Bock R.F., Peetermans M.E. (1991):** Aberrant Ki- 67 expression in normal bone marrow revealed by multiparameter flow cytometric analysis. *Cytometry*, **12**: 50-63.
- 191. Vascellari M., Giantin M., Capello K., Carminato A., Morello E.M., Vercelli A., Granato A., Buracco P., Dacasto M., Mutinelli F. (2013):** Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. *Vet. Pathol.*, **50**(1): 110-21.
- 192. Verheijen R., Kuijpers H.J.H., Schlingemann R.O., Boehmer A.L.M., Van Driel R., Brakenhoff G.J., Ramaekers F.C.S. (1989):** Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. Intracellular localisation during interphase. *J. Cell. Sci.*, **92**: 123-130.
- 193. Vernau W., Moore P.F. (1999):** An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **69**: 145-164.
- 194. Waseem N.H., Lane D.P. (1990):** Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J. Cell. Sci.*, **96**: 121-129.

195. Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Miller R.A., Kaneene J.B., Kiupel M. (2007): Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet. Pathol.*, **44**: 298-308.
196. Whitehair J.G., Griffey S.M., Olander H.J., Vasseur P.B., Naydan D. (1993): The accuracy of intraoperative diagnoses based on examination of frozen sections. A prospective comparison with paraffin-embedded sections. *Vet. Surg.*, **22**(4): 255-259.
197. Withrow S.J., MacEwen E.G. (2007): Small animal clinical oncology. 4th edition. Philadelphia: WB Saunders, 120.
198. Wood E.F., O'brion R.T., Young K.M. (1998): Ultrasound-guided fine-needle aspiration of focal parenchymal lesions of the lung in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.*, **12**: 338-342.
199. Wurm S., Ueberschar S., Nolte I. (1993): Evidence of cytological diagnosis of skin and mammary neoplasms in dogs. *Monatshefte fur Veterinarmedizin*, **48**(9): 473-478.
200. Yang P.C., Luh K.T., Wu H.D., Chang D.B., Lee L.N., Kuo S.H., Yang S.P. (1990): Lung tumors associated with obstructive pneumonitis: US studies. *Radiologie*, **174**: 717-720.
201. Zeman E.M., Calkins D.P., Cline J.M., Thrall D.E., Raleigh J.A. (1993): The relationship between proliferative and oxygenation status in spontaneous canine tumors. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.*, **27**.
202. Zhu B.Y., Johnson L.R., Vernau W. (2015): Tracheobronchial brush cytology and bronchoalveolar lavage in dogs and cats with chronic cough: 45 Cases (2012-2014). *J. Vet. Intern. Med.*, **29**: 526-532 (p 527).
203. Zinkl J.G. (2006): Examen cytologique de l'appareil reproducteur male. In: R.L. Cowell, R.D. Tyler and J.H. Meinkoth. Guide pratique de cytologie et hématologie du chien et du chat. Paris, Editions Med'com: 230-239.
204. Zuccaril D.A., Santana A.E., Cury P.M., Cordeiro J.A. (2004): Immunohistochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Vet. Clin. Pathol.*, **33**: 23-28.

RÉFÉRENCE INTERNET

205. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/histo.htm>

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE VETERINAIRE DE SIDI THABET

THESE DE DOCTORAT VETERINAIRE

TITRE : Apport de la cytologie et de l'histologie en oncologie canine

NOM ET PRENOM : Yasmine CHEIKH ALI

DIRECTEUR DE THESE : Pr. Ahmed REJEB

CHAIRE : Anatomie Pathologique

DATE DE SOUTENANCE : 06 Fevrier 2016

MOTS CLES : Cytologie, Histologie, Tumeur, Oncologie, Chien

REFERENCES : 205

RESUME :

L'oncologie représente un domaine de la médecine vétérinaire en expansion constante au cours de ces dernières années. Aussi la prévalence des cancers, en tant que cause de mortalité directe ou indirecte chez le chien, n'a pas cessé de croître.

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.

