

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MELANOMES
CUTANES CANINS :
RECHERCHE DE CRITERES HISTOLOGIQUES ET
IMMUNOHISTOCHIMIQUES PRONOSTIQUES A
PARTIR D'UN ECHANTILLON DE 65 CAS**

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2002
devant l'université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Caroline, Catherine, Andrée LACROUX
Née le 19 juin 1975 à CASTRES (Tarn)

Directeur de thèse : Mr le Professeur Maxence DELVERDIER

JURY

PRESIDENT :

M. Claude CARATERO

Professeur à l'université Paul-Sabatier de TOULOUSE

MEMBRES :

M. Maxence DELVERDIER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Nathalie BOURGES-ABELLA

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de
TOULOUSE

A notre jury de thèse,

Monsieur le Professeur CARATERO

Professeur des universités

Praticien hospitalier – Histologie - Embryologie

*Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de
thèse, hommage respectueux*

Monsieur le Professeur DELVERDIER

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Histologie et Anatomie Pathologique

Qui nous a confié ces travaux

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance

Madame le Docteur BOURGES-ABELLA

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Histologie et Anatomie Pathologique

Qui a aimablement accepté de faire partie de notre jury

Sincères remerciements

A mes parents et mon frère, pour qui ma reconnaissance va au-delà des mots...

A toute ma famille et Dieu sait qu'elle est précieuse...

Aux nouveaux venus dans la famille, Georges, Espérance et Nicolas

A tous mes amis d'ici ou d'ailleurs...

Aux Docteurs Agnès Poujade et Frédérique Degorces-Rubiales, pour m'avoir ouvert les portes de leur laboratoire et donné un accès illimité à leur collection de prélèvements...

A Marie et Armelle pour ces heures passées à techniquer des lames et à compter des cellules...

Au Docteur Philippe Jacquet : sans toi, point de statistiques...

Au Professeur Paul Cabanié, pour ses conseils judicieux ; en espérant qu'on puisse encore longtemps présider à deux des séances inoubliables d'autopsies bovines (et canines...)... »Je le vois, je le sais, je le dis et...'

Au Docteur Jean-Pierre Pagès et toute la clinique vétérinaire de la Croix du Sud, pour ces quelques années...

A «Maurice et Mauricette» : continuez, on sait jamais, le transport illégal de mouchoirs et de croquettes risque un jour de rapporter gros...

A Pygmalion...

Enfin et surtout, à Olivier, qui me supporte plus souvent que les autres : sans toi, je ne serais pas grand chose...Avec tout mon amour...

SOMMAIRE

SOMMAIRE	4
INTRODUCTION	6
PREMIERE PARTIE : MATERIEL ET METHODES	9
1 – Echantillonnage et prélèvements	10
2 – Suivi clinique post-diagnostic	10
3 – Technique histologique conventionnelle	10
4 – Techniques immunohistochimiques	11
4.1 – Anticorps primaires utilisés	11
4.2 – Immunomarquages	12
4.2.1 – Prétraitement	12
4.2.2 – Principales étapes techniques	12
4.3 – Contrôles	13
5 – Stratification	13
5.1 – Critères épidémiologiques et cliniques	13
5.2 – Analyse histopathologique	14
5.3 – Analyses immunohistochimiques	16
6 – Analyses statistiques	17
DEUXIEME PARTIE : RESULTATS	18
1 – Epidémiologie	19
2 – Evolution clinique	20
2.1 – Distribution anatomique des lésions	20
2.2 – Taille des lésions	21
3 – Résultats de l'analyse histopathologique	21
3.1 – Critères architecturaux	21
3.2 – Critères cytologiques	26
4 – Résultats de l'analyse immunohistochimique	29
4.1 – Contrôles	29
4.2 – Evaluation des marqueurs immunohistochimiques	30
4.3 – Utilisation des critères combinés CD44 et Ki-67	34

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION	40
1 – Echantillonnage	41
2 – Durée du suivi post-opératoire	41
3 – Aspects épidémiocliniques	42
4 – Nature et distribution anatomique des lésions	42
5 – Techniques immunohistochimiques	43
6 – Critères histo-pronostiques	44
7 – Immunomarquages et pronostic	47
CONCLUSION	51
BIBLIOGRAPHIE	54
ANNEXES	60
Annexe n°1 – Fiche de suivi clinique	61
Annexe n°2 – Fiche de lecture histologique	62
Annexe n°3 – Résultats bruts épidémiologiques et cliniques	63
Annexe n°4 – Résultats bruts de l'analyse histologique	65
Annexe n°5 – Résultats bruts de l'analyse immunohistochimique	68
Annexe n°6 – Poster présenté à la Société Française d'Anatomie Pathologique Vétérinaire en Décembre 2001 intitulé "Expression immunohistochimique du CD44 dans les mélanomes cutanés canins : Etude préliminaire"	70
TABLE DES ILLUSTRATIONS	71

INTRODUCTION

Chez le chien, les mélanomes représentent environ 7% des néoplasies et 9 à 20% des néoplasies cutanées (Gross, 1992 ; Pulley, 1990). Ces lésions se présentent fréquemment sous la forme de nodules solitaires pigmentés. Contrairement à l'homme et sans doute en raison de la présence du pelage, le vétérinaire praticien et le pathologiste sont le plus souvent confrontés à des lésions détectées tardivement.

Si dans l'espèce humaine, une démarche diagnostique standardisée faisant appel à de nombreux critères et débouchant sur un histopronostic fiable existe, dans le domaine vétérinaire les repères manquent. Quelques éléments semblent posséder toutefois un certain degré de pertinence ; ainsi un mauvais pronostic est, semble-t-il, systématiquement associé au mélanome labial qui s'apparente en cela au mélanome de la cavité buccale. Toutefois, si la variété des histo-types décrits pour les tumeurs mélaniques canines est impressionnante, la seule classification à visée pronostique disponible a été établie par Bostock en 1979 (Bostock, 1979). Dans celle-ci les lésions pour lesquelles le nombre de mitoses sur 10 champs au grossissement 400 du microscope est supérieur à 3 sont considérées comme malignes. Cette classification est cependant considérée d'une fiabilité restreinte par les pathologistes, tant ses valeurs prédictives positive et négative s'avèrent faibles ; de nombreux confrères n'hésitent donc pas à influencer le pronostic par l'impression générale que leur laisse la néoplasie observée en termes de bénignité ou de malignité.

Plus récemment, des outils immunologiques issus de la pathologie humaine sont devenus disponibles en pathologie canine. C'est le cas des marqueurs de prolifération cellulaire (antigènes Ki-67 et PCNA), qui chez l'homme, et apparemment chez le chien, permettent d'affiner sensiblement le pronostic rendu par le pathologiste. De même, et toujours dans un souci pronostique, d'autres marqueurs ont été depuis peu explorés avec succès en pathologie humaine. Ils font appel :

- soit à la présence de facteurs de différenciation des mélanocytes (Melan A par exemple) ; ces facteurs étant théoriquement moins exprimés par des cellules néoplasiques moins différenciées et donc plus agressives,
- soit au niveau d'expression de molécules d'adhésion (CD44 par exemple), normalement présentes à la surface des mélanocytes et dont la surexpression pourrait favoriser la dissémination à distance des cellules mélanocytaires tumorales (Edward, 1995).

Au travers de cette étude, nous avons tenté, à partir d'un échantillon de 65 cas pour lesquels nous disposions d'un suivi clinique post-opératoire de bonne qualité :

- (i) d'évaluer la pertinence de nombreux critères histologiques (architecturaux et cytologiques) pour le pronostic des mélanomes cutanés du chien ; la gamme des paramètres explorés s'inspirant largement de ceux utilisés en médecine humaine
- (ii) d'évaluer les deux critères récemment validés chez l'homme que sont le pourcentage de cellules néoplasiques marquées par le Melan A et l'intensité du marquage CD44, en les confrontant à l'outil déjà validé dans ce type de tumeurs chez le chien qu'est l'antigène de prolifération Ki-67.

PREMIERE PARTIE : MATERIEL ET METHODE

1 – Echantillonnage et prélèvements

Seules les lésions cutanées histologiquement diagnostiquées comme d'origine mélanique ont été retenues pour cette étude (mélanomes, mélanocytomes, tumeurs du système mélanogène...). Les lésions des jonctions cutanéomuqueuses, en particulier les mélanomes de la cavité buccale, ainsi que les lésions mélaniques de l'œil (hormis les localisations palpébrales strictes) ont donc été exclues.

Les prélèvements utilisés proviennent des collections du Laboratoire d'Anatomie Pathologique Vétérinaire de Toulouse (LAPVSO, 129 Route de Blagnac 31201 Toulouse Cedex) et du laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse. Les soixante cinq cas retenus se sont volontairement cantonnés aux années 1997 à 2000 ; cette durée rétrospective restreinte permettant la réalisation d'une enquête fiable auprès des vétérinaires traitants dont la plupart ne conservent les archives ou la mémoire des cas que sur une courte période.

L'ensemble des prélèvements étudiés correspond à des pièces d'exérèse chirurgicale fixées dans une solution de formol tamponné à 10%, recoupées, incluses et archivées en blocs de paraffine. Les délais de fixation sont ceux du diagnostic histologique de routine. Certains échantillons ont subi une étape de décalcification préalable de durée variable en raison de la présence de tissu osseux dans le prélèvement (lésions du lit de l'ongle essentiellement).

2 – Suivi clinique post- diagnostic

Les données relatives à l'évolution clinique des lésions (récidive locale) et des animaux (pronostic vital et métastases) ont été recueillies par le biais d'un questionnaire envoyé aux vétérinaires ayant pratiqué l'exérèse (annexe 1). Le suivi post-opératoire correspond dans tous les cas à une période minimale de 12 mois.

3 – Technique histologique conventionnelle

Les blocs ont été coupés à environ 3 µm d'épaisseur. Les lames ainsi obtenues ont été séchées (37°C, une heure) puis déparaffinées dans du toluène (1 bain de 5 minutes), avant d'être

réhydratées dans des bains d'éthanol de concentrations décroissantes (éthanol absolu : 1 bain de 5 minutes, éthanol à 95° : 1 bain de 5 minutes, eau courante : 1 bain de 5 minutes). Une coloration conventionnelle Hémalum-éosine a ensuite été pratiquée : les lames ont été plongées 20 secondes dans une solution d'Hémalum de Mayer, rincées à l'eau courante pendant 5 minutes puis plongées 12 secondes dans une solution d'éosine-érythrosine aqueuse à 1%. Les lames ont été à nouveau déshydratées par des bains d'éthanol de concentrations croissantes, puis placées dans du toluène. Des lamelles ont été alors montées en milieu synthétique avant lecture des lames.

4 – Techniques immunohistochimiques

4.1 : Anticorps primaires utilisés

*Melan A : Cet anticorps monoclonal produit chez la souris (isotype IgG1, clone A103 - DAKO, référence M7196) est dirigé contre l'antigène MelanA (MART-1), antigène de différenciation mélanocytaire reconnu par les lymphocytes T cytotoxiques autologues (Chen, 1996). Sa réactivité croisée dans l'espèce canine a déjà été démontrée (Ramos-Vara, 2000 ; Koenig, 2001).

*CD44 : L'anticorps monoclonal MCA1449 (isotype IgG1, SEROTEC, référence MAC329) est un anticorps produit chez le rat. Il reconnaît le CD44 du porc (Yang, 1993). A notre connaissance, cet anticorps n'a jamais été utilisé dans l'espèce canine. La probabilité de réactivité croisée avec le chien nous a toutefois poussés à le valider en raison de la forte homologie de la séquence en acides aminés de cette molécule chez la plupart des mammifères (Yang, 1993 ; Sandmaier, 1998).

*Ki-67 : L'anticorps monoclonal MIB-1 (isotype IgG1, DAKO, référence M7240) produit chez la souris est dirigé contre l'antigène Ki-67 humain. Cette protéine est exprimée dans le noyau des cellules en prolifération (phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire) (Falini, 1989). La réactivité croisée de cet anticorps pour l'espèce canine a déjà été démontrée par plusieurs études (Roels, 1999 ; Abadie, 1999 ; Laprie, 2001).

4.2 : Immunomarquages

Des coupes de 3 µm d'épaisseur ont été recueillies sur des lames électrostatiquement traitées (lames SUPERFROST/PLUS, CML, Nemours, France), séchées (37°C pendant une heure) puis placées à l'étuve à 56°C pendant 8 heures.

Les lames ont été déparaffinées dans du toluène (3 bains de 5 minutes) puis plongées dans l'acétone (2 bains de 5 minutes) avant d'être réhydratées dans l'eau courante (1 bain de 5 minutes). Elles ont ensuite subi un prétraitement dont l'objet est de permettre le démasquage des sites antigéniques reconnus par l'anticorps primaire (Balaton, 1993 ; McNicol, 1998).

4.2.1 : Prétraitement

*Melan A : Les lames ont été soumises à un démasquage antigénique au four à micro-ondes (700W). Trois cycles consécutifs de chauffage (10 minutes - 5 minutes - 5 minutes), dans une solution de tampon EDTA 1mM (pH:8) ont été pratiqués (Ramos-Vara, 2000). Après retour de la solution à température ambiante, les lames ont été rincées à l'eau courante.

*Ki-67 : Les lames ont subi une digestion protéolytique par une solution de trypsine à 0.1% (200 UI/g) dans un tampon P.B.S. (Phosphate Buffer Saline ; 10mM, pH:7,6) pendant 5 minutes à 37°C. Elles ont ensuite été soumises à un chauffage au micro-ondes dans une solution de tampon citrate 10 mM à pH:6,15 (Laprie, 2001).

*CD44 : Cet anticorps n'ayant jamais été employé dans l'espèce canine, nous avons testé deux types de prétraitements : un prétraitement au micro-ondes seul, identique à celui décrit pour l'anticorps Melan A ; et un prétraitement combinant une digestion protéolytique et un chauffage au micro-ondes, identique à celui utilisé pour l'anticorps Ki-67.

4.2.2 : Principales étapes techniques

Ces étapes sont celles d'une méthode streptavidine-biotine-peroxydase standard. Après inhibition des peroxydases endogènes dans un bain de méthanol additionné de peroxyde d'hydrogène (solution finale à 0,1% vol/vol de peroxyde d'hydrogène) pendant 30 minutes à température ambiante, les lames ont été équilibrées dans une solution de P.B.S. (1/10^{ème}) additionnée de 1% de S.A.B. (Sérum Albumine Bovine).

Afin de minimiser les fixations non spécifiques, un sérum normal de chèvre dilué au 1/10^{ème} dans du P.B.S. a été appliqué pendant 20 minutes à température ambiante.

L'anticorps primaire dilué au 1/100^{ème} (Melan A), au 1/50^{ème} (Ki-67) et au 1/30^{ème} (CD44) dans une solution de P.B.S. additionnée de 0,1% de S.A.B. a été appliqué pendant 60 minutes à température ambiante.

Un anticorps secondaire de chèvre biotinylé dirigé contre les chaînes lourdes des immunoglobulines de lapin et de souris (DAKO, référence K0492) (anticorps primaires Melan A et Ki-67), dilué au 1/100^{ème} dans du P.B.S. a été appliqué pendant 30 minutes à température ambiante.

L'anticorps dirigé contre l'épitope CD44 étant produit chez le rat, l'anticorps secondaire utilisé a été un anticorps de lapin biotinylé dirigé contre les chaînes lourdes des immunoglobulines de rat (DAKO, référence E0468), dilué au 1/300^{ème} dans du P.B.S..

Un complexe streptavidine-peroxydase dilué au 1/100^{ème} dans du P.B.S. 1/10^{ème} (DAKO, référence K0492) a ensuite été appliqué pendant 30 minutes à température ambiante.

La révélation a enfin été pratiquée en appliquant comme chromogène de l'Amino-Ethyl-Carbazole (A.E.C., précipité rouge) pendant 15 à 20 minutes.

Une contre-coloration des noyaux par l'Héματοxyline de Harris a été effectuée avant montage des lames en milieu aqueux (Faramount, DAKO, référence S3025).

4.3 : Contrôles

Pour chaque série de lames, un contrôle négatif par omission de l'anticorps primaire a été réalisé. De même, des contrôles pour lesquels l'anticorps primaire a été remplacé par une immunoglobuline de même isotype que l'anticorps primaire ont permis de caractériser une hypothétique fixation non spécifique des anticorps.

Un mélanome cutané pigmenté a été utilisé comme témoin positif pour l'anticorps Melan-A. Pour chaque lame, des structures physiologiquement marquées ont été utilisées comme contrôles positifs :

- marquage nucléaire des cellules épidermiques en prolifération de la couche basale pour l'anticorps dirigé contre l'épitope Ki-67 ;
- marquage membranaire des cellules de la couche épineuse épidermique pour l'anticorps dirigé contre l'épitope CD44.

5 – Stratification

5.1 : Critères épidémiologiques et cliniques

Pour chaque cas, la race, l'âge, le sexe et l'évolution clinique de l'animal ont été notés. La localisation anatomique et l'épaisseur des lésions ont été également prises en compte.

5.2 : Analyse histopathologique

Les lames colorées à l'hémalun-éosine ont été systématiquement analysées en aveugle suivant une grille de lecture présentée en annexe (annexe n°2). Pour chaque cas ont été pris en compte des critères architecturaux et cytologiques. Tous les critères histologiques faisant l'objet d'une gradation d'intensité ont été appréciés de façon semi-quantitative par l'attribution d'une note allant de 1 à 3 (selon l'échelle léger/modéré/sévère).

