

Cancérologie : les examens complémentaires



Olivier Keravel
Aurélia Klajer
Magali Ruiz
Ingrid Bemelmans
Nora Bouhsina
Kristina Museux
Karen Leroy

13. Par où commencer ?
20. Le bilan d'extension en cancérologie
26. L'identification tumorale : cytologie, cytométrie en flux, histologie et immunohistochimie
32. Le nœud lymphatique sentinelle dans les tumeurs cutanées et sous-cutanées canines : comment le repérer, pour quelle significativité ?
36. Les marqueurs tumoraux
46. Séquençage et biopsies liquides : de nouveaux outils qui suscitent de grands espoirs
56. Que retenir de la place des examens complémentaires en cancérologie ?

Mieux connaître et comprendre les examens complémentaires

Nous sommes heureux de vous présenter notre premier **dossier Cancérologie** au sein de votre nouvelle revue *Médecine et Chirurgie Animales*. L'objectif de ces dossiers, qui vous seront proposés une fois par an, est de partager avec vous les connaissances fondamentales nécessaires à une approche optimisée de la prise en charge de vos patients atteints d'un cancer.

Nous insérerons dans certains de nos articles des liens vidéo afin d'illustrer nos propos.

La cancérologie est un domaine particulièrement riche et varié, important dans votre quotidien, aussi nous essaierons de vous tenir informés régulièrement des actualités de cette discipline dans les rubriques **Revue de la littérature** (cf. *Veterinary and comparative oncology*, MCA n°2, mars-avril 2022; *Fasting reduces the incidence of vincristine-associated adverse events in dogs*, MCA n°3-4, juillet-octobre 2022), **Échos des congrès** (cf. *Comptes-rendus des congrès ESVONC*, MCA n°3-4, juillet-octobre 2022, et *VCS*, MCA n°5, novembre-décembre 2022) ou **Mise au point** (cf. *Questions/réponses sur les tumeurs mammaires canines et félines*, MCA n°3-4, juillet-octobre 2022).

La cancérologie est une spécialité particulière qui nécessite des connaissances transversales en médecine interne,

imagerie, et des connaissances spécifiques sur les différentes thérapeutiques (chirurgie carcinologique, chimiothérapie, radiothérapie), mais aussi sur l'immunothérapie et la génétique qui sont devenues incontournables.

En revanche, notre rôle de vétérinaire reste de soigner nos patients dans nos cliniques. Le vétérinaire généraliste a un rôle essentiel à mener en amont de la consultation de cancérologie initiale.

Ce dossier a pour but de vous aider à bien connaître et comprendre les examens complémentaires à votre disposition afin de réaliser une prise en charge précoce dans de bonnes conditions en proposant à votre client les examens adaptés et ainsi préserver au mieux les chances de votre patient.

Nous allons donc tenter de partager avec vous les bases théoriques des différents examens complémentaires à notre disposition actuellement en cancérologie vétérinaire, de l'examen clinique initial au séquençage éventuel de la tumeur. ●

Olivier Keravel, *Eiffelvet*, Paris
Coordinateur scientifique

Par où commencer?

Where to begin?

Aurélia Klajer

Eiffelvet, Paris.

RÉSUMÉ

La détection précoce d'un cancer et le bilan de santé complet du patient cancéreux, comprenant notamment le diagnostic d'éventuelles comorbidités, sont les piliers d'une bonne prise en charge oncologique ultérieure. Ces étapes préalables, réalisées le plus souvent chez le vétérinaire traitant, permettront de gagner un temps précieux lors la mise en place de la stratégie thérapeutique, adaptée à chaque patient.

SUMMARY

Early detection of cancer and a complete health check-up of the cancer patient, including the diagnosis of possible comorbidities, are the pillars of a good oncological management later. These preliminary steps, most often performed at the treating veterinarian's office, will save precious time for the implementation of the therapeutic strategy, adapted to each patient.

Cinquante pour cent des chiens de plus de 10 ans et 25 % tous âges confondus mourront d'un cancer: l'allongement de la durée de vie de nos animaux de compagnie (lié au meilleur suivi médical, au dépistage de meilleure qualité et aux nouveaux outils diagnostiques) est l'un des facteurs expliquant l'augmentation de la survenue des cancers chez les chiens et chats. Le cancer apparaît comme la préoccupation principale des propriétaires lorsqu'il s'agit de la santé de leur compagnon.