La cytologie permet un diagnostic rapide et une bonne fiabilité. Elle permet également une analyse cytologique fine des cellules malgré que certaines limites existent toujours d'où l'intérêt de l'examen histologique

L'histologie, examen de référence en anatomie pathologique, offre une excellente fiabilité diagnostique à partir de types très variés de prélèvements en pré-, per- et post opératoire. Elle permet de confirmer la nature tumorale, de déterminer le grade, de vérifier si les marges d'exérèse sont saines ou infiltrées par des cellules néoplasiques et de déceler la présence d'embolies signe d'un potentiel métastatique. Ces critères histologiques permettent de déterminer le pronostic et de déduire la conduite thérapeutique.

Les examens cytologiques et histologiques sont ainsi nécessaires pour l'obtention d'informations diagnostiques et pronostiques permettant aux chirurgiens et aux cliniciens une stratégie thérapeutique adaptée vis-à-vis d'un processus tumoral.

NATIONAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE, SIDI THABET

DOCTORAL THESIS VETERINARY

TITLE: Contribution of cytology and histology in canine oncology

FULL NAME: Yasmine CHEIKH ALI

SUPERVISOR: Prof. Ahmed REJEB.

DISCIPLINE: Pathological anatomy

PRESENTATION DATE: February 6, 2016

KEYWORDS: Cytology, histology, tumor, oncology, Dog

REFERENCES: 205

ABSTRACT:

Oncology is a discipline of veterinary medicine steadily expanding in recent years. As the prevalence of cancer, as a direct or indirect cause of mortality in dogs, has not stopped growing.

In this context, the histological examination of tumors occupies a place of prime importance in oncology. It is the inevitable stage of diagnosis, to recognize the tumoral nature of a lesion and especially to identify the histological type.

Cytology allows rapid diagnosis and good reliability. It also allows a delicate cytological analysis of cells despite the limits that exists, Hence the interest of histological exams.

Histology, reference examination in anatomic Pathology, offers excellent diagnostic reliability from various types of samples pre-, intra- and postoperatively. It confirms the tumor nature, determine the grade, check if the surgical margins are healthy or infiltrated by neoplastic cells and detect the presence of emboli sign of metastatic potential. These histological criteria for determining prognosis and therapeutic management.

Cytological and histological examinations are thus necessary for obtaining diagnostic and prognostic information to enable surgeons and clinicians to establish a therapeutic strategy adapted to a tumor process.

المدرسة الوطنية للطب البيطري

أطروحة دكتوراه بيطرية

العنوان: إسهام علم الخلايا والأنسجة في علم الأورام لدى الكلاب

الاسم : ياسمين الشيخ علي

المشرف: الأستاذ أحمد رجب

تاريخ الأطروحة : 06 فيفري 2016

المنبر : التشريح المرضي

كلمات البحث: علم الخلايا, علم الأنسجة, السرطان, علم الأورام, كلب

المراجع الأدبية: 205

ملخص:

يشهد مجال علم الأورام تطورا مستمرا خلال السنوات الأخيرة موازاة مع مرض السرطان الذي يمثل سببا مباشرا وغير مباشر للوفيات لدى الكلاب. في هذا السياق يحتلّ علم الأنسجة مرتبة متقدمة في علم الأورام إذ يمثل خطوة أساسية في التشخيص و يوفرّ فرص لمعرفة الطبيعة الورمية للإصابة. وبالأخص تحديد نوع النسيج يوفرّ علم الخلايا تشخيصا سريعا ودقيقا لكن بعض حدود هذه التقنية تستدعي اللجوء إلى علم الأنسجة.

علم الأنسجة هو اختبار مثالي في علم التشريح المرضي ويوفر تشخيصا دقيقا من خلال الاعتماد على عينات قبل واثر وبعد العملية الجراحية وتمكن أيضا من تحليل دقيق للخلايا الورمية ويؤكد طبيعة الورم، وتحديد الصنف، ومعرفة ما إذا كانت الهوامش الجراحية صحية أو مخترقة من قبل الخلايا الورمية ويكشف عن وجود علامة الصمّات اللّتي تدلّ على انتشار الورم. هذه المعايير النسيجية تسمح بتحديد التشخيص وإدارة العلاج.

تشمل الاختبارات الخلايا والأنسجة ضرورة ملحة للطبيب كما للجراح للحصول على تشخيص يسهل تحديد إستراتيجية ملائمة لعلاج الأورام.