*Critères architecturaux :

- *Symétrie de la lésion* : Ont été qualifiées de symétriques, les lésions dont les deux faces par rapport au grand axe perpendiculaire à l'épiderme donnent une image en miroir.
- *Distribution* : Elle correspond à la profondeur d'invasion de la lésion. Cette classification repose sur la description des cinq stades d'invasion par Clark et Mihm en pathologie humaine (1969, classification de Sydney en 1972) (Bally et Prade, 1990). La distribution intra-épidermique correspond à une prolifération mélanocytaire confinée à l'épiderme, sans invasion du derme sous-jacent (niveau I de Clark). Elle est dite jonctionnelle lorsque la prolifération cellulaire se situe uniquement à la jonction dermo-épidermique (niveau II de Clark). En raison de l'absence de différenciation derme papillaire / derme réticulaire dans la race canine (absence physiologique de crêtes épidermiques), les distributions dermiques ont été qualifiées de superficielle lorsque le niveau d'invasion ne dépasse pas la partie basale des annexes dermiques (niveau III de Clark), et de profonde lorsque la prolifération mélanocytaire s'étend au-delà de cette limite (niveau IV de Clark). Les lésions confinées au delà du tissu adipeux hypodermique ont été qualifiées de sous-cutanées (niveau V de Clark). Enfin, les proliférations mixtes dotées d'une composante dermo-épidermique sous la forme de thèques et nids de cellules tumorales et d'une composante dermique voire hypodermique ont été répertoriées comme composées.
- *Mode de croissance* : Il peut être expansif (mode de croissance habituel des néoplasmes bénins) ou infiltrant (en général associé à la malignité du processus tumoral). Une néoplasie expansive repousse les structures histologiques adjacentes en les comprimant, tout en gardant des limites nettes. Les néoplasies infiltrantes forment des cordons ou digitations cellulaires qui dissèquent les tissus périphériques et les envahissent, donnant des limites tumorales peu distinctes.

- *Forme de la tumeur* : Qualifiée de nodulaire lorsqu'elle se présente sous la forme d'une néoformation plus ou moins sphérique, elle devient multinodulaire lorsque plusieurs nodules sont coalescents. Le terme exophytique reflète une néoformation en dôme faisant protrusion à la surface cutanée.
- *Stroma réaction* : Ce terme désigne les mécanismes développés par l'organisme visant à isoler le tissu tumoral. La stroma réaction peut être fibreuse (encapsulation de la néoformation) ou cellulaire (infiltration lymphoplasmocytaire péri et intra-tumorale notamment).
- *Caractéristiques de l'épiderme* : Les principales lésions élémentaires épidermiques (ulcération, acanthose, hyperkératose ortho et parakératosique) ont été prises en compte et gradées. De même, l'activité lentigineuse (hyperplasie mélanocytaire dans la couche basale de l'épiderme) a été appréciée semi-quantitativement.

*Critères cytologiques :

- *Forme cellulaire* : Les néoplasies de nature mélanique revêtent des aspects cytologiques extrêmement variés et souvent composés. Les types cellulaires les plus communs sont les cellules globoïdes (cellules rondes aux limites nettes), les cellules fusiformes (cellules allongées aux limites souvent indistinctes), et les cellules épithélioïdes (mélanocytes tumoraux prenant l'aspect de cellules épithéliales aux contours anguleux). La cytologie a été considérée comme homogène (un seul type cellulaire, dominant) lorsque plus de 50% des cellules tumorales en adoptaient la forme. Dans les autres cas, la cytologie a été classée comme mixte (coexistence d'au moins deux types cellulaires au sein de la tumeur).
- *Forme et localisation du noyau, nucléoles* : De même que l'estimation du type cellulaire dominant, la forme nucléaire a été répertoriée comme ovoïde (noyaux ronds ou à tendance arrondie), fusiforme (noyaux allongés, étirés, effilés) ou mixte lors de la présence de cellules ayant une forme nucléaire hétérogène. La localisation du noyau au sein du cytoplasme pouvait être centrale ou excentrée. De même, la présence ou l'absence de nucléole(s) a été notée.
- *Rapport nucléocytoplasmique (RNP)* : Ce terme fait référence au rapport entre le volume du noyau et le volume du cytoplasme.
- *Atypies cytonucléaires* : Ont été gradées les atypies concernant l'irrégularité de taille des cellules (anisocytose), des noyaux (anisocaryose), ainsi que la présence de cellules multinucléées, multinucléolées ou géantes.

- *Pigmentation* : La pigmentation "d'ensemble" de la lésion a été appréciée au faible grossissement. La note 0 a été attribuée aux lésions totalement dépigmentées (dites achromiques) ; la note la plus élevée de 3 a été attribuée aux lésions dont l'ensemble des cellules était pigmenté.
- *Index mitotique* : Cet index a été calculé en additionnant les mitoses de 5 champs de la tumeur pris aléatoirement à l'objectif 400 du microscope.
- *Emboles* : Les emboles ou invasion tumorale vasculaire (veineuse, lymphatique...) représentent un critère important de malignité avancée d'une néoplasie. La présence d'îlots cellulaires néoplasiques au sein d'une structure bordée par des cellules endothéliales et dont la lumière est optiquement vide ou contient des éléments figurés sanguins a été systématiquement recherchée pendant une durée minimale de 10 minutes à fort grossissement pour chaque cas.

5.3 : Analyses immunohistochimiques

*Melan A : Un marquage cytoplasmique granuleux rouge vif a été considéré comme positif.

Pour chaque cas, le nombre de cellules positives pour 1000 cellules tumorales a été calculé puis exprimé en pourcentage (comptage de 5 champs de 200 cellules au grossissement 400 à l'aide d'un réticule). Les champs de comptage ont été choisis de façon aléatoire quand le marquage global de la tumeur était homogène. Dans le cas d'un marquage hétérogène, des champs de marquage fort mais également de marquage faible ont été choisis pour les comptages en tenant compte de leurs proportions respectives.

*CD44 : L'épitope CD44 est exprimé par de très nombreux types cellulaires : cellules épidermiques, cellules endothéliales... mais également par les mélanocytes. De ce fait, un marquage quasi-global des mélanocytes néoplasiques constituant les tumeurs interdit l'estimation d'un ratio cellules positives / 1000 cellules. Par ailleurs, le facteur pronostique associé à ce marqueur est, chez l'homme, corrélé à l'intensité relative du marquage de la tumeur (appréciation globale) plutôt qu'au nombre de cellules néoplasiques positives (Dietrich 1997). Nous avons donc choisi d'apprécier qualitativement le marquage global de la tumeur par rapport à celui obtenu dans l'épiderme (couche épineuse principalement) :

- Intensité 0 : absence de marquage sur la lame.
- Intensité faible : marquage tumoral plus faible que celui de l'épiderme.
- Intensité forte : marquage tumoral égal ou plus fort que celui de l'épiderme.

En cas d'absence de structure épidermique dans l'échantillon, le marquage a été comparé à une autre structure épithéliale présente (épithélium folliculaire, épithélium glandulaire des annexes sudoripares, épithélium mammaire...).

Un marquage rouge diffus membranaire a été considéré comme positif.

En raison de la subjectivité évidente de la lecture, les lames ont été analysées en aveugle par deux histopathologistes et les cas litigieux ont été repris par ces deux lecteurs pour aboutir à un consensus.

*Ki-67 : Ont été considérées comme positives, les cellules tumorales présentant un marquage nucléaire total, focal ou nucléolaire. Le pourcentage de cellules néoplasiques positives a été calculé en effectuant le ratio nombre de cellules positives / 500 cellules tumorales (comptage de 5 champs de 100 cellules à l'aide d'un réticule) (Laprie, 2001).

6 – Analyses statistiques

Les comparaisons de pourcentages (tests t du Khi2) ont été réalisées à l'aide du logiciel d'exploitation statistique STATITCF (1991). Les comparaisons de moyennes entre deux échantillons ont fait appel au test non paramétrique U de Mann et Whitney (logiciel SIMSTAT 1992). Les résultats ont été considérés comme significatifs lorsque la probabilité p était inférieure à 5% ($p < 0,05$).

Cependant, en raison de la taille restreinte de notre échantillon, qui conduit fréquemment à des valeurs d'effectifs théoriques calculés inférieurs à 5, certains calculs, en particulier lors de l'application de tests du Khi2, ne permettent pas de poser définitivement une conclusion, y compris lorsque la probabilité calculée reste inférieure aux 5 % admis. Les cas soumis à cette réserve sont mentionnés dans le texte.

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS

1 – Epidémiologie

Les résultats individuels sont présentés dans l'annexe n°3. L'âge de 62 des 65 cas de notre étude était connu. Les trois cas non renseignés correspondent à des animaux adoptés et dont l'âge n'était pas connu avec précision par le propriétaire. Les animaux de notre étude présentaient une moyenne d'âge de 9 ans au moment du diagnostic, avec une distribution comprise entre 5 ans et 13 ans (figure n°1).

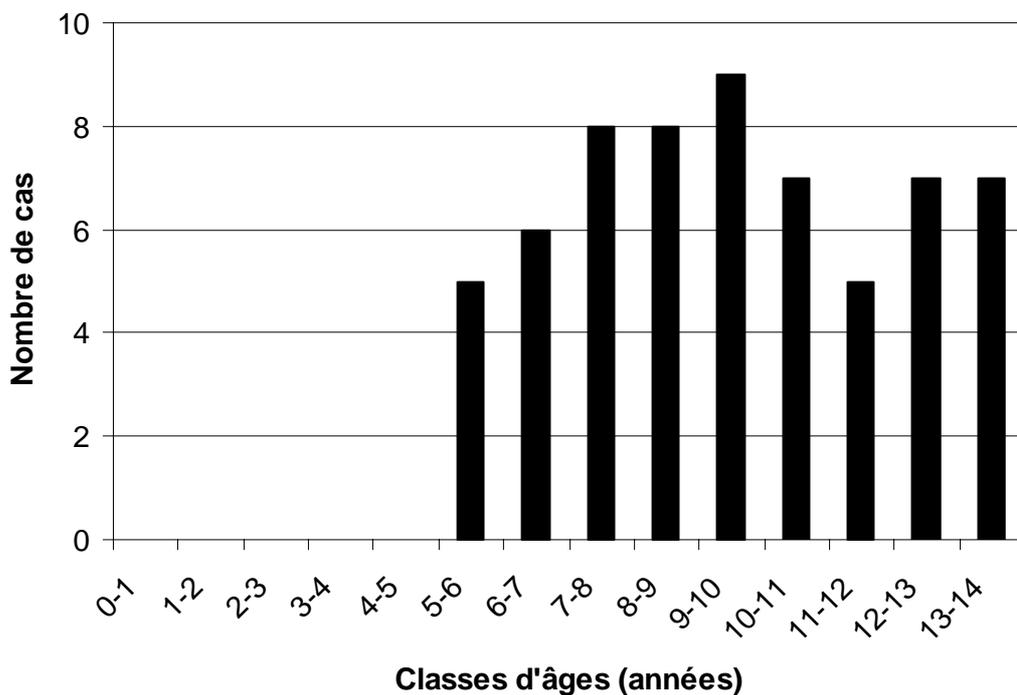


Figure n°1 : Distribution des cas en fonction de l'âge de l'animal.

Aucune prédisposition sexuelle n'est ressortie de notre échantillon puisque 34 mâles (52 %) étaient atteints contre 31 femelles (48 %).

Vingt-neuf races canines étaient représentées dans notre échantillon. La race de l'animal était connue pour 59 des cas. Pour six cas, l'animal était issu d'un croisement indéterminé. Aucune prédisposition raciale ne ressort clairement. Toutefois, les Epagneuls représentent 12% de l'effectif de l'étude, suivis par les Boxers et les Briards (8%).

2 – Evolution clinique

Pour l'ensemble des cas de l'échantillon, les données de suivi clinique ont permis d'avoir au moins 12 mois de recul après exérèse de la lésion primitive. Chaque cas a été répertorié dans une catégorie faisant référence à l'évolution clinique post-opératoire :

- Evolution favorable sur 12 mois = survie sans récurrence locale de la lésion primaire ni extension métastatique à distance : 46 cas soit 70,8 % de l'effectif.
- Evolution défavorable pendant la période de suivi : soit récurrence locale de la tumeur primitive (5 cas soit 7,7 %) ou bien mort de l'animal des suites de sa maladie par extension métastatique à distance (14 cas soit 21,5 %).

Pour 15 cas, les données de suivi post-opératoire ont pu être obtenues sur une période de 24 mois. Neuf ont eu une évolution favorable sur cette période et 6 une évolution défavorable.

2.1 – Distribution anatomique des lésions

Les régions digitées (doigt et lit de l'ongle) et les régions péri-oculaires semblent particulièrement propices au développement de ce type de néoplasies puisque ces zones regroupent à elles deux 37% des cas recensés dans notre étude. Toutefois, toutes les régions anatomiques semblent susceptibles de développer une tumeur du système mélanogène (tableau n°1).

Tableau n°1 : Répartition des cas en fonction de la distribution anatomique de la lésion.

Localisation	Nombre de cas	Pourcentage
Doigt et lit de l'ongle	13	20 %
Péri-oculaire et paupière	11	17 %
Membres	6	9 %
Babine	6	9 %
Péri-anale et péri-vulvaire	6	9 %
Tête	5	8 %
Tronc	5	8 %
Mammaire	4	6 %
Truffe	3	5 %
Queue	2	3 %
Inconnue	4	6 %

En termes d'évolution, il apparaît que 62% des lésions du doigt et du lit de l'ongle ont eu une évolution défavorable, de même que la moitié des lésions localisées à la babine. Les néoformations en régions péri-anales et péri-vulvaires ou encore appendiculaires (membres et queue) ont toutes eu une évolution favorable sur 12 mois.

Pour les autres localisations, et notamment les lésions péri-oculaires, l'évolution post-opératoire s'est révélée variable avec toutefois une prépondérance de lésions d'évolution favorable (78%).

2.2 – Taille des lésions

L'épaisseur des lésions a été évaluée par la mesure sur la lame histologique de l'épaisseur tumorale la plus importante perpendiculairement à l'épiderme.

Pour les lésions dont l'évolution est favorable sur 12 mois, la moyenne de cette épaisseur est de 0,73 cm (écart-type de 0,60 cm). Concernant les lésions d'évolution défavorable, cette moyenne est de 1,42 cm (écart-type de 0,88 cm).

Il ressort de l'emploi de l'outil statistique (test non paramétrique U de Mann et Whitney avec $U=206,5$ et $p=0,004$) que les lésions de bon pronostic ont une plus petite taille que les lésions de mauvais pronostic. Compte tenu de la relative petite taille de notre échantillon, il n'a pas été possible d'établir de seuil (avec un intervalle de confiance satisfaisant) en deçà ou au-delà duquel lequell une lésion peut être considérée comme de bon ou de mauvais pronostic.

3 - Résultats de l'analyse histopathologique

Les résultats individuels sont présentés dans l'annexe n°4.

3.1 : Critères architecturaux

*Symétrie des lésions

Sur les 65 cas, 47 lésions ont été classées symétriques à l'analyse histologique (soit 72,3 % de l'effectif total). Les 18 lésions restantes (soit 27,7 %) ont été classées asymétriques. Les lésions pour lesquelles les marges tumorales n'étaient pas présentes sur la lame et dont l'architecture de la partie de tumeur examinée ne paraissait pas symétrique ont également été classées dans cette catégorie.

Concernant les relations entre le caractère symétrique des lésions et le pronostic clinique, il apparaît qu'une majorité de lésions symétriques (89,4%) ont une évolution favorable alors que 77,8% des lésions dissymétriques évoluent de façon défavorable (tableau n°2). Ces résultats sont statistiquement significatifs (test du Khi2/2 avec $t=28,361$ et $p=0,00$).

Tableau n°2 : Répartition et évolution des cas en fonction de la nature symétrique ou dissymétrique de la lésion.

	Symétrie de la tumeur n = 47 cas	Dissymétrie de la tumeur n = 18 cas
Evolution favorable sur 12 mois	42 / 47 cas soit 89.4%	4 / 18 cas soit 22.2%
Evolution défavorable sur 12 mois	5 / 47 cas soit 10.6%	14 / 18 cas soit 77.8%

*Profondeur des lésions

Le degré d'invasion de la prolifération tumorale des structures cutanées est variable (tableau n°3). Les lésions localisées au derme superficiel strict sont les plus représentées dans notre échantillon (49,2%), suivies des lésions composées (29,3%) et des lésions dermiques pures, superficielles et profondes (18,5%). Un seul cas intéressait à la fois le derme et le tissu sous-cutané alors qu'un autre cas n'intéressait que la partie dermique profonde. Aucune lésion purement intra-épidermique, pouvant correspondre à un lentigo ne fait partie de notre échantillon.

Tableau n°3 : Répartition des cas en fonction de la distribution des lésions dans le plan cutané.

Distribution de la prolifération tumorale	Nombre de cas
Intra-épidermique stricte	0 (soit 0%)
Derme superficiel strict	32 (soit 49.2%)
Derme profond strict	1 (soit 1.5%)
Derme superficiel et profond	12 (soit 18.5%)
Derme et tissu sous-cutané	1 (soit 1.5%)
Composée	19 (soit 29.3%)

Les lésions confinées au derme superficiel semblent avoir une évolution favorable (94% des cas). De même, 68% des lésions composées ont évolué favorablement sur la période de 12 mois. En revanche, les lésions localisées au derme profond strict ainsi que les lésions ayant une composante à la fois dermique et sous-cutanée ont toutes eu une évolution défavorable.

Les tumeurs dermiques (composante dermique superficielle et profonde) ont une évolution favorable dans 33% des cas et une évolution défavorable dans 77% des cas.