Les avancées médicales en médecine humaine de ces dernières années contribuent à élever le niveau d'attente des propriétaires: gestion et possibilités thérapeutiques pour leurs animaux. L'augmentation de la prévalence du cancer et des attentes des propriétaires exige que la profession vétérinaire soit préparée à relever le défi.

Une des priorités en cancérologie est de réaliser un dépistage et un diagnostic précoces, car plus un cancer est soigné tôt, meilleures sont les chances de rémission et de guérison.

La consultation initiale

Certains cancers sont facilement identifiables car visibles extérieurement: un sarcome, un mélanome, un mastocytome (figures 1 et 2, p. 14), mais parfois il va vous falloir chercher.

Vos clients consulteront pour différents motifs: une masse, de la toux, une perte de poids, des douleurs, des problèmes digestifs ou urinaires, une plaie qui ne cicatrise pas, etc. Quelquefois, c'est à l'occasion du bilan de santé annuel que vous mettrez en évidence une anomalie que le propriétaire n'aura pas remarquée ou considérée comme importante.

Commémoratifs

Cela peut paraître évident, mais une prise de commémoratifs complète est l'étape indispensable à une bonne compréhension de la pathologie: date d'apparition du problème, vitesse d'évolution, caractère aigu ou chronique, état général, comportement, vocalise, polyuropolydipsie, etc.

MOTS-CLÉS

Bilan de santé
Syndromes
paranéoplasiques
Diagnostic
Imagerie
diagnostique
Prélèvements

Keywords

Health check-up
Paraneoplastic syndromes
Diagnosis
Diagnostic Imaging
Samples

Référence de l'article:
Méd Chir Anim – Anim Cie
2023;6:13-9.





Figure 1. Mélanome de la cavité buccale.



Figure 2. Sarcome supra-orbitaire.



Figure 3. Carcinome épidermoïde de la truffe.

La race et le sexe du patient (animal stérilisé ?) peuvent également orienter la suite des examens. Certaines races sont prédisposées : on pense évidemment au sarcome histiocytaire du Bouvier Bernois ou du Flat-Coated, au mastocytome du Boxer, à l'ostéosarcome du chien de grande taille, mais aussi au lymphome du Labrador, au gliome du Bouledogue, au carcinome vésical du Westie ou du Scottish, au mélanome digité du chien à poils foncés, au carcinome épidermoïde du chat blanc (figure 3), etc.

Les facteurs hormonaux prédisposent également à certains types de cancers : carcinome prostatique ou circumanalome du mâle entier, carcinome mammaire de la chienne ou de la chatte non stérilisées ou stérilisées tardivement, etc.

Examen clinique

L'examen clinique complet, à ne pas négliger, suit : examen de la cavité buccale, oculaire, auriculaire, palpation des ganglions périphériques, examen cutané complet, auscultation cardio-respiratoire, palpation abdominale, palpation testiculaire, prise de température, toucher rectal, état corporel, examen du dos et des membres et observation en mouvement pour identifier une boiterie.

Bilans biologique et cardiaque

Le bilan de santé doit inclure, quel que soit l'âge de votre patient, un bilan sanguin (numération-formule, biochimie rénale, hépatique, glycémie, protéines, voire ionogramme, T4 pour le chat, CRP ou SAA) et urinaire.

Ce bilan vous permettra soit de mettre en évidence des anomalies en lien avec le cancer (conséquence directe ou syndrome paraneoplasique (tableau 1)), soit d'identifier des comorbidités.

Une échographie cardiaque, une prise de pression artérielle et un électrocardiogramme peuvent également s'avérer indispensables chez un chien présentant un souffle cardiaque ou chez un chat à risque (race prédisposée comme le Maine Coon).

Tableau I. Syndromes paranéoplasiques et tumeurs associées.

Cachexie	Multiplés types tumoraux
Ulcère gastro-intestinal	Mastocytome
Hypercalcémie	Chien : lymphome, adénocarcinome du sac anal, myélome, carcinome mammaire, etc. Chat : lymphome, carcinome épidermoïde, myélome multiple
Hypoglycémie	Insulinome, adénome ou adénocarcinome hépatocellulaire, léiomyome, hémangiosarcome, lymphome, mélanome
Hyperestrogénisme	Sertolinome, séminome
Acromégalie	Adénome hypophysaire
Hyperglobulinémie	Myélome multiple
Anémie	Lymphome, leucémie, hémangiosarcome
Érythrocytose	Tumeur rénale
Leucocytose neutrophilique	Tumeur pulmonaire, lymphome
Thrombocytopénie	Lymphome, leucémie, hémangiosarcome
CIVD	Hémangiosarcome, carcinome mammaire inflammatoire, adénocarcinome mammaire
Dermatofibrose nodulaire	Cystadénome ou cystadénocarcinome rénal
Alopécie féline	Carcinome pancréatique ou biliaire
Dermatite exfoliative	Thymome chat
Glomérulonéphrite	Érythrocytose primaire, leucémie lymphoïde
Myasthénie gravis	Thymome chat
Neuropathie périphérique	Insulinome, tumeur pulmonaire ou mammaire
Ostéopathie hypertrophique	Tumeur pulmonaire primitive ou métastase pulmonaire
Fièvre	Multiplés types tumoraux

Ces informations auront un impact fort sur la prise en charge oncologique ultérieure du patient : examens complémentaires ou traitements réalisés sous anesthésie générale, molécules contre-indiquées, traitements anticancéreux.

Comorbidités

Si des comorbidités sont associées au cancer, il est préférable de mettre en place le plus précocement possible les traitements ou mesures hygiéniques (tableau II, p. 16).

La détection de ces comorbidités permet également d'aborder en amont avec le propriétaire les limites des traitements ultérieurs qui seront mis en place. Une insuffisance rénale chronique chez un chat ou une cardiopathie sévère chez un chien n'interdisent pas les traitements, mais limiteront le champ des possibles, le propriétaire devra en avoir conscience précocement.

Les commémoratifs, les informations de l'examen clinique et du bilan de santé, croisés avec la symptomatologie, vous orienteront vers les examens complémentaires à préconiser.

Imagerie

Sans certitude sur la localisation du problème, l'imagerie médicale diagnostique est parfois nécessaire : radiographie thoracique pour une suspicion de masse pulmonaire (figure 4, p. 16) ou d'épanchement, radiographie d'un membre en cas de boiterie persistante (figure 5, p. 17) ou échographie abdominale (figure 6, p. 17). Cette imagerie pourra parfois également permettre d'identifier précocement des métastases, orientant la suite de la prise en charge.

Il arrive quelquefois que la radiographie ou l'échographie ne permettent pas de trancher formellement sur la nature du problème, le scanner

Tableau II. Comorbidités : mesures à mettre en place et impact sur les traitements ultérieurs.

Comorbidités	Mesures	Impact sur la prise en charge oncologique
Insuffisance cardiaque	• Traitement médical	• Cardiotoxicité de la doxorubicine : contrôle avant et en cours de chimiothérapie • Anesthésies à répétition lors d'une radiothérapie hyperfractionnée
Insuffisance rénale	• Alimentation spécifique • Bilan rénal complet (y compris SDMA, analyse d'urine)	• Surveillance si anesthésie : chirurgie, scanner, radiothérapie, etc. • Frein à la prescription de la majorité des médicaments anticancéreux
Hyperthyroïdie	• Rechercher une éventuelle hypertension • Surveiller la fonction rénale	• Frein à la prescription de la majorité des médicaments anticancéreux en cas d'insuffisance rénale secondaire
Hypercorticisme	• Dépistage précoce lors d'une suspicion clinique ou d'analyses biochimiques hépatiques anormales	• Prescription de corticoïdes limitée (exemple du lymphome) • Risque de thrombose augmenté
Obésité/cachexie	• Mesures diététiques • Consultation avec un nutritionniste	• L'obésité est un frein à la décision d'amputation lors d'un ostéosarcome, par exemple • Les traitements anticancéreux sont moins bien tolérés lors d'un mauvais état général ou d'une cachexie du patient
Mutation génétique (MDR (<i>multidrug resistance</i>), par exemple)	• Dépistage avant la mise en place du traitement anticancéreux sur les races prédisposées (Colley, Berger australien, Shetland, Maine Coon, Ragdoll, etc.)	• Contre-indication ou diminution des doses de certaines chimiothérapies
Statut FeLV-FIV	• Test si passé ou vaccination non connus	• FIV : incompatibilité avec chimiothérapie ? • FeLV facteur prédisposant au lymphome médiastinal
Pancréatite chronique	• Mesures médicales et diététiques	• Frein à la prescription de la majorité des médicaments anticancéreux
Hépatopathie	• Mesures diététiques • Prescription de protecteurs hépatiques	• Contre-indication de certaines chimiothérapies (lomustine) ou immunothérapies
Arthrose	• Physiothérapie possible pour alléger les traitements médicaux • Mesures diététiques	• Frein si amputation nécessaire
Dermatites	• Mesures diététiques et externes	• Difficultés d'association de certains traitements antiprurigineux (par exemple, l'oclocitinib) avec les traitements anticancéreux et l'immunothérapie