L'exploitation statistique de ces résultats semble corroborer ces observations (test du Khi2/5 avec t=25,21 et p=0,000045560). Toutefois les effectifs théoriques de certaines des catégories

testées sont inférieurs à 5, et une étude sur un échantillon plus large devra être pratiquée avant toute conclusion définitive quant à l'importance de la profondeur de la lésion sur le pronostic.

*Mode de croissance

Un mode de croissance expansif a été identifié dans 43 cas et infiltrant dans 22 cas. Les tumeurs ayant un mode de croissance expansif sont majoritairement de bon pronostic (évolution favorable dans 93% des cas) alors que les néoplasies infiltrantes évoluent de façon défavorable (73% des cas) (tableau n°4). Le test statistique (test du Khi2/2 avec $t=30,415$ et $p=0,00$) confirme ces observations.

Tableau n°4 : Répartition et évolution des cas en fonction de la nature expansive ou infiltrante du processus tumoral.

	Croissance expansive n = 43 cas	Croissance infiltrante n = 22 cas
Evolution favorable sur 12 mois	40 cas /43 soit 93%	6 cas /22 soit 27%
Evolution défavorable sur 12 mois	3 cas / 43 soit 7%	16 cas /22 soit 73%

*Forme de la tumeur

L'ensemble des lésions examinées était de forme nodulaire (nodule unique, 80% des cas) ou multinodulaire (plusieurs nodules coalescents ou juxtaposés, 20% des cas). Soixante-trois pour cent des lésions ont été qualifiées d'exophytiques (protrusion à la surface cutanée ; lésions en dôme voire pédiculées).

Les lésions qualifiées de multinodulaires ont tendance à évoluer de façon défavorable (77%) (test du Khi2/2 avec $t=17,868$ et $p=0,000023682$ mais certains effectifs théoriques sont inférieurs à 5). Elles correspondent en général à des lésions dont la taille est plus importante que des lésions constituées d'un nodule unique. Ce critère est probablement lié à la taille des lésions or nous avons constaté précédemment que les lésions dont l'évolution est défavorable ont une moyenne de taille supérieure à leur contrepartie d'évolution favorable (tableau n°5).

Tableau n°5 : Répartition et évolution des cas en fonction de la forme de la tumeur.

	Forme nodulaire n = 52	Forme multinodulaire n = 13 cas
Evolution favorable sur 12 mois	43 cas /52 soit 83%	3 cas /13 soit 23%
Evolution défavorable sur 12 mois	9 cas /52 soit 17%	10 cas /13 soit 77%

*Stroma réaction

Dans 16 cas, une infiltration péri et intra-tumorale, à dominante lymphoplasmocytaire, a été constatée. L'intensité de cette stroma réaction était légère pour 10 cas (6 d'évolution favorable et 4 défavorable), modérée pour 3 cas (tous d'évolution défavorable) et sévère pour 3 des cas (2 d'évolution favorable et 1 défavorable).

Un recrutement de polynucléaires neutrophiles (réaction suppurée) dans la portion superficielle des lésions ulcérées a été systématiquement notée. Cette infiltration n'a pas été prise en compte dans la gradation de la stroma réaction inflammatoire.

Une stroma réaction fibreuse sous la forme d'une encapsulation de la tumeur a été notée dans trois cas, dont deux ayant eu une évolution favorable.

*Ulcération de l'épiderme en regard de la tumeur

Le caractère ulcéré de l'épiderme en regard de la néoformation tumorale a pu être apprécié pour 63 cas. Les deux cas restants correspondaient à des néoplasies dermiques profondes dont la recoupe histologique n'incluait pas l'épiderme.

L'ulcération est apparue d'intensité variable (absente à sévère) et il semble que plus celle-ci est importante plus les cas ont tendance à évoluer défavorablement (58% des cas fortement ulcérés) alors que 79% des cas évoluent favorablement lorsqu'il n'y a pas d'ulcération (tableau n°6 et figure n°2). Ces résultats ne sont toutefois pas statistiquement significatifs (test du Khi2/4 avec $t=2,52$ et $p=0,47$) à l'échelle de notre échantillon. L'ulcération ne permet donc pas de juger d'un pronostic favorable ou défavorable.

Tableau n°6 : Corrélation entre l'évolution clinique et l'intensité de l'ulcération épidermique.

Intensité de l'ulcération	Absente	Légère	Modérée	Sévère
Evolution favorable	27 cas	8 cas	3 cas	7 cas
Evolution défavorable	7 cas	4 cas	2 cas	5 cas
	Total 34 cas dont 79 % d'évolution favorable et 21 % d'évolution défavorable	Total 12 cas dont 67 % d'évolution favorable et 33 % d'évolution défavorable	Total 5 cas dont 60 % d'évolution favorable et 40 % d'évolution défavorable	Total 12 cas 58 % d'évolution favorable et 42 % d'évolution défavorable

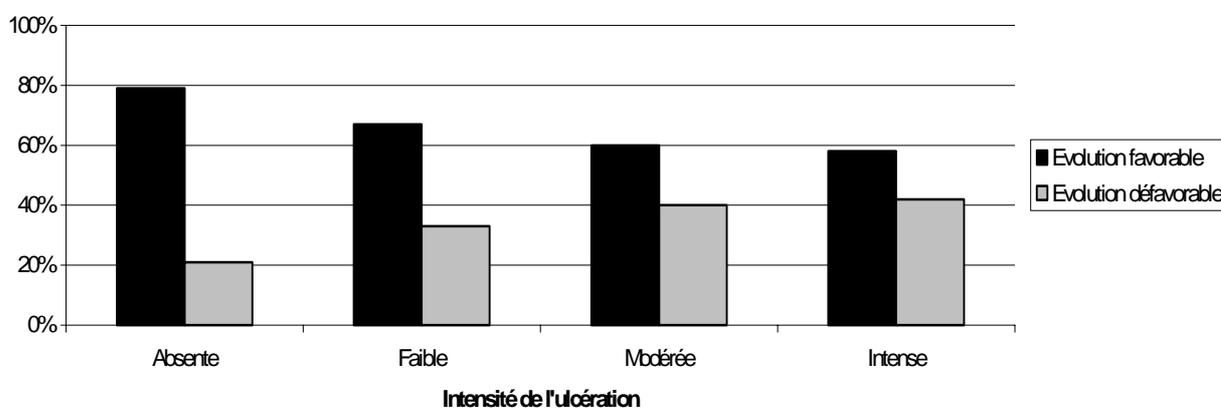


Figure n°2 : Evolution clinique en fonction de l'intensité de l'ulcération épidermique.

*Intensité de l'activité lentigineuse

L'hyperplasie mélanocytaire dans la couche basale de l'épiderme a été gradée dans les 63 cas où l'épiderme était présent sur la coupe histologique.

La majorité des lésions présentait une activité lentigineuse en regard du foyer tumoral, soit de faible intensité (27 cas), soit nulle (14 cas).

Une augmentation de cette activité lentigineuse semble associée à une évolution favorable (100% de survie sans évidence de maladie à 12 mois lorsque celle-ci est sévère) (tableau n°7), sans que la différence observée soit statistiquement significative (test du Khi2/4 avec $t=7,51$ et $p=0,0563$).

Tableau n°7 : Corrélation entre l'évolution clinique et l'intensité de l'activité lentigineuse épidermique.

Intensité de l'activité lentigineuse	Absente	Légère	Modérée	Sévère
Evolution favorable	8 cas	17 cas	8 cas	12 cas
Evolution défavorable	6 cas	10 cas	2 cas	0 cas
	Total 14 cas dont 57 % d'évolution favorable et 43 % d'évolution défavorable	Total 27 cas dont 63 % d'évolution favorable et 37 % d'évolution défavorable	Total 10 cas dont 80 % d'évolution favorable et 20 % d'évolution défavorable	Total 12 cas 100 % d'évolution favorable et 0 % d'évolution défavorable

3.2 : Critères cytologiques

*Morphologie cellulaire

La forme des cellules néoplasiques est éminemment variable. Dans une majorité des cas, l'association de plusieurs morphotypes cellulaires est observée (33 cas/65). Les lésions constituées d'un morphotype dominant correspondaient à une prolifération de cellules épithélioïdes (15 cas/65), de cellules fusiformes (13 cas/65) ou, dans une faible proportion, de cellules globoïdes (4 cas /65).

Les lésions à cellules globoïdes, fusiformes ou de cellularité mixte de notre échantillon ont une évolution clinique favorable. Les lésions composées de cellules épithélioïdes ont un pronostic moins favorable (tableau n°8).

L'analyse statistique (test du Khi2/4 avec $t=8,80$ et $p=0,03$) semble confirmer cette corrélation entre la morphologie cellulaire et le pronostic.

Tableau n°8 : Evolution des cas en fonction des types cellulaires rencontrés dans les lésions.

Type cellulaire	Evolution favorable	Evolution défavorable
Globoïde (n=4 cas)	4 cas	0 cas
Epithélioïde (n=15 cas)	7 cas	8 cas
Fusiforme (n=13 cas)	12 cas	1 cas
Mixte (n=33 cas)	23 cas	10 cas

*Caractéristiques nucléaires

Les noyaux des cellules tumorales étaient dans la plupart des cas ovoïdes et d'aspect vésiculeux (57 cas/65). La chromatine était généralement finement délitée. Un unique nucléole central, éosinophile était le plus souvent présent. Les huit derniers cas étaient caractérisés par des cellules au noyau fusiforme (3 cas) ou un mélange de cellules aux noyaux ovoïdes et fusiformes (5 cas), présentant néanmoins les mêmes caractéristiques que leur contre-partie ovoïde. Les tumeurs constituées de cellules aux noyaux soit fusiformes, soit de forme mixte semblent suivre une évolution favorable (tableau n°9). Néanmoins en raison du faible nombre de cas, il ne nous est pas possible d'établir une corrélation statistique fiable entre la forme nucléaire des cellules tumorales et le mode d'évolution (test du Khi2/3 avec $t=3,77$ et $p=0,1495$).

Tableau n°9 : Evolution des cas en fonction de la morphologie nucléaire des cellules tumorales.

Forme nucléaire	Ovoïde	Fusiforme	Mixte
Evolution favorable sur 12 mois	38 cas (67%)	3 cas (100%)	5 cas (100%)
Evolution défavorable sur 12 mois	19 cas (33%)	0 cas (0%)	0 cas (0%)

*Rapport nucléocytoplasmique et atypies cytonucléaires

Ce rapport était supérieur à 1 pour 45 cas, égal à 1 pour 17 cas et inférieur à 1 pour 3 cas. La présence d'atypies cytonucléaires (anisocytose et anisocaryose), rapportées dans les tableaux n°10 et 11, n'est pas significativement corrélée avec l'évolution des lésions (tests du Khi2/3 avec respectivement $t=1,02$ et $0,98$ et $p=0,60$ et $0,61$).

Tableau n°10 : Répartition des différents cas en fonction de l'intensité de l'anisocytose / caryose.

Intensité	Légère	Modérée	Sévère
Anisocytose	22 cas	24 cas	19 cas
Anisocaryose	35 cas	20 cas	10 cas

Tableau n° 11 : Corrélation entre l'évolution clinique et l'intensité des atypies cytonucléaires.

		Evolution favorable	Evolution défavorable
Anisocytose	Légère	66%	44%
	Modérée	75%	25%
	Sévère	80%	20%
Anisocaryose	Légère	77%	23%
	Modérée	71%	29%
	Sévère	63%	37%

La présence d'autres atypies cytonucléaires (plurinucléation, plurinucléolation, cellules géantes...) n'ont été que marginalement notées. Aucune incidence sur le pronostic ne semble liée à ces critères.

*Intensité de la pigmentation

Les variations individuelles, et au sein d'une même lésion, de la pigmentation sont très importantes. Notre échantillon n'incluait que trois cas de mélanomes achromiques (tableau n°12).

Tableau n°12 : Corrélation entre l'évolution clinique et l'intensité de la pigmentation mélanique.

Intensité de la pigmentation	Nulle	Légère	Modérée	Sévère
Evolution favorable	1 cas	18 cas	7 cas	20 cas
Evolution défavorable	2 cas	12 cas	2 cas	3 cas
	Total 3 cas dont 33% d'évolution favorable	Total 30 cas dont 60% d'évolution favorable	Total 9 cas dont 78% d'évolution favorable	Total 23 cas dont 87% d'évolution favorable

D'un point de vue pronostique, bien qu'une forte pigmentation semble à première vue associée à une meilleure évolution clinique (figure n°3), aucune corrélation statistique n'a pu être établie entre l'intensité de la pigmentation et le pronostic vital (test du Khi2/3 concernant les lésions pigmentées avec $t=4,9$ et $p=0,0843$).

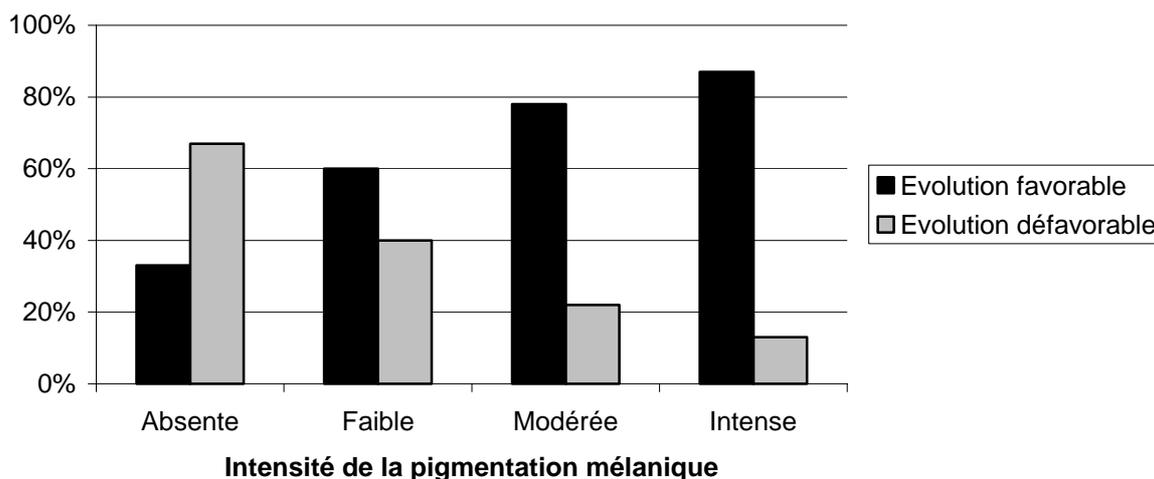


Figure n°3 : Evolution clinique en fonction de l'intensité de la pigmentation.

*Index mitotique

L'index mitotique calculé en nombre de mitoses pour 5 champs au grossissement 400 du microscope donne une moyenne de 1,98 mitoses (intervalle de 0 à 27 mitoses) pour les lésions dont l'évolution est favorable et 18,53 mitoses (intervalle de 0 à 75 mitoses) pour les lésions d'évolution défavorable, soit un index mitotique multiplié par plus de 9 par rapport aux tumeurs d'évolution favorable.

La comparaison des moyennes entre nos deux échantillons confirme la forte corrélation entre l'index mitotique et le pronostic (test non paramétrique U de Mann et Whitney avec $U=119,5$ et $p=0,000$).

*Emboles de cellules tumorales

La présence d'emboles vasculaires de cellules néoplasiques a été observée pour seulement 3 cas, qui ont tous montré une évolution défavorable avec dissémination métastatique à distance et mort de l'animal en moins de 1 an. Trois cas présentaient des images "douteuses" d'embolisation vasculaire ; deux d'entre eux ont évolué défavorablement. Il est à noter que l'absence d'images d'embolisation visibles à l'examen des coupes histologiques colorées en hémalum-éosine n'est pas un critère systématiquement associé à une bonne évolution clinique.

4 – Résultats de l'analyse immunohistochimique (annexe n°5)

4.1 : Contrôles :

Les contrôles de spécificité ont donné les résultats escomptés.

Pour l'anticorps dirigé contre l'antigène mélanocytaire Melan A, le mélanome cutané bénin pigmenté pris comme témoin positif a donné un marquage cytoplasmique granuleux rouge vif, co-localisé avec le pigment mélanique, intéressant la quasi-totalité des cellules néoplasiques.

Un marquage nucléaire rouge vif (partiel, nucléolaire ou total) des cellules épidermiques basales en cycle a permis d'apprécier la positivité intrinsèque de chaque lame traitée avec l'anticorps MIB-1.

Enfin, concernant les marquages au CD44, la positivité intrinsèque des cellules épidermiques de la couche épineuse, sous la forme d'un marquage membranaire diffus rouge vif, a servi de témoin positif. Pour les cas dont l'incidence de recoupe des prélèvements n'incluait pas d'épiderme (2 cas), la positivité intrinsèque a été appréciée sur les structures épithéliales (follicules pileux, épithélium mammaire...) présentes sur les sections examinées.

4.2 : Evaluation des marqueurs immunohistochimiques

*Choix du prétraitement pour les marquages au CD44

Des expérimentations préliminaires ont permis de tester deux méthodes de démasquage antigénique en vue de l'utilisation de l'anticorps dirigé contre l'épitope CD44 : un prétraitement avec un chauffage au micro-ondes seul dans un tampon EDTA et un prétraitement combinant une digestion protéolytique par une solution de trypsine suivie d'un chauffage au micro-ondes dans un tampon citrate.

Le second type de prétraitement n'ayant pas permis d'obtenir un marquage satisfaisant, la méthode retenue est un chauffage au micro-ondes dans un tampon EDTA à pH:8.

*Melan A

L'ensemble des cas retenus dans l'étude se sont révélés positifs au marquage avec l'anticorps dirigé contre l'épitope mélanocytaire Melan A, confirmant ainsi la nature mélanique des lésions examinées.