**Figure 4. Masse médiastinale de chat.**

diagnostique apparaît alors indispensable (**figures 7 et 8**). Il est plus précis en termes topographiques, donne des indications optimales sur la localisation lésionnelle et sur les zones à privilégier pour les prélèvements afin d'optimiser leur significativité (exemple d'une masse partiellement liquidienne ou nécrotique (**figure 9**)). Cela sera notamment le cas sur les lésions des cavités nasales (**figure 10**) (privilégier le scanner avant la rhinoscopie qui pourra occasionner des lésions ensuite difficiles à différencier des lésions pathologiques), du crâne, de la région cervicale proximale, du thorax, sur les volumineuses masses abdominales, sur la filière pelvienne, le tarse ou le carpe, globalement sur toutes les zones à forte superposition anatomique. La réalisation d'un scanner préalable à tout prélèvement autorisera dans un même geste l'identification tumorale avec cytologie ou biopsie, mais aussi son bilan d'extension locorégionale, voire à distance.



Figure 5. Lésion ostéolytique de l'humérus d'un chien.

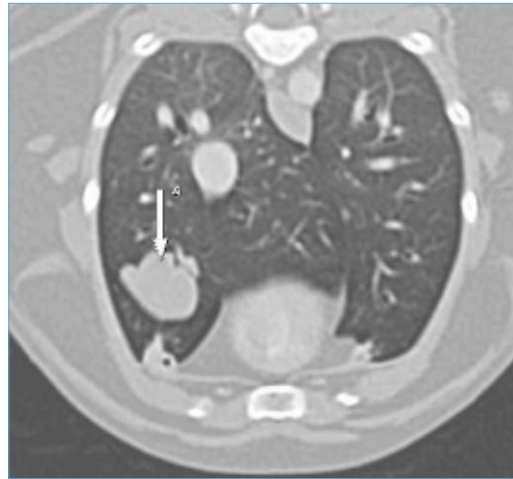


Figure 8. Tumeur pulmonaire de chat.



Figure 6. Tumeur de la paroi gastrique d'un chat.

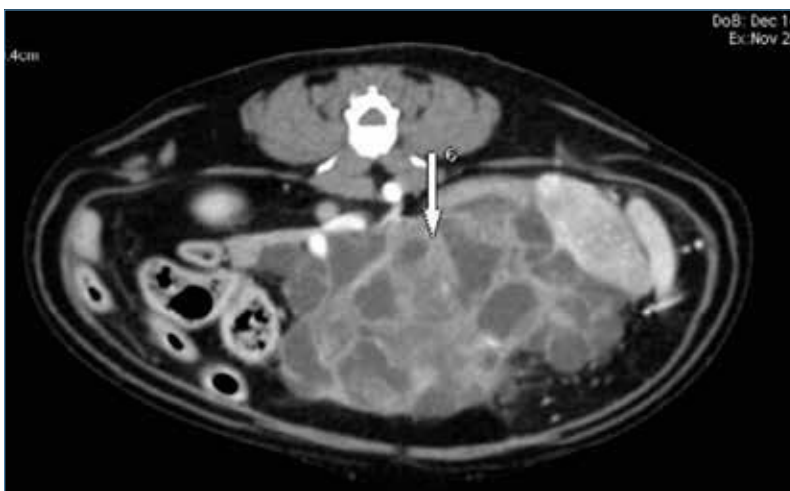


Figure 7. Tumeur pancréatique de chat.

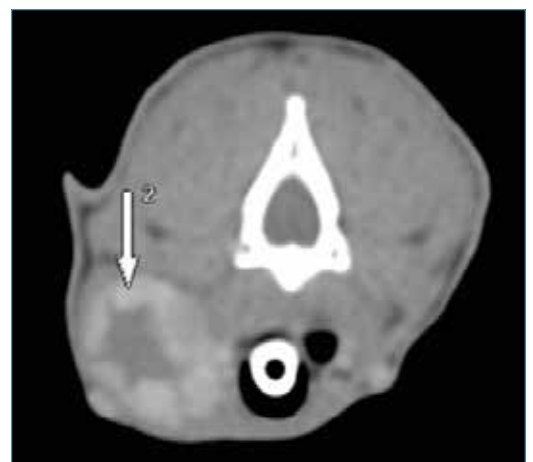


Figure 9. Tumeur thyroïdienne nécrotique.

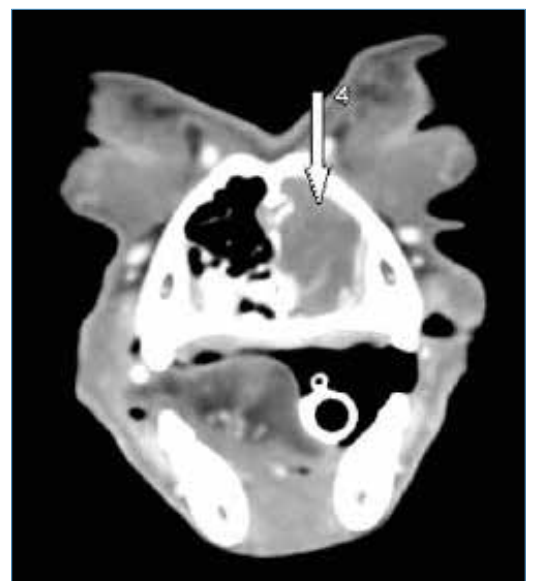


Figure 10. Tumeur nasale ostéolytique d'un chien.

Prélèvements

La cytologie est l'une des premières étapes à proposer dans la caractérisation de la tumeur (si celle-ci est accessible), elle s'avère généralement simple à réaliser, peut souvent se faire sans anesthésie et les résultats sont rapides. Le propriétaire doit cependant être informé que le résultat n'est pas certain (20 % des examens cytologiques sont non concluants) et que d'autres prélèvements seront peut-être nécessaires.

Si la cytologie n'est pas concluante (tumeur desquamant peu), une biopsie pourra être utile. Les biopsies peuvent être réalisées avec un Tru-Cut®, un pistolet à biopsie au cours d'une laparotomie ou d'une endoscopie (figure 11). On fera toujours attention au risque de dissémination iatrogène et donc à l'emplacement où la biopsie est réalisée (zone qui devra être retirée si une chirurgie



Figure 11. Biopsie sous endoscopie d'une masse œsophagienne.



Figure 12. Cicatrice d'une biopsie-exérèse d'un mélanome buccal.

est par la suite envisagée). L'inconvénient de la biopsie est la nécessité d'une anesthésie générale et le temps d'attente des résultats histologiques, ceux-ci sont cependant souvent plus précis que les cytologies, et permettent, s'il y a lieu, de proposer des immunomarquages ou un *grading* de la tumeur (exemple du mastocytome).

Il faut absolument éviter, sans certitude sur la nature lésionnelle, les "biopsies-exérèses", qui s'avèrent systématiquement néfastes pour le patient (exemple du mélanome buccal (figure 12)) : marges infiltrées à l'origine de récidives généralement plus agressives que la tumeur initiale (mutations, chaos immunologique locallement). Cet acte, qui peut sembler anodin, est souvent à l'origine d'une perte de chance pour le patient.