Le ratio cellules positives/1000 cellules tumorales a donné un pourcentage de cellules tumorales positives compris entre 6,9 et 99,7% en fonction des lésions, avec une moyenne de 61,22%. Même dans les tumeurs dépigmentées, l'expression du Melan A est conservée (14,7% de cellules tumorales positives pour les lésions achromiques).

La fraction de cellules positives au Melan A augmente avec l'intensité de la pigmentation de (tableau n°13), suggérant une meilleure conservation de l'épitope Melan A dans les cellules mélanocytaires les plus différenciées.

Tableau n°13 : Corrélation entre l'intensité de la pigmentation mélanique et le nombre de cellules tumorales positives au Melan A.

Intensité de la pigmentation	Nulle	Faible	Modérée	Sévère
Nombre de cellules Melan A positives	14.7%	53.36%	47.2%	78%

Pour les lésions d'évolution favorable, la moyenne de cellules Melan A positives est de 62,3% (7,2 à 99,7%) alors que celle des lésions d'évolution défavorable est de 58,6% (6,9 à 96,5%). La comparaison des moyennes des deux échantillons ne montre aucune différence statistiquement significative (test non paramétrique U de Mann et Whitney avec $U=473,5$ et $p=0,5986$), confirmant ainsi l'absence de corrélation entre l'intensité du marquage tumoral au Melan A et l'évolution clinique.

*CD44

Cinq lames sont restées totalement négatives après la réaction immunohistochimique (absence de marquage intrinsèque). Ces cinq cas correspondaient à des lésions du lit de l'ongle pour lesquelles l'échantillon a subi une étape de calcification préalable, cause probable de la destruction de l'épitope.

Les soixante cas restants ont été marqués : accentuation rouge vif diffuse des membranes cellulaires, d'intensité variable par rapport au marquage épidermique (ou épithélial) considéré comme référence. Dans 12 cas, le marquage a été considéré inférieur à celui de la structure épithéliale et dans 48 cas le marquage était supérieur ou égal à celui de la structure épithéliale témoin (tableau n°14 et figure n°4).

Tableau n°14 : Corrélation entre l'intensité du marquage obtenue au CD44 et l'évolution clinique sur 12 mois.

Intensité du marquage	CD44 faible	CD44 fort
Evolution favorable sur 12 mois	11 cas	33 cas
Evolution défavorable sur 12 mois	1 cas	15 cas

N=12 cas dont 92% d'évolution favorable N=48 cas dont 69% d'évolution favorable

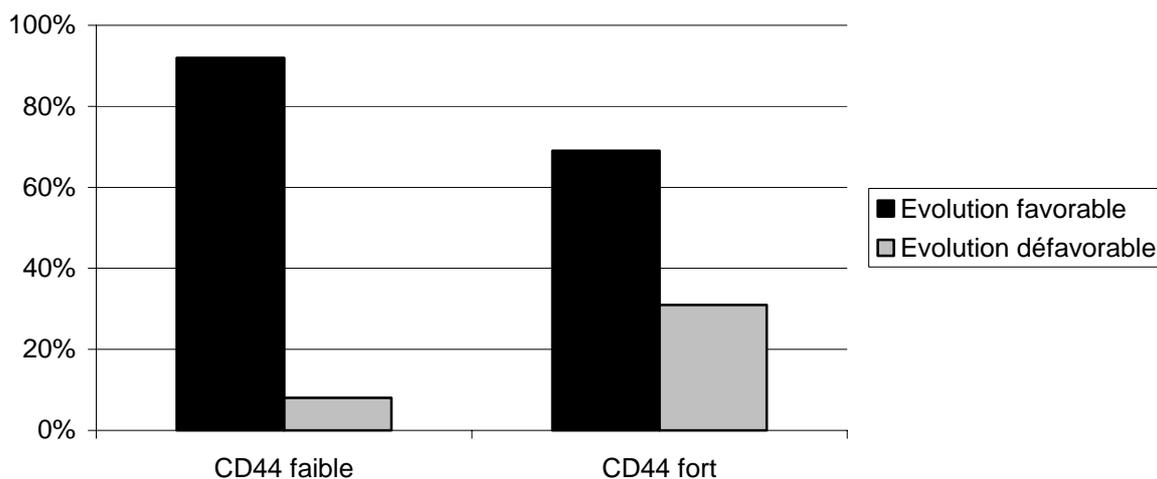


Figure n°4 : Evolution clinique en fonction de l'intensité du marquage au CD44.

Lorsque le marquage au CD44 est faible, la majorité des cas (92%) évolue de façon favorable sur 12 mois, suggérant une corrélation positive entre une faible intensité de marquage et une évolution clinique favorable (valeur prédictive négative de 91,7%). En revanche, aucune conclusion quant au pronostic des cas pour lesquels le marquage au CD44 est fort ne peut être faite sur ce seul critère (valeur prédictive positive de 31,3%).

Toutefois, les différences observées entre l'intensité du marquage et l'évolution de la lésion restent statistiquement non significatives (test du Khi2/2 avec $t=2,578$ et $p=0,104$).

Si l'on ne considère que les cas pour lesquels un suivi clinique de 24 mois était disponible (15 cas, dont 9 ont évolué de façon favorable et 6 de façon défavorable), nous obtenons les résultats présentés dans le tableau n°15.

Tableau n°15 : Corrélation entre l'intensité du marquage obtenue au CD44 et l'évolution clinique sur 24 mois.

Intensité du marquage	CD44 faible	CD44 fort
Evolution favorable sur 24 mois	4 cas	5 cas
Evolution défavorable sur 24 mois	0 cas	6 cas

Les données obtenues à partir de cet échantillon réduit semblent confirmer l'existence d'une relation entre un marquage faible et une évolution favorable : tous les cas faiblement marqués au CD44 ont bien évolué sur 24 mois. En revanche, elles n'apportent aucun élément

supplémentaire quant à une éventuelle relation entre l'évolution clinique et les marquages intenses au CD44.

*Ki-67

Les cinq cas négatifs pour l'immunomarquage CD44 sont également négatifs avec l'anticorps anti- Ki-67, ce qui tend à confirmer l'hypothèse précédemment formulée quant à la destruction d'épitopes antigéniques par le traitement décalcifiant.

L'index de prolifération des cellules tumorales (cellules Ki-67 positives) varie selon les cas de 0,8 à 56,2%.

Les lésions dont l'index Ki-67 est inférieur à 15% évoluent de façon plutôt favorable (valeur prédictive négative de 94,7%) et les lésions dont l'index est supérieur ou égal à 15% ont tendance évoluer défavorablement (valeur prédictive positive de 63,6%) (tableau n°16 et figure n°5). Les deux groupes présentent effectivement une différence statistiquement significative quant à leur évolution (test du Khi2/2, $t=24,278$ et $p=0,00$). Ces résultats corroborent ceux de l'étude de C. Laprie (Laprie, 2001).

Tableau n°16 : Corrélation entre l'index Ki-67 et l'évolution clinique sur 12 mois.

Index Ki-67 (% de cellules positives)	Ki-67 inférieur à 15%	Ki-67 supérieur ou égal à 15%
Evolution favorable sur 12 mois	36 cas	8 cas
Evolution défavorable sur 12 mois	2 cas	14 cas
	Total 38 cas dont 95% d'évolution favorable	Total 22 cas dont 64% d'évolution défavorable

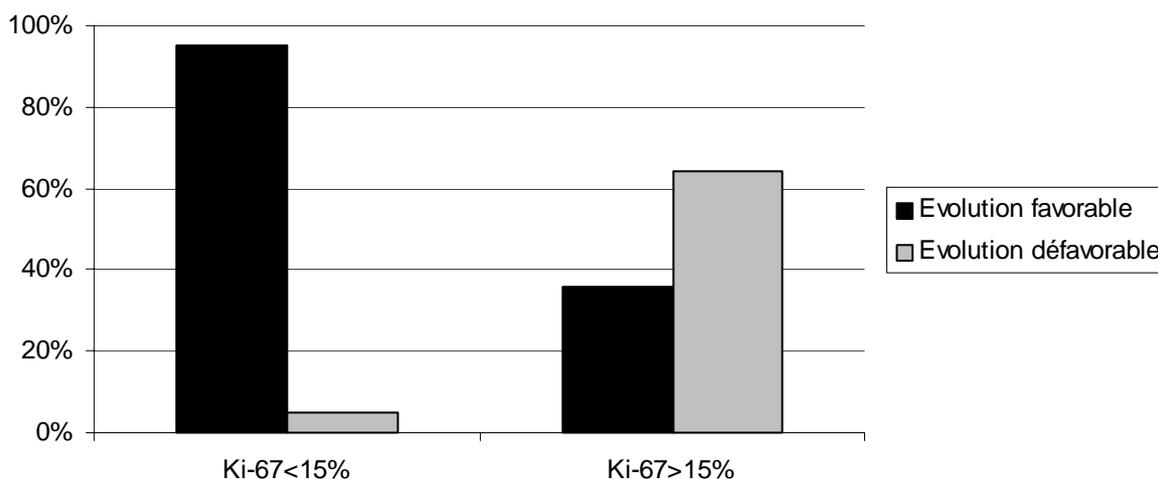


Figure n°5 : Evolution clinique en fonction de l'intensité du marquage Ki-67.

4.3 : Utilisation des critères combinés CD44 et Ki-67

Dans certains cas, un index Ki-67 inférieur à 15% conduit à donner un pronostic favorable alors que l'évolution s'avère défavorable (5% des cas de notre échantillon) ; de même, certaines lésions classées Ki-67 supérieur ou égal à 15% connaissaient néanmoins une évolution favorable (36% des cas).

La combinaison des critères intensité du marquage CD44 et index de prolifération a été évaluée dans le but d'affiner le pronostic découlant de la seule utilisation du Ki-67 (tableau n°17).

Tableau n°17 : Répartition et évolution des cas en fonction du marquage combiné CD44/Ki-67.

	Ki-67 inférieur à 15%		Ki-67 supérieur ou égal à 15%	
	CD44 faible	CD44 fort	CD44 faible	CD44 fort
Evolution favorable sur 12 mois	9 cas (100%)	27 cas (93%)	2 cas (67%)	6 cas (31%)
Evolution défavorable sur 12 mois	0 cas (0%)	2 cas (7%)	1 cas (33%)	13 cas (69%)

Parmi les 38 cas de notre échantillon pour lesquels l'index de prolifération Ki-67 est inférieur à 15%, deux ont une évolution défavorable. Dans les deux cas, le marquage au CD44 est intense. Toutefois, la règle Ki-67 < 15% et CD44 fort = pronostic défavorable n'est pas

applicable puisqu'elle amène à pronostiquer de façon erronée une évolution défavorable dans 27 cas. Il est par contre à noter qu'un marquage CD44 faible associé à un Ki-67 < 15% semble correspondre à une évolution favorable (figure n°6). L'utilisation du CD44 comme critère de confirmation de la bénignité des cas où le Ki-67 est inférieur à 15% peut être envisagée. Toutefois, compte-tenu du faible nombre de données, une étude sur un plus grand nombre de cas semble indispensable avant de tirer une conclusion définitive.

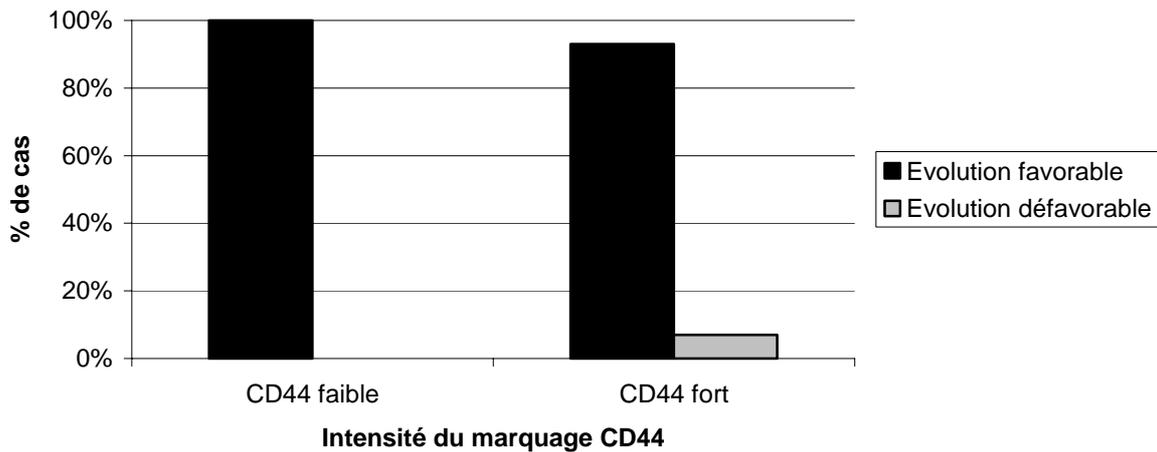


Figure n 6 : Corrélation entre le marquage au CD44 et l'évolution des cas dont l'index Ki-67 est inférieur à 15%.

Si l'on envisage   présent les 22 cas pour lesquels l'index Ki-67 est supérieur ou égal à 15%, huit d'entre eux ont malgré tout une évolution favorable. Parmi ces 22 cas, 19 présentent un marquage CD44 fort et 3 un marquage CD44 faible (figure n 7). L'utilisation du critère CD44 faible ne permet pas, pour notre échantillon, de reclasser les cas pour lesquels un faux pronostic défavorable avait été posé sur le seul critère de l'indice de prolifération au Ki-67. Un marquage CD44 fort sur les cas où l'index Ki-67 est supérieur ou égal à 15% permet toutefois d'améliorer sensiblement la sécurité du pronostic rendu.

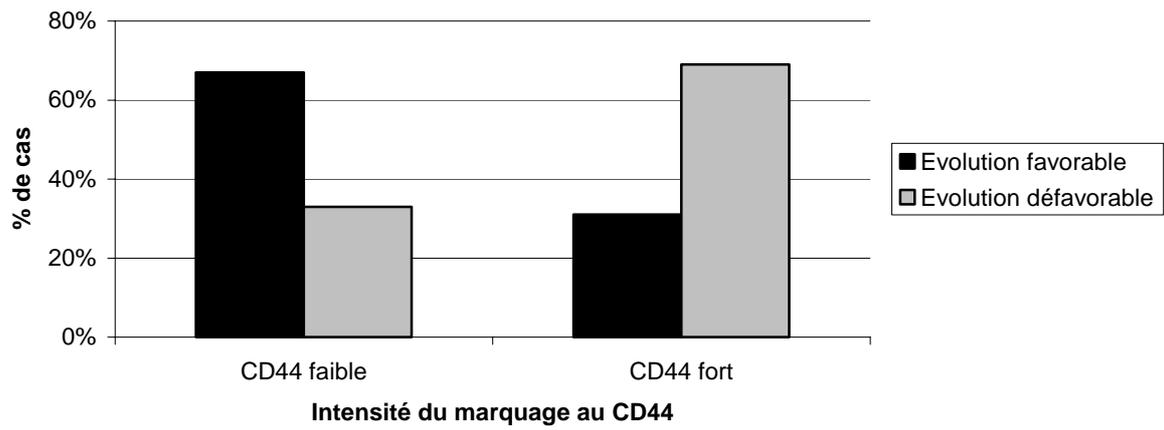


Figure n°7 : Corrélation entre le marquage au CD44 et l'évolution des cas dont l'index Ki-67 est supérieur ou égal à 15%.

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

1 - Echantillonnage

Malgré une collection importante de prélèvements (entre quinze et vingt mille cas traités chaque année), le nombre de cas retenus pour notre échantillon peut paraître « limité » surtout si on le compare à d'autres études portant sur les mélanomes canins (Bostock, 1979 ; Ramos-Vara, 2000 ; Bolon 1990). Toutefois, pour ces précédents travaux, le recrutement des cas ne se limitait pas aux seuls mélanomes cutanés (*sensus stricto*), et la faiblesse relative de notre échantillon reflète en fait deux soucis :

- la volonté de disposer pour chaque animal d'un suivi post-opératoire sur un minimum de douze mois.
- le fait de ne retenir que des cas pour lesquels le diagnostic histologique n'était pas ambigu et dont les prélèvements étaient parfaitement exploitables d'un point de vue technique.

2 - Durée du suivi post opératoire

Ce suivi correspond à une période de 12 mois minimum pour l'ensemble des cas. Ces données ont été collectées au travers d'une enquête postale, le formulaire étant adressé aux vétérinaires praticiens. La relative compliance de nos confrères associée parfois à une forte imprécision dans les réponses fournies au travers de ce questionnaire nous ont amenés à ne conserver qu'un pourcentage limité (environ 50%) des cas extraits des collections.

Notre volonté était originellement de collecter des cas suivis sur une période plus longue (au moins 24 mois). Mais la durée exploitée ici a résulté de la conjonction de deux facteurs :

- les cas les plus récents inclus dans l'étude ne permettaient pas d'avoir un recul plus important sur l'évolution (cas collectés en 2000, étude réalisée en 2001),
- la volonté d'homogénéiser les données entre tous les cas afin de donner un sens équivalent pour tous les résultats en termes de prédiction d'évolution.

Néanmoins, les études publiées font état dans la plupart des cas d'évolution défavorable de récidives tumorales ou de décès secondaires à une dissémination métastatique dès la première année suivant l'exérèse chirurgicale (Bostock, 1979 ; Laprie, 2001). Aussi un suivi sur 12 mois, même si il n'est pas indiscutable, n'est pas non plus totalement aberrant.

3 - Aspects épidémiocliniques

Le mélanome cutané canin est une lésion principalement observée chez l'animal adulte âgé, typiquement décrit entre 7 et 14 ans (Conroy, 1967 ; Roels, 1999). Certaines lésions peuvent survenir chez des animaux beaucoup plus jeunes dès 1,5 ans (Bolon, 1990). Les cas issus de notre échantillon s'inscrivent dans ces caractéristiques puisque la moyenne d'âge des animaux affectés est de 9 ans et 1 mois avec un cas touchant un animal de 5 ans.

Concernant une éventuelle prédisposition raciale, aucune conclusion nette ne transparaît des données disponibles. Toutefois, certaines races sont décrites comme plus communément touchées : Scottish terriers, Boston terriers, Airedale...(Pulley, 1990 ; Roels, 1999). Il s'agit à chaque fois d'études issues de pays Anglo-Saxons et cette apparente prédisposition tout comme celle des races Epagneuls, Boxers et Briards dans notre étude ne reflète certainement que la démographie raciale canine dans les pays où ont été réalisées les études. Toutefois et contrairement à l'espèce humaine, les mélanomes cutanés semblent affecter des animaux dont la robe est pigmentée, suggérant ainsi l'absence de facteur externe, de type radiations solaires en particulier, dans l'étiopathogénie de ces lésions.

Par ailleurs le ratio mâles/femelles de notre échantillon, qui pourrait suggérer une très légère prédisposition chez les mâles, corrobore les données déjà disponibles (Conroy, 1967 ; Roels, 1999)

4 - Nature et distribution anatomique des lésions

Certains types lésionnels, pourtant décrits en médecine vétérinaire, étaient absents de notre échantillon. Ainsi aucune lésion de type « hyperplasie mélanocytaire » épidermique au sens lentigo n'a été observée. L'absence de ces lésions peut s'expliquer tout d'abord par leur rareté ; en médecine vétérinaire, selon les études disponibles, seul un très faible nombre de lésions mélanocytaires entre dans cette catégorie. Toutefois, il est légitime de s'interroger sur la réalité de cette faible incidence : en effet, la surveillance de toute lésion cutanée pigmentée n'est pas aisée pour le propriétaire de chien en raison de la présence du pelage. Ces difficultés d'observation conditionnent sans aucun doute le faible nombre de lésions de notre échantillon qui ne correspondent pas à des masses, soit palpables, soit ulcérées. Ces éléments doivent être intégrés et doivent nuancer les études épidémiologiques portant sur les lésions mélaniques cutanées : plutôt que de parler d'incidence de tel ou tel type de lésions mieux vaudra parler d'incidence relative des lésions détectées.

La distribution anatomique des lésions dans notre échantillon (doigt et le lit de l'ongle 20%, face 34%) correspond aux sites décrits comme les plus fréquemment atteints ; de même, la tendance à mal évoluer des lésions des extrémités digitées et de celles localisées à la babine (respectivement 62 et 50% d'évolution défavorable dans notre échantillon) est un caractère bien établi par différentes études (Bostock, 1979 ; Pulley, 1990 ; Gross, 1992 ; Laprie, 2001). Enfin, et en accord avec les études publiées (Bostock, 1979 ; Pulley, 1990 ; Conroy, 1967 ; Laprie, 2001), notre échantillon indique qu'une large majorité des cas de mélanomes cutanés (deux tiers des cas) ont une évolution favorable.

5 - Techniques immunohistochimiques

Les techniques immunohistochimiques utilisées sont des techniques appliquées de façon standard dans notre laboratoire. Elles nous ont permis d'obtenir des marquages spécifiques et de bonne qualité.

Les procédés de démasquage antigénique utilisés (Balaton, 1993 ; McNicol, 1998) nous ont permis de nous affranchir de l'absence d'homogénéité dans les durées de fixation des prélèvements en restaurant en grande partie l'immunogénicité des épitopes (McNicol 1998).

En médecine vétérinaire, les techniques de décalcification des échantillons font toutes appel à des produits à base d'acide formique ou d'acide acétique. Nous avons constaté l'absence totale de marquage par le Ki-67 et le CD44 d'une grande partie des échantillons ayant été soumis au processus de décalcification, alors que le marquage par le Melan A restait correct. Un tel phénomène n'a rien d'inattendu dans la mesure où un effet délétère irréversible des acides faibles sur les épitopes antigéniques est déjà connu (McNicol, 1998).

Le choix de l'amino-éthyl-carbazole (AEC) comme révélateur (dépôt rouge en fin de réaction) nous a permis de nous affranchir d'une étape de blanchiment préalable des lames avant immunohistochimie ; le marquage rouge obtenu est généralement facilement distinguable des granules de mélanine cytoplasmiques. Les différentes méthodes de blanchiment décrites font appel à des traitements chimiques drastiques (en général permanganate de potassium et/ou acide oxalique, eau oxygénée H₂O₂ 10%) (Li, 1999), potentiellement dommageables pour la morphologie tissulaire et les épitopes antigéniques cibles.

6 - Critères histo- pronostiques

La recherche de critères architecturaux ou cytologiques est l'approche classique pour l'anatomo-pathologiste qui veut indiquer le pronostic d'une tumeur. Dans le domaine des mélanomes, il semble que l'utilisation de critères classiques (mitoses, anisocytose, anisocaryose, infiltration...) apportent des résultats peu fiables. Par ailleurs, à notre connaissance, aucune étude systématique des paramètres cytologiques et architecturaux pouvant être utilisés dans l'établissement d'un pronostic pour les mélanomes cutanés n'est disponible en médecine vétérinaire. Notre étude a tenté d'intégrer et d'évaluer les critères classiquement utilisés en médecine humaine pour l'évaluation des lésions mélaniques, mais également d'autres critères a priori pertinents.

Chaque paramètre a été gradé (quand cela était possible) et afin d'éviter une dérive lecture, les lames ont été examinées en aveugle et des standards de grading ont été établis (lame servant de contrôle). Enfin, certains cas ont fait l'objet d'une relecture en aveugle afin de vérifier la reproductibilité des résultats.

Parmi les 16 critères étudiés, seuls quelques-uns semblent pouvoir être utilisés comme facteurs pronostiques et représentent à notre sens des critères majeurs dans l'analyse histologique d'une lésion : taille, symétrie et mode de croissance de la lésion, index mitotique et présence/absence d'embolies tumorales vasculaires.

Plusieurs autres critères nous semblent importants à prendre en compte également mais ne peuvent être à l'heure actuelle considérés que comme mineurs en raison de leur corrélation apparente avec l'évolution clinique (tests statistiques significatifs) mais pour lesquels la taille de notre échantillon n'est pas suffisante pour affirmer ou infirmer définitivement leur importance (effectifs théoriques calculés parfois inférieurs à 5). Il s'agit de la forme de la lésion, de la profondeur de l'infiltration tumorale dans le revêtement cutané et de la morphologie cellulaire dominante dans la tumeur.

Enfin, certains critères architecturaux ou cytologiques n'apportent que des données descriptives qui permettent de classer les lésions, ce qui est la plupart du temps intellectuellement satisfaisant pour le pathologiste mais non statistiquement corrélés à leur évolution (intensité de l'ulcération épidermique, activité lentigineuse basale, degré de pigmentation...).

Au plan pronostique, les critères majeurs ou mineurs qui ressortent de notre échantillon, correspondent à certains des critères utilisés en médecine humaine. Toutefois, le poids relatif et la nature de ces critères ne sont pas parfaitement superposables dans les deux espèces.

La classification de l'OMS (Sydney 1972), en médecine humaine définit en effet cinq critères pronostiques majeurs (type histogénétique, profondeur d'invasion, épaisseur maximum, ulcération, activité mitotique) et sept critères mineurs (profil tumoral, type cellulaire, pigmentation, stroma-réaction inflammatoire, aspects régressifs, emboles, angiogenèse). Des discordances portant sur des critères majeurs (dans l'une ou l'autre des espèces) méritent que l'on s'y arrête.

Le type histogénétique (nom du type tumoral dans la classification de l'OMS) apparaît chez le chien comme un critère difficile à utiliser tant la façon de décrire et classer les lésions est variable dans cette espèce. Par ailleurs, compte-tenu du stade souvent avancé d'évolution de la lésion au moment du diagnostic, une classification telle qu'utilisée en médecine humaine paraît difficile à appliquer.

L'invasion tumorale (profondeur) semble quant à elle un critère extrêmement pertinent pour l'histopronostic dans l'espèce canine. Les niveaux (I à V) de Clark et Mihm en médecine humaine permettent de définir le caractère invasif de la lésion. Toutefois, les cas de notre échantillon correspondent tous à des niveaux au moins égaux à III selon cette classification c'est-à-dire une lésion cantonnée au derme superficiel avec comblement total de celui-ci par la population néoplasique. Les lésions de niveaux IV (comblement du derme superficiel et profond) voire V (infiltration de la graisse hypodermique) ont presque tous dans notre échantillon montré une évolution défavorable alors que les lésions de niveaux III avaient majoritairement une évolution favorable. Là encore, l'absence de lésions de niveau I et II peut sans doute s'expliquer par le caractère tardif de la détection clinique.

L'épaisseur de la lésion, même si son appréciation n'a pu être que grossière dans notre étude semble être directement liée au pronostic (évolution et taille de la lésion étant positivement corrélées), tout comme l'épaisseur de Breslow ou épaisseur maximum de la tumeur est un critère histopronostique majeur en médecine humaine (Bailly et Prade, 1990 ; Byers, 1998).

De même, l'ulcération superficielle est un critère majeur de la classification humaine (Mac Govern, 1982), alors que dans l'espèce canine ce critère ne semble pas lié au pronostic. Là

encore, le caractère tardif du diagnostic peut toutefois biaiser l'appréciation du poids de ce critère : en effet l'ulcération des lésions peut être chez le chien davantage la conséquence d'une abrasion cutanée par grattage ou léchage que d'un processus purement lié à la croissance tumorale (problème de vascularisation) ; dans notre échantillon, les lésions fortement ulcérées ont toutefois tendance à évoluer défavorablement.

La morphologie cellulaire dominante dans la lésion semble également influencer le pronostic : les lésions à dominante fusiforme, globoïde ou mixte ont tendance à évoluer favorablement à l'instar des lésions composées de cellules épithélioïdes. En médecine humaine, il est également rapporté que les lésions fusocellulaires et mixtes sont un pronostic plus favorable que les lésions globocellulaires (Bailly et Prade, 1990). Toutefois, nous ne pouvons établir de parallèle entre l'homme et le chien pour les lésions composées de cellules épithélioïdes puisque cette dénomination ne semble pas répertoriée dans la classification des morphologies cellulaires rencontrées en médecine humaine.

L'index mitotique et la présence d'emboles vasculaires néoplasiques représentent des critères pronostique importants dans les deux espèces (grading de Mac Govern en médecine humaine et grading de Bostock en médecine vétérinaire).

En revanche, il ressort de l'analyse de notre échantillon que la symétrie des lésions semble être un bon facteur pronostique dans l'espèce canine. En médecine humaine, si ce critère est systématiquement noté, aucune influence quant au pronostic ne semble lui être associée et une étude à plus grande échelle nous semble nécessaire pour confirmer la pertinence de ce critère, pourtant facile à évaluer chez le chien. De même, une forte corrélation entre le mode de croissance et l'évolution permet d'intégrer ce critère architectural au nombre de nos critères pronostiques majeurs.

Enfin, les atypies cytologiques, ainsi que l'intensité de la stroma réaction inflammatoire, chez le chien ne ressortent pas de notre étude comme des critères influençant le pronostic. Des lésions pour lesquelles les cellules sont faiblement atypiques peuvent avoir un pronostic défavorable alors que des lésions à fortes atypies cytonucléaires peuvent bien évoluer après exérèse. De telles constatations corroborent les résultats d'études pour lesquelles des lésions classées comme bénignes à l'histologie avaient un comportement défavorable (Bostock, 1979 ; Laprie, 2001).

L'intensité de la pigmentation globale de la tumeur, dont on pourrait penser qu'elle est directement liée au degré de différenciation des cellules mélanocytaires, ne représente pas un élément clé dans l'appréciation de l'évolution ultérieure de celle-ci, tout comme l'intensité de l'hyperplasie lentigineuse basale. Il paraît toutefois important d'explorer ces aspects sur un nombre plus important de cas afin d'affirmer ou non leur intérêt dans l'établissement du pronostic.

7 - Immunomarquages et pronostic

Trois marqueurs ont été évalués comme facteurs pronostiques pour les mélanomes du chien. Le choix de ces facteurs repose sur l'existence dans l'espèce canine ou dans l'espèce humaine de données pouvant laisser présumer ou ayant déjà établi la valeur pronostique de ces marqueurs.

L'antigène Melan A ou MART-1 (melanoma antigen recognized by T cells 1 (Chen, 1996)) est un marqueur apparemment spécifique des cellules mélanocytaires dans l'espèce humaine (Orosz, 1999 ; Berset, 2001) ainsi que dans les espèces canine (Ramos-Vara, 2000) et féline (Ramos-Vara, 2002). Chez l'homme, ce marqueur pourrait permettre d'affiner le pronostic de patients atteints de mélanomes malins (Berset, 2001). Des expériences menées sur des lignées cellulaires issues de mélanomes canins pouvaient laisser présager que le marquage Melan A pourrait apporter des informations sur le comportement biologique de ces tumeurs : en effet, les cellules issues de tumeurs malignes sont peu ou faiblement marquées par le Melan A alors que les cellules issues de tumeurs bénignes révèlent un marquage modéré à marqué (Koenig, 2001). Cependant, notre étude n'a pu mettre en évidence de corrélation entre l'évolution tumorale (pronostic) et l'intensité du marquage Melan A. Cette absence apparente de corrélation doit toutefois à notre sens être ré-évaluée à une plus large échelle.

Notre étude confirme par ailleurs l'intérêt du Melan A comme marqueur des cellules mélanocytaires cutanées du chien. En effet, l'ensemble des tumeurs analysées ici a montré une positivité au Melan A, ce qui suggère ainsi une forte conservation de cet épitope même dans les tumeurs les moins différenciées voire amélaniques.

Des études menées chez l'homme (73 mélanomes cutanés) (Orosz, 1999) et le chien (cellules tumorales en explant primaire) (Koenig, 2001) ont permis de comparer la sensibilité et la spécificité du Melan A et de la protéine S-100 qui était jusqu'alors le marqueur de choix pour les tumeurs mélaniques, comme en médecine vétérinaire (Sandusky, 1985 ; Sandusky, 1987).

Il apparaît que dans les deux espèces que ces marqueurs montrent une sensibilité équivalente mais que le Melan A s'avère plus spécifique que la protéine S-100, qui est elle exprimée par l'ensemble des sous populations cellulaires issues des crêtes neurales.

Une étude (Ramos-Vara, 2000) portant sur des mélanomes de la cavité buccale du chien confirme pour ce type de lésions la bonne fiabilité de ce marqueur diagnostique.

L'utilité des antigènes de prolifération cellulaire (Ki-67 et PCNA) dans le pronostic des lésions mélaniques cutanées a largement été démontrée en médecine humaine (Korabiowska, 1995 ; Vogt, 1997 ; Cochran, 1997 ; Niezabitowski, 1999). Dans le domaine de la médecine vétérinaire, des données sont également disponibles (Roels, 1999 ; Laprie, 2001).

Concernant l'antigène PCNA, la comparaison entre différentes études menées chez l'homme et chez le chien aboutit à des données contradictoires : d'une part, l'intensité de l'expression de cet antigène permettrait d'affiner le pronostic des mélanomes malins chez l'homme (Niezabitowski, 1999) ; alors que chez le chien aucune corrélation positive n'est admise entre l'intensité du marquage obtenu et l'évolution clinique des lésions (Roels, 1999).

En revanche, l'expression du Ki-67 dans des lésions mélanocytaires tumorales donne des résultats assez similaires chez l'homme et chez le chien. En médecine humaine, ce marqueur permettrait de distinguer les nævi des mélanomes vrais (Korabiowska, 1995) ainsi que d'établir un diagnostic différentiel entre des nævi dysplasiques congénitaux ou acquis et des lésions naevocellulaires plus problématiques car possédant un risque métastatique (Kanter, 1995), voire de reconnaître à l'histologie la phase de croissance verticale des mélanomes cutanés malins (Kaleem, 2000). En marge de cet aspect diagnostique, l'expression du Ki-67 serait corrélée positivement à un risque métastatique accru ainsi qu'à une survie réduite lors de lésions exprimant fortement ce marqueur (Vogt, 1997 ; Niezabitowski, 1999).

En médecine vétérinaire, des résultats obtenus précédemment dans le laboratoire (Laprie, 2001) avaient souligné l'utilité potentielle de ce marqueur dans l'établissement du pronostic des mélanomes cutanés canins. En effet, l'utilisation du seuil de 15% de cellules Ki-67 positives permettait d'obtenir sur l'échantillon utilisé (68 cas) une valeur prédictive positive du pronostic supérieure à celle de l'analyse histologique seule (97% contre 91%). Les données obtenues sur notre échantillon ainsi qu'une récente étude réalisée en Belgique (Roels, 1999), confirment l'intérêt de l'utilisation de ce critère.

Il persiste toutefois dans notre échantillon, comme dans celui de l'étude de C. Laprie, un pourcentage non négligeable de cas pour lesquels l'index Ki-67 est supérieur ou égal à 15% et

qui pourtant connaissent une évolution favorable (36% des cas), ainsi qu'un très faible nombre de cas classés Ki-67 inférieur à 15% et qui suivent une évolution défavorable (5% des cas).

Ces observations, indiquent les limites de l'utilisation du Ki-67 et justifient pleinement la recherche d'autres critères qui seuls ou en complément à l'utilisation du Ki-67 viendraient sécuriser le pronostic.

Le CD44 (cluster of differentiation 44) est une molécule d'adhésion exprimée à la surface de nombreux types cellulaires, en particulier des lymphocytes, soit sous une forme standard, soit sous la forme d'au moins 10 isoformes résultant d'un épissage alternatif différentiel. Son ligand principal est l'acide hyaluronique, composant essentiel des matrices extracellulaires et support majeur de son rôle d'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (Lesley 1993 ; Lesley, 2000).

Cette molécule aux multiples rôles semble jouer un rôle majeur dans la capacité des cellules à migrer lors de divers processus physiologiques : homing des cellules lymphocytaires (Koopman, 1993 ; Lesley, 1993 ; Pals, 1993 ; Nandi, 2000), migration des cellules embryonnaires lors de l'embryogenèse (Goodison, 1999). Une surexpression de CD44 a ainsi été caractérisée dans diverses tumeurs chez l'homme (cancer du sein, du poumon, du tractus gastro-intestinal, de l'utérus... (Goodison, 1998)). Ces études ont rapidement amené les anatomopathologistes humains à envisager l'utilisation du CD44 comme facteur pronostique en pathologie tumorale (Aziz, 2000 ; Herrlich, 1993).

Dans le domaine des mélanomes, l'étude in vitro de cellules en lignées issues de mélanomes humains a montré des altérations majeures dans l'expression de facteurs impliqués dans l'adhésion intercellulaire et l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. (Meier, 1998). C'est donc assez naturellement que des études ont été entreprises, visant à étudier le rôle potentiel du système CD44 dans la migration et les capacités métastatiques des cellules tumorales mélaniques. Ainsi différents travaux ont permis la mise à jour d'une corrélation entre la surexpression du CD44 (principalement des isoformes v7/8 et v10) et l'aptitude métastatique des mélanocytes tumoraux (Simon, 1996 ; Korabiowska, 1995). Une étude ayant comparé l'intensité de l'expression du CD44 par les cellules tumorales mélaniques à celle de l'épiderme (92 cas de mélanomes cutanés primaires chez l'homme (Dietrich, 1997) a conclu à une excellente corrélation entre une forte expression du CD44 (c'est-à-dire supérieure à celle de l'épiderme) par les cellules mélaniques tumorales et un risque métastatique accru. Toutefois, l'expression de cette molécule ne semble avoir qu'un rôle facilitateur dans le

processus métastatique en permettant la migration des cellules néoplasiques dans la matrice extracellulaire (Si, 1994).

En médecine vétérinaire, peu d'observations étaient disponibles quant au CD44 ; cette absence de données étant sans aucun doute liée à la diffusion confidentielle des anticorps dirigés contre cet épitope dans les espèces animales autres que les rongeurs. Toutefois, la seule étude disponible concernant l'espèce canine mentionnait un possible rôle du CD44 dans l'expression du pouvoir métastatique des tumeurs canines (Alldinger, 1999).

La caractérisation de la réaction interspécifique (porcin–canin) dans le cadre de ce travail nous a permis d'entreprendre une étude similaire à celle de Dietrich chez l'homme (Dietrich, 1997). Les critères de gradation choisis (comparaison de l'expression du CD44 des cellules tumorales avec celles de cellules épineuses de l'épiderme) sont directement inspirés de cette étude. Les données obtenues à partir de notre échantillon ne permettent toutefois pas d'aboutir à l'existence d'une corrélation entre l'expression du CD44 et le pronostic. Néanmoins, une faible expression du CD44 dans les mélanomes cutanés du chien pourrait être associée à une évolution clinique post-opératoire favorable.

Il nous paraît par ailleurs important de souligner que l'outil immunohistochimique n'est certainement pas l'outil de choix pour quantifier l'expression d'une molécule qui est déjà exprimée à l'état normal par les mélanocytes. Une approche moléculaire, soit à l'échelle ARNm (PCR quantitative), soit à l'échelle protéique (Western Blot) pourrait être plus adaptée. En tout état de cause, l'utilisation du seul critère CD44 ne permet pas d'apporter des résultats comparables à ceux du Ki-67.

La combinaison des deux marqueurs semble plus intéressante puisqu'elle permet d'affirmer avec une très faible marge d'erreur un pronostic favorable dans les cas où l'index Ki-67 est inférieur à 15% et le CD44 faiblement exprimé. De façon similaire, en cas d'index Ki-67 supérieur ou égal à 15% et de marquage CD44 fort, un pronostic défavorable pourra être rendu avec une marge d'erreur moindre qu'avec l'utilisation du seul Ki-67.

Des études complémentaires portant sur un plus grand nombre de cas sont évidemment nécessaires avant de tirer des conclusions définitives

CONCLUSION

Cette étude, qui ne peut être considérée que comme préliminaire en raison de la taille restreinte de l'échantillon considéré, apporte quelques éléments simples mais intéressants dans un domaine jusque là très touffu.

Elle suggère notamment que d'un point de vue pronostique une classification simple mélanocytome / mélanome (bénin/malin) devrait être employée pour classer les lésions dans l'espèce canine en partant du principe que les mélanocytomes sont bénins et les mélanomes malins. Celle-ci pourrait s'appuyer sur des critères majeurs et mineurs déterminés à l'analyse histologique et qui devraient figurer sur le compte-rendu d'analyse :

*Critères majeurs : taille, symétrie, mode de croissance, index mitotique et présence/absence d'embolies vasculaires tumoraux.

*Critères mineurs : forme de la lésion, profondeur de l'infiltration tumorale dans le revêtement cutané et morphologie cellulaire.

L'ensemble des sous-types envisageables au sein de cette dichotomie ne servirait alors qu'à la description purement histologique de lésions particulières, comme par exemple les mélanomes / mélanocytomes à cellules ballonisantes, les mélanomes / mélanocytomes avec métaplasie chondroïde du stroma...

Dans le domaine des immunomarquages, cette étude met en valeur l'intérêt de l'anticorps Melan A dans le diagnostic des tumeurs du système mélanogène, et en particulier pour les lésions totalement dépigmentées ou achromiques puisque cet épitope semble très bien conservé en l'absence de différenciation mélanocytaire évidente.

De même, nous confirmons l'intérêt de l'utilisation immunohistochimique du Ki-67 comme facteur pronostic et suggérons l'utilisation possible du CD44 comme marqueur permettant d'affiner le pronostic. Un arbre décisionnel peut *a priori* être proposé pour l'utilisation combinée de ces deux marqueurs bien que ces observations méritent d'être évaluées à la lumière d'un nombre plus important de cas avant de tirer une conclusion définitive quant à leur pertinence.

Au-delà de l'histologie et de l'immunohistochimie, l'examen anatomo-pathologique vétérinaire pourrait être à l'avenir associé à des outils de détection moléculaire qui permettraient l'établissement de pronostics plus fiables. En médecine humaine, la recherche

de gènes candidats associés à l'évolution clinique des mélanomes a déjà fait l'objet de publications prometteuses (Bittner, 2000).

BIBLIOGRAPHIE

- *ABADIE, J.J., AMARDEILH, M.A. and DELVERDIER, M.E.
Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs.
J Am Vet Med Assoc, 1999, **215** (11), 1629-1634.
- *ALLDINGER, S., BAUMGARTNER, W., KREMMER, E. and FONFARA, S.
Characterization of a canine CD44 specific monoclonal antibody.
J Vet Med, 1999, **46** (1), 19-32.
- *AZIZ, K.A., TILL, K.J., ZUZEL, M. and CAWLEY, J.C.
Involvement of CD44-hyaluronan interaction in malignant cell homing and fibronectin synthesis in hairy cell leukaemia.
Blood, 2000, **96** (9), 3161-3167.
- *BALATON, A.J., OCHANDO, F. and PAINCHAUD, M.H.
Use of microwaves for enhancing or restoring antigens before immunohistochemical staining.
Ann Pathol, 1993, **13** (3), 188-189.
- *BALATON, A.J.
Application of microwaves in immunohistochemical techniques.
Ann Pathol, 1993, **13** (3), 145-150.
- *BALLY, C. and PRADE, M.
Mélanomes malins cutanés et tumeurs mélaniques ambiguës.
Enseignement post-universitaire, Académie internationale de pathologie, Division Française, 1990-1991.
- *BERSET, M., CEROTTINI, J.P., GUGGISBERG, D., ROMERO, P., BURRI, F., RIMOLDI, D. and PANIZZON, R.G.
Expression of Melan A/MART-1 antigen as a prognostic factor in primary cutaneous melanoma.
Int J Cancer, 2001, **95** (1), 73-77.
- *BITTNER, M., MELTZER, P., CHEN, Y., JIANG, Y., SEFTOR, E., HENDRIX, M., RADMACHER, M., SIMON, R., YAKHINI, Z., BEN-DOR, A., SAMPAS, N., DOUGHERTY, E., WANG, E. and *al.*
Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling.
Nature, 2000, **406** (6795), 536-540.
- *BOLON, B., CALDERWOOD MAYS, M.B. and HALL, B.J.
Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior.
Vet Pathol, 1990, **27** (2), 96-102.
- *BOSTOCK, D.E.
Prognosis after surgical excision of canine melanomas.
Vet Pathol, 1979, **16** (1), 32-40.

- *BYERS, H.R. and BHAWAN, J.
Pathologic parameters in the diagnosis and prognosis of primary cutaneous melanoma.
Hematol Oncol Clin North Am, 1998, **12**(4), 717-735.
- *CHEN, Y.T., STOCKERT, E., JUNGBLUTH, A., TSANG, S., COPLAN, K.A., SCANLAN, M.J. and OLD, L.J.
Serological analysis of Melan A (MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas.
Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93** (12), 5915-5919.
- *COCHRAN, A.J.
Prediction of outcome for patients with cutaneous melanoma.
Pigment Cell Res, 1997, **10** (3), 162-167.
- *CONROY, J.D.
Melanocytic tumors of domestic animals with special reference to dogs.
Arch Dermatol, 1967, **96** (4), 372-380.
- *DIETRICH, A., TANCZOS, E., VANSCHIEDT, W., SCHOPF, E. and SIMON, J.C.
High CD44 surface expression on primary tumours of malignant melanoma correlates with increased metastatic risk and reduced survival.
Eur J cancer, 1997, **33** (6), 926-930.
- *EDWARD, M.
Integrins and other adhesion molecules involved in melanocytic tumor progression.
Current Opin Oncol, 1995, **7** (2), 185-191.
- *FALINI, B., FLENGHI, L., FAGIOLI, M., STEIN, H., SCHWARTING, R., RICCARDI, C., MANOCCHIO, I., PILERI, S., PELICCI, P.G. and LANFRANCONE, L.
Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody.
J Histochem Cytochem, 1989, **37** (10), 1471-1478.
- *GOODISON, S., URQUIDI, V. and TARIN, D.
CD44 cell adhesion molecules.
Mol Pathol, 1999, **52** (4), 189-196.
- *GOODISON, S. and TARIN, D.
Clinical implications of anomalous CD44 gene expression in neoplasia.
Front Biosci, 1998, **3**, E89-109.
- *GROSS, T.L., IHRKE, P.J. and WALDER, E.J.
Melanocytic tumors.
In GROSS, T.L., IHRKE, P.J. and WALDER, E.J.
Veterinary Dermatopathology : a macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease.
Saint-Louis, Mosby Year Book, 1992, 451-464.

- *HERRLICH, P., ZOLLER, M., PALS, S.T. and PONTA, H.
CD44 splice variants : metastases meet lymphocytes.
Immunol Today, 1993, **14** (8), 395-399.
- *KALEEM, Z., LIND, A.C., HUMPHREY, P.A., SUEPER, R.H., SWANSON, P.E., RITTER, J.H. and WICK, M.R.
Concurrent Ki-67 and p53 immunolabeling in cutaneous melanocytic neoplasms : an adjunct for recognition of the vertical growth phase in malignant melanomas ?
Mod Pathol, 2000, **13** (3), 217-222.
- *KANTER, L., BLEGEN, H., WEJDE, J., LAGERLOF, B. and LARSSON, O.
Utility of a proliferation marker in distinguishing between benign naevocellular naevi and naevocellular naevus-like lesions with malignant properties.
Melanoma Res, 1995, **5** (5), 345-350.
- *KOENIG, A., WOJCIESZYN, J., WEEKS, B.R. and MODIANO, J.F.
Expression of S100a, vimentin, NSE, and Melan A/MART-1 in seven canine melanoma cell lines and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma.
Vet Pathol, 2001, **38** (4), 427-435.
- *KOOPMAN, G., GRIFFIOEN, A.W., PONTA, H., HERRLICH, P., VAN DEN BERG, F., MANTEN-HORST, E. and PALS, S.T.
CD44 splice variants : expression on lymphocytes and in neoplasia.
Res Immunol, 1993, **144** (9), 750-754.
- *KORABIOWSKA, M., BRINCK, U., MIRECKA, J., KELLNER, S., MARX, D. and SCHAUER, A.
Antigen Ki-67 and c-myc oncogene as related to histoclinical parameters in pigmented skin lesions.
In vivo, 1995, **9** (5), 433-438.
- *KORABIOWSKA, M., BRINCK, U., HONIG, J., MORA, O., BARTKOWSKI, S. and SCHAUER, A.
CD44 : a marker of metastases of head and neck melanomas.
In vivo, 1995, **9** (3), 253-256.
- *LAPRIE, C., ABADIE, J., AMARDEILH, M.F., LE NET, J.L., LAGADIC, M. and DELVERDIER, M.
MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma.
Vet Dermatol, 2001, **12** (3), 139-147.
- *LESLEY, J., HYMAN, R. and KINCADE, P.W.
CD44 and its interaction with extracellular matrix.
Adv Immunol, 1993, **54**, 271-335.
- *LESLEY, J., HASCALL, V.C., TAMMI, M. and HYMAN, R.
Hyaluronan binding by cell surface CD44.
J Biol Chem, 2000, **275** (35), 26967-26975.

- *LI, L.X.L., CROTTY, K.A., KRIL, J.J., PALMER, A.A., and McCARTHY, S.W.
Method of melanin bleaching in MIB1-Ki67 immunostaining of pigmented lesions : a quantitative evaluation in malignant melanomas.
Histochem J, 1999, **31** (4), 237-240.
- *McGOVERN, V.J., SHAW, H.M., MILTON, G.W. and McCARTHY, W.H.
Ulceration and prognosis in cutaneous malignant melanoma.
Histopathology, 1982, **6** (4), 399-407.
- *McNICOL, A.M. and RICHMOND, J.A.
Optimizing immunohistochemistry : antigen retrieval and signal amplification.
Histopathology, 1998, **32** (2), 97-103.
- *MEIER, F., SATYAMOORTHY, K., NESBIT, M., HSU, M.Y., SCHITTEK, B., GARBE, C. and HERLYN, M.
Molecular events in melanoma development and progression.
Front Biosci, 1998, **3**, d1005-1010.
- *NANDI, A., ESTESS, P. and SIEGELMAN, M.H.
Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44.
J Biol Chem, 2000, **275** (20), 14939-14948.
- *NIEZABITOWSKI, A., CZAJECKI, K., RYS, J., KRUCZAC, A., GRUCHALA, A., WASILEWSKA, A., LACKOWSKA, B., SOKOLOWSKI, A. and SZKLARSKI, W.
Prognostic evaluation of cutaneous malignant melanoma : a clinicopathologic and immunohistochemical study.
J Surg Oncol, 1999, **70** (3), 150-160.
- *OROSZ, Z.
Melan A/Mart-1 expression in various melanocytic lesions and in non-melanocytic soft tissue tumours.
Histopathology, 1999, **34** (6), 517-525.
- *PALS, S.T., KOOPMAN, G., HEIDER, K.H., GRIFFIOEN, A., ADOLF, G.R., VAN DEN BERG, F., PONTA, H., HERRLICH, P. and HORST, E.
CD44 splice variants : expression during lymphocyte activation and tumor progression.
Behring Inst Mitt, 1993, **92**, 273-277.
- *PULLEY, L.T. and STANNARD, A.A.
Melanocytic tumors
In MOULTON, J.E.
Tumors in domestic animals.
University of California Press, Third edition, 1990, 75-83.
- *RAMOS-VARA, J.A., BEISSENHERZ, M.E., MILLER, M.A., JOHNSON, G.C., PACE, L.W., FARD, A. and KOTTLER, S.J.
Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases.
Vet Pathol, 2000, **37** (6), 597-608.

*RAMOS-VARA, J.A., MILLER, M.A., JOHNSON, J.C., TURNQUIST, S.E., KREEGER, J.M. and WATSON, G.L.

Melan A and S100 protein immunohistochemistry in feline melanomas : 48 cases.

Vet Pathol, 2002, **39** (1), 127-132.

*ROELS, S., TIMANT, K. and DUCATELLE, R.

PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs.

J Comp Path, 1999, **121** (1), 13-24.

*SANDMAIER, B.M., STORB, R., BENNETT, K.L., APPELBAUM, F.R. and SANTOS, E.B.

Epitope specificity of CD44 for monoclonal antibody-dependant facilitation of marrow engraftment in a canine model.

Blood, 1998, **91** (9), 3494-3502.

*SANDUSKY, G.E., CARLTON, W.W. and WIGHTMAN, K.A.

Immunohistochemical staining for S100 protein in the diagnosis of canine amelanotic melanoma.

Vet Pathol, 1985, **22** (6), 577-581.

*SANDUSKY, G.E., CARLTON, W.W. and WIGHTMAN, K.A.

Diagnostic immunohistochemistry of canine round cell tumors.

Vet Pathol, 1987, **24** (6), 495-499.

*SI, Z. and HERSEY, P.

Immunohistological examination of the relationship between metastatic potential and expression of adhesion molecules and 'selectins' on melanoma cells.

Pathology, 1994, **26** (1), 6-15.

*SIMON, J.C., HEIDER, K.H., DIETRICH, A., WUTTIG, C., SCHOPF, E., ADOLF, G.R., PONTA, H. and HERRLICH, P.

Expression of CD44 isoforms in human skin cancer.

Eur J Cancer, 1996, **32A** (8), 1394-1400.

*VOGT, T., ZIPPERER, K.H., VOGT, A., HOLZEL, D., LANDTHALER, M. and STOLZ, W.

p53-protein and Ki-67-antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin.

Histopathology, 1997, **30** (1), 57-63.

*YANG, H., HUTCHINGS, A. and BINNS, R.M.

Preparation and reactivities of anti-porcine CD44 monoclonal antibodies.

Scand J Immunol, 1993, **37** (4), 490-498.

ANNEXES

ANNEXE N°1 : FICHE DE SUIVI CLINIQUE

VETERINAIRE

PROPRIETAIRE

IDENTIFICATION DE L'ANIMAL

DATE DE PRELEVEMENT

TYPE DE PRELEVEMENT

CONCLUSION HISTOLOGIQUE

EVOLUTION DU CAS

*L'animal est-il encore vivant ?

*L'animal est-il décédé ?

Date du décès

Des suites de sa lésion mélanique ?

D'une autre affection ? Laquelle ?

*L'exérèse de la lésion primitive a t'elle été curative ?

*Y'a t-il eu une récurrence locale ? Si oui, en combien de temps ?

*Y'a t'il eu des métastases à distance ? Si oui, vers quel(s) organe(s) ?

ANNEXE N°2 : FICHE DE LECTURE HISTOLOGIQUE

N° ANAPATH

RACE

AGE

ESPECE

SEXE

TAILLE LESION

LOCALISATION LESION

Symétrie	Oui		Cytologie	Forme cellulaire	Globoïde	
	Non				Fusiforme	
Distribution	Intraépidermique			Forme nucléaire	Epithélioïde	
	Jonctionnelle				Mixte	
	Dermique superficielle				Ovoïde	
	Dermique profonde				Fusiforme	
	Composée					
Capsule périphérique	Oui			Position noyau	Central	
	Non				Excentré	
Croissance	Expansive			Nucléole	Oui	
	Infiltrante				Non	
Forme de la tumeur	Nodulaire			RNP	Egal à 1	
	Multinodulaire				Supérieur à 1	
	Exophytique				Inférieur à 1	
Présence de thèques	Autre			Pigmentation		
	Epidermiques				Anisocytose	
	Annexielles				Anisocaryose	
Infiltration péritumorale	Au delà de la tumeur			Atypies	Plurinucléation	
	Fibrose				Plurinucléolation	
	Lymphocytes				Cellules géantes	
	Plasmocytes					
Infiltration intratumorale				Mitoses	Normales	
	Histiocytes				Anormales	
	Mélanophages				Nombre (sur 5 champs au x400)	
Remaniements				Emboles	Oui	
	Nécrose				Non	
Invasion vasculaire	Métablasie		AUTRES DONNEES			
	Hémorragie					
Epiderme	Oui					
	Non					
	Ulcération					
	Lentigines					
	Acanthose					
Orthokératose						
Parakératose						

ANNEXE N°3 : RESULTATS BRUTS EPIDEMIOLOGIQUES ET CLINIQUES

Cas	N° histologie	Race	Sexe	Age	Localisation	Epaisseur(cm)	Evolution
1	3831-97	Pointer	Femelle	11 ans	Vulve	0,3	RAS à 12 mois
2	4304-97	Berger	Femelle	6 ans	Chanfrein	0,9	RAS à 12 mois
3	4445-97	Epagneul	Mâle	5 ans	Péri-oculaire	0,1	RAS à 12 mois
4	6720-97	Basset	Mâle	13 ans	Doigt	1,3	Métastases à 9 mois
5	7165-97	Scottish terrier	Mâle	6 ans	Epaule	1,7	RAS à 12 mois
6	7510-97	Labrit	Femelle	8,5 ans	Queue	0,5	RAS à 12 mois
7	7975-97	Berger	Femelle	6,5 ans	Doigt	2,4	RAS à 12 mois
8	1655-98	Setter irlandais	Mâle	12 ans	Canthus interne œil	0,5	Récidive à 2 mois
9	2025-98	Croisé	Femelle	10 ans	Métacarpe ant. Droit	0,3	RAS à 12 mois
10	3331-98	Epagneul	Femelle	8 ans	Babine	0,5	RAS à 12 mois
11	3732-98	Boxer	Mâle	10 ans	Cuisse	1,9	RAS à 12 mois
12	4214-98	Labrador	Mâle	11 ans	Doigt	1,9	Métastases à 2 mois
13	4412-98	Boxer	Femelle	9 ans	Mammaire	0,4	RAS à 12 mois
14	6842-98	Scottish terrier	Mâle	9 ans	Doigt	0,7	Métastases à 6 mois
15	7665-98	Croisé	Femelle	6 ans	Grasset	0,3	RAS à 12 mois
16	7848-98	X Briard	Mâle	8 ans	?	1	RAS à 12 mois
17	8432-98	Setter	Mâle	13 ans	Doigt	2,9	Récidive à 4 mois, Mort à 11 mois
18	8511-98	Doberman	Femelle	13 ans	Joue	1,5	Récidive et mort à 0,5 mois
19	10058-98	Bouledogue fr.	Femelle	8,5 ans	Dos	0,3	Récidive à 6 mois
20	10419-98	Teckel	Mâle	12 ans	Doigt	1,1	RAS à 12 mois
21	10570-98	Berger	Mâle	10 ans	Paupière	0,9	RAS à 12 mois
22	42-99	Rottweiler	Femelle	12 ans	Mammaire	1,4	Récidive à 1mois, Mort à 12 mois
23	1520-99	Caniche	Femelle	12 ans	Queue	1,3	RAS à 12 mois
24	3604-99	Bouvier des Fl.	Mâle	9 ans	Doigt	0,4	Métastases à 5 mois
25	4290-99	X Pékinois	Mâle	5 ans	Paupière	0,3	RAS à 12 mois
26	4780-99	Briard	Mâle	11 ans	Doigt	2,1	RAS à 12 mois
27	5202-99	X Epagneul breton	Femelle	12 ans	Péri-oculaire	0,3	RAS à 12 mois
28	5267-99	Epagneul breton	Mâle	9 ans	Tête	0,6	RAS à 12 mois
29	5653-99	Yorkshire	Femelle	7 ans	Membre ant. Droit	0,4	RAS à 12 mois
30	6404-99	Boxer	Femelle	9 ans	Cou	1,3	RAS à 12 mois
31	6912-99	Husky	Mâle	7 ans	Pavillon auriculaire	0,2	RAS à 12 mois
32	7203-99	Berger des Pyr.	Femelle	8 ans	Mammaire	0,4	RAS à 12 mois

33	7629-99	Croisé	Mâle	9 ans	Paupière	0,5	RAS à 12 mois
34	8222-99	Yorkshire	Mâle	7 ans	Supra-orbitaire	0,6	RAS à 12 mois
35	8507-99	Chow Chow	Mâle	?	Péri-oculaire	1,2	Métastases à 1 mois
36	8980-99	Beauceron	Femelle	13 ans	Péri-vulvaire	0,3	RAS à 12 mois
37	9067-99	Epagneul breton	Femelle	?	Anus	0,1	RAS à 12 mois
38	10060-99	Beauceron	Mâle	?	Doigt	2,6	Métastases à 10 mois
39	99P234	WHWT	Femelle	10 ans	Epaule	0,35	RAS à 12 mois
40	10547-99	X Berger belge	Mâle	11,5 ans	Doigt	1,7	RAS à 12 mois
41	10800-99	Briard	Mâle	6 ans	Doigt	2,8	Métastases à 1 mois
42	11088-99	Cocker	Mâle	13 ans	Babine	1,9	Métastases à 3 mois
43	11236-99	Braque	Femelle	11 ans	Babine	1,4	Métastases à 5 mois
44	11950-99	Labrador	Femelle	5 ans	Truffe	0,3	RAS à 12 mois
45	14682-99	Pinscher	Femelle	7,5 ans	Mammaire	0,9	RAS à 12 mois
46	15495-99	Croisé	Mâle	10,5 ans	Truffe	0,7	Récidive à 5 mois
47	1329-00	Bouvier bernois	Femelle	7,5 ans	Babine	0,9	RAS à 12 mois
48	1749-00	Boxer	Mâle	7 ans	Ventre	0,2	RAS à 12 mois
49	2273-00	Berger belge	Femelle	13 ans	?	1	Mort à 0 mois
50	5051-00	Epagneul	Mâle	5 ans	Péri-oculaire	0,4	RAS à 12 mois
51	5708-00	Epagneul	Mâle	7 ans	Truffe	0,3	RAS à 12 mois
52	5945-00	Doberman	Mâle	12 ans	?	0,8	RAS à 12 mois
53	6047-00	x Berger allemand	Mâle	7 ans	Paupière	0,3	RAS à 12 mois
54	6126-00	Welsh terrier	Mâle	10 ans	Flanc droit	0,8	RAS à 12 mois
55	6717-00	Croisé	Femelle	9 ans	Péri-anal	0,5	RAS à 12 mois
56	6757-00	Bouvier	Femelle	5 ans	Vulve	0,6	RAS à 12 mois
57	6867-00	Setter irlandais	Femelle	13 ans	?	3	Récidive à 1,5 mois et mort à 3 mois
58	6985-00	Caniche	Mâle	8 ans	Babine	0,7	Récidive à 6 mois
59	7093-00	Yorkshire	Femelle	8 ans	Babine	0,3	RAS à 12 mois
60	8468-00	Epagneul	Mâle	10 ans	Péri-anal	2,4	RAS à 12 mois
61	8632-00	Bouvier bernois	Femelle	12 ans	Crâne	0,7	RAS à 12 mois
62	8889-00	Scottish terrier	Femelle	9 ans	Doigt	0,7	Récidive à 12 mois
63	9104-00	Briard	Mâle	6 ans	Membre ant. Gauche	0,8	RAS à 12 mois
64	9981-00	Croisé	Femelle	8,5 ans	Paupière	0,2	RAS à 12 mois
65	10144-00	Caniche	Mâle	9 ans	Doigt	0,5	RAS à 12 mois

ANNEXE N°4 : RESULTATS BRUTS DE L'ANALYSE HISTOLOGIQUE

<u>N° de cas</u>	<u>Symétrie</u>	<u>Distribution</u>	<u>Capsule</u>	<u>Croissance</u>	<u>Forme</u>	<u>Stroma réaction</u>	<u>Ulcération</u>	<u>Lentiginés</u>	<u>Forme cellulaire</u>	<u>Forme noyau</u>	<u>RNP</u>	<u>Pigmentation</u>	<u>Anisocytose</u>	<u>Anisocaryose</u>	<u>Mitoses</u>	<u>Emboles</u>
3831-97	Oui	Composée	Oui	Expansive	Nod. Exo.	0	0	S	Mixte	Ovoïde	Egal 1	3	S	L	2	Non
4304-97	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	S	L	Mixte	Ovoïde	Egal 1	3	S	L	0	Non
4445-97	Oui	Composée	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	M	Mixte	Ovoïde	Inf 1	3	M	L	0	Non
6720-97	Non	Composée	Non	Infiltrante	Multi. Exo.	M	S	L	Mixte	Ovoïde	Sup 1	1	L	S	22	Oui
7165-97	Oui	Derme	Non	Expansive	Nodule	L	L	L	Mixte	Ovoïde	Inf 1	3	S	L	0	Non
7510-97	Oui	Derme	Non	Expansive	Nodule	0	0	0	Mixte	Mixte	Sup 1	1	L	S	0	Non
7975-97	Non	Derme	Non	Infiltrante	Multinod.	0	M	L	Epithélioïde	Ovoïde	Sup 1	1	M	M	6	Douteux
1655-98	Non	Derme sup.	Non	Infiltrante	Nod. Exo.	0	L	L	Epithélioïde	Ovoïde	Sup 1	1	L	M	8	Non
2025-98	Oui	Composée	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	L	M	Fusifforme	Ovoïde	Sup 1	2	L	S	0	Non
3331-98	Oui	Composée	Non	Expansive	Multi. Exo.	0	0	M	Mixte	Ovoïde	Sup 1	3	M	M	0	Non
3732-98	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	L	S	Fusifforme	Ovoïde	Sup 1	2	M	S	0	Non
4214-98	Oui	Derme	Non	Infiltrante	Nodule	L	S	0	Epithélioïde	Ovoïde	Sup 1	1	L	M	17	Oui
4412-98	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	L	Fusifforme	Ovoïde	Sup 1	1	L	M	2	Non
6842-98	Non	Composée	Non	Infiltrante	Nodule	0	L	M	Mixte	Ovoïde	Sup 1	1	L	M	7	Douteux
7665-98	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	S	L	Fusifforme	Ovoïde	Sup 1	1	L	S	11	Non
7848-98	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	S	S	Fusifforme	Ovoïde	Sup 1	1	L	S	5	Non
8432-98	Non	Derme	Non	Infiltrante	Multinod.	0	S	L	Epithélioïde	Ovoïde	Sup 1	1	M	S	35	Oui
8511-98	Non	Derme	Non	Infiltrante	Nodule	0	L	L	Epithélioïde	Ovoïde	Sup 1	1	M	M	23	Non
10058-98	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	L	0	M	Mixte	Ovoïde	Inf 1	3	M	S	0	Non
10419-98	Non	Derme sup.	Non	Infiltrante	Nodule	0	M	0	Mixte	Ovoïde	Egal 1	2	M	M	0	Non

<u>N° de cas</u>	<u>Symétrie</u>	<u>Distribution</u>	<u>Capsule</u>	<u>Croissance</u>	<u>Forme</u>	<u>Stroma réaction</u>	<u>Ulcération</u>	<u>Lentignes</u>	<u>Forme cellulaire</u>	<u>Forme noyau</u>	<u>RNP</u>	<u>Pigmentation</u>	<u>Anisocytose</u>	<u>Anisocaryose</u>	<u>Mitoses</u>	<u>Emboles</u>
10570-98	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	S	0	Mixte	Ovoïde	Sup 1	0	M	S	27	Non
42-99	Non	Derme	Non	Infiltrante	Multinod.	M	ND	ND	Mixte	Ovoïde	Sup 1	0	M	S	47	Non
1520-99	Oui	Composée	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	L	M	Mixte	Ovoïde	Sup 1	2	S	S	1	Non
3604-99	Non	Composée	Non	Infiltrante	Multinod.	0	M	L	Epithélioïde	Ovoïde	Sup 1	2	S	M	3	Non
4290-99	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	M	Mixte	Mixte	Sup 1	1	L	L	0	Non
4780-99	Non	Derme	Non	Infiltrante	Multinod.	0	0	L	Mixte	Ovoïde	Sup 1	3	S	S	2	Non
5202-99	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nodule	S	L	0	Epithélioïde	Ovoïde	Sup 1	1	M	S	1	Non
5267-99	Oui	Derme sup.	Non	Infiltrante	Nod. Exo.	0	L	M	Epithélioïde	Ovoïde	Sup 1	1	L	M	19	Non
5653-99	Oui	Composée	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	S	Mixte	Mixte	Sup 1	3	S	M	0	Non
6404-99	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	L	Mixte	Ovoïde	Sup 1	3	M	M	0	Non
6912-99	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nodule	0	0	0	Fusifforme	Mixte	Sup 1	1	L	M	1	Non
7203-99	Oui	Derme sup.	Oui	Expansive	Nodule	0	ND	ND	Globoïde	Ovoïde	Sup 1	3	M	M	0	Non
7629-99	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	L	S	Globoïde	Ovoïde	Sup 1	3	S	S	0	Non
8222-99	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	S	Epithélioïde	Ovoïde	Egal 1	2	L	L	0	Non
8507-99	Non	Derme	Non	Infiltrante	Multi. Exo.	0	L	L	Mixte	Ovoïde	Egal 1	1	S	S	5	Non
8980-99	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	S	L	Mixte	Ovoïde	Sup 1	3	M	M	0	Non
9067-99	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	L	Mixte	Ovoïde	Sup 1	3	L	L	1	Non
10060-99	Non	Composée	Non	Infiltrante	Multinod.	S	0	L	Mixte	Ovoïde	Sup 1	3	L	M	2	Non
99P234	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	S	Fusifforme	Fusifforme	Sup 1	1	L	M	2	Non
10547-99	Oui	Derme	Non	Expansive	Nodule	0	0	L	Fusifforme	Fusifforme	Egal 1	3	L	L	1	Non
10800-99	Non	Derme	Non	Infiltrante	Multinod.	M	0	0	Mixte	Ovoïde	Sup 1	1	L	S	9	Non
11088-99	Non	Composée	Oui	Infiltrante	Multinod.	L	0	0	Epithélioïde	Ovoïde	Sup 1	1	L	S	26	Non
11236-99	Oui	Composée	Non	Infiltrante	Nod. Exo.	0	0	L	Mixte	Ovoïde	Sup 1	1	L	L	14	Non
11950-99	Oui	Composée	Non	Expansive	Nodule	L	0	L	Epithélioïde	Ovoïde	Egal 1	3	L	L	0	Non

<u>N° de cas</u>	<u>Symétrie</u>	<u>Distribution</u>	<u>Capsule</u>	<u>Croissance</u>	<u>Forme</u>	<u>Stroma réaction</u>	<u>Ulcération</u>	<u>Lentigines</u>	<u>Forme cellulaire</u>	<u>Forme noyau</u>	<u>RNP</u>	<u>Pigmentation</u>	<u>Anisocytose</u>	<u>Anisocaryose</u>	<u>Mitoses</u>	<u>Emboles</u>
14682-99	Oui	Composée	Non	Expansive	Nodule	L	0	L	Epithélioïde	Ovoïde	Sup 1	1	L	L	3	Non
15495-99	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	L	M	L	Fusifforme	Ovoïde	Egal 1	1	L	L	1	Non
1329-00	Oui	Composée	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	M	Mixte	Ovoïde	Egal 1	3	L	L	0	Non
1749-00	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	S	Epithélioïde	Ovoïde	Egal 1	3	L	L	1	Non
2273-00	Non	Derme et SC	Non	Infiltrante	Multinod.	0	0	0	Epithélioïde	Ovoïde	Egal 1	0	L	L	50	Non
5051-00	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	L	Mixte	Ovoïde	Sup 1	3	M	S	0	Non
5708-00	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	L	0	Mixte	Ovoïde	Egal 1	1	M	M	1	Non
5945-00	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	S	Fusifforme	Fusifforme	Egal 1	2	L	M	0	Non
6047-00	Oui	Composée	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	L	Globoïde	Ovoïde	Egal 1	3	M	L	0	Non
6126-00	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	S	Globoïde	Ovoïde	Sup 1	1	M	L	0	Non
6717-00	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	S	Fusifforme	Mixte	Egal 1	1	L	L	0	Non
6757-00	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	L	0	S	Mixte	Ovoïde	Sup 1	2	M	S	0	Non
6867-00	Non	Derme	Non	Infiltrante	Nodule	0	S	0	Mixte	Ovoïde	Sup 1	3	L	M	8	Non
6985-00	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	S	0	Epithélioïde	Ovoïde	Sup 1	1	L	L	75	Douteux
7093-00	Oui	Derme sup.	Non	Infiltrante	Nod. Exo.	0	0	M	Mixte	Ovoïde	Egal 1	3	S	M	0	Non
8468-00	Non	Composée	Non	Infiltrante	Nodule	S	M	0	Mixte	Ovoïde	Sup 1	1	L	M	0	Non
8632-00	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	S	L	Fusifforme	Ovoïde	Sup 1	1	L	L	0	Non
8889-00	Non	Derme prof.	Non	Infiltrante	Multinod.	0	0	L	Mixte	Ovoïde	Egal 1	2	M	L	0	Non
9104-00	Oui	Derme sup.	Non	Expansive	Nod. Exo.	L	S	0	Fusifforme	Ovoïde	Sup 1	1	L	L	2	Non
9981-00	Oui	Composée	Non	Expansive	Nod. Exo.	L	0	L	Mixte	Ovoïde	Sup 1	3	L	M	0	Non
10144-00	Oui	Composée	Non	Expansive	Nod. Exo.	0	0	L	Mixte	Ovoïde	Sup 1	1	L	M	3	Non

Abréviations : Derme sup. : derme superficiel ; SC : tissu sous-cutané ; Derme prof. : derme profond ; Nod. Exo. : nodule exophytique ; Multinod. : multinodulaire ; L : léger ; M : modéré ; S : sévère ; Sup 1 : supérieur à 1 ; Inf 1 : inférieur à 1 ; ND : non déterminé.

**ANNEXE N°5 : RESULTATS BRUTS DE L'ANALYSE
IMMUNOHISTOCHIMIQUE**

N°cas	Evolution	CD44	% Melan A	% Ki-67
3831-97	RAS à 12 mois	Fort	79,1	8,6
4304-97	RAS à 12 mois	Faible	98,8	1,4
4445-97	RAS à 12 mois	Fort	96,7	15,6
6720-97	Métastases à 9 mois	Fort	52,4	40
7165-97	RAS à 12 mois	Faible	94,8	7,2
7510-97	RAS à 12 mois	Fort	99,7	7,4
7975-97	RAS à 12 mois	0	50,6	0
1655-98	Récidive à 2 mois	Fort	96,4	19,4
2025-98	RAS à 12 mois	Faible	65	15,8
3331-98	RAS à 12 mois	Fort	99,3	2,6
3732-98	RAS à 12 mois	Fort	32	1
4214-98	Métastases à 2 mois	Fort	52,5	22
4412-98	RAS à 12 mois	Fort	61,8	13
6842-98	Métastases à 6 mois	0	6,9	0
7665-98	RAS à 12 mois	Faible	29,3	28,2
7848-98	RAS à 12 mois	Fort	7,2	17,2
8432-98	Récidive à 4 mois, Mort à 11 mois	Fort	77,5	27,2
8511-98	Récidive et mort à 0,5 mois	Fort	63,1	26,2
10058-98	Récidive à 6 mois	Fort	56	10,4
10419-98	RAS à 12 mois	0	63,8	0
10570-98	RAS à 12 mois	Fort	14,8	41,8
42-99	Récidive à 1mois, Mort à 12 mois	Fort	91	49,2
1520-99	RAS à 12 mois	Faible	25,9	9,4
3604-99	Métastases à 5 mois	Fort	31,4	35,2
4290-99	RAS à 12 mois	Fort	91,3	12
4780-99	RAS à 12 mois	Fort	87,1	12,2
5202-99	RAS à 12 mois	Fort	7,6	16,6
5267-99	RAS à 12 mois	Fort	75	24,8
5653-99	RAS à 12 mois	Fort	60,4	1
6404-99	RAS à 12 mois	Faible	51,4	5,8
6912-99	RAS à 12 mois	Fort	96,7	6,2
7203-99	RAS à 12 mois	Fort	58,7	8,6
7629-99	RAS à 12 mois	Fort	60	0,8
8222-99	RAS à 12 mois	Fort	59,5	1,2
8507-99	Métastases à 1 mois	Fort	46	15,4
8980-99	RAS à 12 mois	Faible	50	6,4
9067-99	RAS à 12 mois	Fort	99,5	1,2
10060-99	Métastases à 10 mois	Faible	20,9	20,4
99P234	RAS à 12 mois	Faible	33	5,6
10547-99	RAS à 12 mois	Fort	85,3	12,8
10800-99	Métastases à 1 mois	0	18,1	0
11088-99	Métastases à 3 mois	Fort	63,5	56,2
11236-99	Métastases à 5 mois	Fort	92,4	22
11950-99	RAS à 12 mois	Fort	94,7	2,6
14682-99	RAS à 12 mois	Fort	51,4	10,4
15495-99	Récidive à 5 mois	Fort	65	6
1329-00	RAS à 12 mois	Fort	99,2	7,4
1749-00	RAS à 12 mois	Fort	97,2	4,6
2273-00	Mort à 0 mois	Fort	44	54,8
5051-00	RAS à 12 mois	Fort	95	3
5708-00	RAS à 12 mois	Fort	48,3	5,8

N°cas	Evolution	CD44	% Melan A	% Ki-67
5945-00	RAS à 12 mois	Faible	40,8	1,4
6047-00	RAS à 12 mois	Fort	96,9	1,2
6126-00	RAS à 12 mois	Fort	24,3	2
6717-00	RAS à 12 mois	Fort	28,4	3
6757-00	RAS à 12 mois	Fort	36,6	2,2
6867-00	Récidive à 1,5 mois et mort à 3 mois	Fort	96,5	19,6
6985-00	Récidive à 6 mois	Fort	70,7	44,8
7093-00	RAS à 12 mois	Fort	30	3
8468-00	RAS à 12 mois	Fort	47,4	16,6
8632-00	RAS à 12 mois	Fort	42,5	7,2
8889-00	Récidive à 12 mois	0	70	0
9104-00	RAS à 12 mois	Fort	94,6	10,6
9981-00	RAS à 12 mois	Faible	96,1	3,6
10144-00	RAS à 12 mois	Faible	7,2	7,2

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures :

<u>Figure n°1</u> : Distribution des cas en fonction de l'âge de l'animal.	19
<u>Figure n°2</u> : Evolution clinique en fonction de l'intensité de l'ulcération épidermique.	25
<u>Figure n°3</u> : Evolution clinique en fonction de l'intensité de la pigmentation.	29
<u>Figure n°4</u> : Evolution clinique en fonction de l'intensité du marquage au CD44.	32
<u>Figure n°5</u> : Evolution clinique en fonction de l'intensité du marquage Ki-67.	34
<u>Figure n°6</u> : Corrélation entre le marquage au CD44 et l'évolution des cas dont l'index Ki-67 est inférieur à 15%.	35
<u>Figure n°7</u> : Corrélation entre le marquage au CD44 et l'évolution des cas dont l'index Ki-67 est supérieur ou égal à 15%.	36
<u>Figure n°8</u> :	37
<u>A</u> Exemple de lésion exophytique symétrique, à croissance expansive, confinée au derme superficiel, fortement pigmentée (Hémalun-éosine, x 20).	37
<u>B</u> Exemple d'hyperplasie lentigineuse basale d'intensité sévère (Hémalun-éosine, x 400).	37
<u>C</u> Exemple de thèques dermiques superficielles (Hémalun-éosine, x 400).	37
<u>D</u> Exemple de lésion modérément pigmentée, composée de cellules majoritairement fusiformes (Hémalun-éosine, x 200).	37
<u>E</u> Exemple de lésion achromique, composée de cellules majoritairement épithélioïdes (Hémalun-éosine, x 400).	37
<u>F</u> Lésion achromique, à cellules majoritairement épithélioïdes ; noter le nombre important de figures de mitoses (Hémalun-éosine, x 400).	37
<u>Figure n°9</u> :	38
<u>A</u> Marquage intra-cytoplasmique granuleux avec l'anticorps Melan A (DAKO, référence M7196) (réaction peroxydase-AEC, dépôt rouge vif, x 100).	38
<u>B</u> Marquage intra-cytoplasmique granuleux avec l'anticorps Melan A (DAKO, référence M7196) ; noter le marquage des mélanocytes intra-épidermiques (réaction peroxydase-AEC, dépôt rouge vif, x 400).	38
<u>C</u> Marquage intra-cytoplasmique granuleux avec l'anticorps Melan A (DAKO, référence M7196) (réaction peroxydase-AEC, dépôt rouge vif, x 400).	38
<u>D</u> Marquage nucléaire avec l'anticorps Ki-67 (DAKO, référence M7240) : marquage des cellules épidermiques basales en prolifération servant de témoin de positivité intrinsèque (réaction peroxydase-AEC, dépôt rouge vif, x 200).	38
<u>E</u> Marquage nucléaire avec l'anticorps Ki-67 (DAKO, référence M7240) : exemple d'une lésion dans laquelle le pourcentage de cellules positives est inférieur à 15 (réaction peroxydase-AEC, dépôt rouge vif, x 200).	38
<u>F</u> Marquage nucléaire avec l'anticorps Ki-67 (DAKO, référence M7240) : exemple d'une lésion dans laquelle le pourcentage de cellules positives est supérieur à 15 (réaction peroxydase-AEC, dépôt rouge vif, x 200).	38
<u>Figure n°10</u> :	39
<u>A</u> Marquage membranaire avec l'anticorps CD44 (SEROTEC, référence MAC329) : exemple d'une lésion dans laquelle l'intensité du marquage de la tumeur est inférieure à celle de l'épiderme (réaction peroxydase-AEC, dépôt rouge vif, x 200).	39
<u>B</u> Marquage membranaire avec l'anticorps CD44 (SEROTEC, référence MAC329) : exemple d'une lésion dans laquelle l'intensité du marquage de la tumeur est inférieure à celle de l'épiderme (réaction peroxydase-AEC, dépôt rouge vif, x 200).	39
<u>C</u> Marquage membranaire avec l'anticorps CD44 (SEROTEC, référence MAC329) : exemple d'une lésion dans laquelle l'intensité du marquage de la tumeur est supérieure à celle de l'épiderme (réaction peroxydase-AEC, dépôt rouge vif, x 200).	39
<u>D</u> Marquage membranaire avec l'anticorps CD44 (SEROTEC, référence MAC329) : exemple d'une lésion dans laquelle l'intensité du marquage de la tumeur est égale à supérieure à celle de l'épiderme (réaction peroxydase-AEC, dépôt rouge vif, x 400).	39

Tableaux :

<u>Tableau n°1</u> : Répartition des cas en fonction de la distribution anatomique de la lésion.	20
<u>Tableau n°2</u> : Répartition et évolution des cas en fonction de la nature symétrique ou dissymétrique de la lésion.	22
<u>Tableau n°3</u> : Répartition des cas en fonction de la distribution des lésions dans le plan cutané.	22
<u>Tableau n°4</u> : Répartition et évolution des cas en fonction de la nature expansive ou infiltrante du processus tumoral.	23
<u>Tableau n°5</u> : Répartition et évolution des cas en fonction de la forme de la tumeur.	24
<u>Tableau n°6</u> : Corrélation entre l'évolution clinique et l'intensité de l'ulcération épidermique.	25
<u>Tableau n°7</u> : Corrélation entre l'évolution clinique et l'intensité de l'activité lentigineuse épidermique.	26
<u>Tableau n°8</u> : Evolution des cas en fonction des types cellulaires rencontrés dans les lésions.	26
<u>Tableau n°9</u> : Evolution des cas en fonction de la morphologie nucléaire des cellules tumorales.	27
<u>Tableau n°10</u> : Répartition des différents cas en fonction de l'intensité de l'anisocytose / caryose.	27
<u>Tableau n°11</u> : Corrélation entre l'évolution clinique et l'intensité des atypies cytonucléaires.	28
<u>Tableau n°12</u> : Corrélation entre l'évolution clinique et l'intensité de la pigmentation mélanique.	28
<u>Tableau n°13</u> : Corrélation entre l'intensité de la pigmentation mélanique et le nombre de cellules tumorales positives au Melan A.	31
<u>Tableau n°14</u> : Corrélation entre l'intensité du marquage obtenue au CD44 et l'évolution clinique sur 12 mois.	31
<u>Tableau n°15</u> : Corrélation entre l'intensité du marquage obtenue au CD44 et l'évolution clinique sur 24 mois.	32
<u>Tableau n°16</u> : Corrélation entre l'index Ki-67 et l'évolution clinique sur 12 mois.	33
<u>Tableau n°17</u> : Répartition et évolution des cas en fonction du marquage combiné CD44/Ki-67.	34

TOULOUSE 2002

NOM : LACROUX

PRENOM : CAROLINE

TITRE : CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MELANOMES CUTANES CANINS : RECHERCHE DE CRITERES HISTOLOGIQUES ET IMMUNOHISTOCHIMIQUES PRONOSTIQUES A PARTIR D'UN ECHANTILLON DE 65 CAS.

RESUME :

Les mélanomes cutanés canins représentent 6 à 9 % des tumeurs de la peau dans cette espèce. Malgré l'existence d'une classification pronostique établie par Bostock en 1979, basée sur le nombre de mitoses dans la population néoplasique, l'histopronostic rendu après examen anatomopathologique est souvent considéré comme aléatoire. Aucun critère architectural ou cytologique autre que l'index mitotique n'a pour l'instant été intégré de façon formelle à l'établissement du pronostic des mélanomes cutanés du chien.

L'utilisation de marqueurs immunologiques tels que les antigènes de prolifération nucléaire (exemple : épitope Ki-67) a permis d'améliorer, chez le chien comme chez l'homme, la qualité du pronostic rendu. Plus récemment, des immunomarqueurs rendant compte de l'état de différenciation (Melan A) ou des capacités d'adhésion à la matrice extracellulaire (CD44) des cellules mélaniques tumorales, ont été proposés en médecine humaine comme facteurs influençant le pronostic.

Dans cette étude, à partir d'un échantillon de 65 cas de mélanomes cutanés canins suivis sur une période post-opératoire minimale de 12 mois, nous avons étudié 16 critères architecturaux et cytologiques différents ainsi que l'expression des trois marqueurs immunologiques : épitope Ki-67, CD44 et Melan A. Nous proposons différents critères histologiques, majeurs et mineurs, pouvant influencer le pronostic de la lésion, ainsi qu'une démarche raisonnée permettant d'intégrer les données des marquages Ki-67 et CD44 dans l'établissement de celui-ci.

MOTS CLES : MELANOME CUTANE – CHIEN – HISTO-IMMUNO-PRONOSTIC – CD44 – Ki-67 – MELAN A.

ENGLISH TITLE : STUDY OF CANINE CUTANEOUS MELANOMAS : EVALUATION OF HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PROGNOSTIC CRITERIONS IN A 65 CASES SAMPLE.

ABSTRACT :

Canine cutaneous melanoma account for 6 to 9 % of skin neoplasia in this species. Despite the existence of a prognostical classification, established by Bostock in 1979, based on the number of mitotic figures in the neoplastic cell population, the histopronostic given by the pathologist is often considered as poorly reliable. No architectural or cytological criterion other than mitotic index is currently considered for the establishment of the melanoma prognostic in dog.

Immunological markers such as nuclear proliferation antigen (Ki-67 antigen) has been shown to improve the prognostic quality in both dog and man. More recently in human medicine, markers related to cellular differentiation (Melan A) or to adhesion abilities (CD44) of the neoplastic melanic cells were proposed as elements related to the prognostic.

In this study, using 65 cases of canine cutaneous melanomas, observed during a 12 months post-surgical period, we investigated 16 architectural and cytological criterion and three immunological markers: Ki-67 antigen, CD44 and Melan A. We propose several major and minor histological criterion, but also recommendation concerning the use of Ki-67 and CD44 for the establishment of a more reliable prognostic.

KEY WORDS : CUTANEOUS MELANOMA – DOG – HISTO-IMMUNO-PROGNOSTIC – CD44 – Ki-67 – MELAN A.