Conclusion : un cheminement nécessaire

Ces examens peuvent parfois sembler longs et angoissants pour les propriétaires, c'est pourquoi une consultation dédiée à l'explication de ces étapes est bénéfique et importante. Il est préférable de faire revenir le propriétaire si vous n'avez pas le temps pour ces explications, à un moment plus adéquat pour vous, vous valoriserez alors votre temps et vos actes. La précipitation n'est jamais une option en cancérologie.

Le propriétaire, s'il comprend que chacune de ces étapes préliminaires est nécessaire afin de poser un diagnostic, avant même le bilan d'extension, sera par la suite moins frustré et plus compréhensif sur les délais et les dépenses engagées.

Ce bilan de santé initial peut être réalisé avant de référer un patient en oncologie. S'il est effectué précocement, la stratégie thérapeutique pourra être déterminée plus rapidement et plus efficacement. Les traitements anticancéreux seront mis en place dans de meilleures conditions et la prise en charge du patient sera optimisée.

De nouvelles technologies seront accessibles aux vétérinaires praticiens dans les mois et années à venir, ce qui permettra peut-être de diagnostiquer certains cancers au chevet du patient : biopsies liquides (cf. article "Séquençage et biopsies liquides : de nouveaux outils qui

ENCADRÉ

L'imagerie de diffusion thermique (HT Vista by HTVet)

Cette nouvelle technologie, développée par un laboratoire israélien, consiste à scanner via une sonde externe les masses cutanées et sous-cutanées en consultation en 1 minute (figure 13). Lors de l'examen, la caméra thermique enregistre en continu la température des tissus pendant que la masse est chauffée, puis refroidie. Le signal thermique est ensuite analysé par intelligence artificielle et fournit un résultat sur une échelle de 1 à 10 : risque de bénin à malin. Cet outil permet ensuite de recommander des analyses supplémentaires si la tumeur n'est pas classée comme bénigne.

Cette technique a été validée sur 431 masses (avec cytologies comparatives) : les résultats montrent une sensibilité de 85 % (masses malignes détectées comme telles par la sonde) et une spécificité de 67 % (masses bénignes détectées comme telles). Cette technique reste donc encore à affiner, le risque étant cependant aujourd'hui plus important de surdiagnostiquer une tumeur maligne que le contraire.

Cette technologie apparaît comme un nouvel outil intéressant et non invasif dans la prise en charge initiale de masses douteuses au chevet du patient.



Figure 13. Technologie HTVet.

suscitent de grands espoirs", p. 46), sonde thermique à apposer sur la tumeur différenciant les lésions malignes ou bénignes (encadré), etc. Ces techniques prometteuses restent encore à être validées, mais offrent de nouvelles perspectives pour le diagnostic précoce des cancers chez les chiens et chats. ●

Aurélia Klajer déclare ne pas avoir de liens d'intérêts en relation avec cet article.

Pour en savoir plus

- Bronson RT. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *Am J Vet Res* 1982;43:2057-9.
- Mukherjee S. *The emperor of all maladies: a biography of cancer*. New York: Scribner, 2010.
- Bonnett BN et al. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. *Acta Vet Scand* 2005;46:105-20.
- Anfinsen KP et al. Breed-specific incidence rates of canine primary bone tumors—a population based survey of dogs in Norway. *Can J Vet Res* 2011;75:209-15.
- Sorenmo KU et al. Immunohistochemical characterization of canine prostatic carcinoma and correlation with castration status and castration time. *Vet Comp Oncol* 2003;1:48-56.
- Michel KE et al. Evaluation of body condition and weight loss in dogs presented to a veterinary oncology service. *J Vet Intern Med* 2004;18:692-5.
- Messinger JS et al. Ionized hypercalcemia in dogs: a retrospective study of 109 cases (1998-2003). *J Vet Intern Med* 2009;23:514-9.
- Laurenson MP et al. Concurrent diseases and conditions in dogs with splenic vein thrombosis. *J Vet Intern Med* 2010;24(6):1298-304.

POINTS CLÉS

- Le dépistage précoce d'un cancer est une priorité en oncologie.
- Le bilan de santé et notamment la détection de comorbidités permettront une prise en charge oncologique plus rapide et efficace avec en particulier la mise en place de traitements adaptés en amont des traitements oncologiques.
- L'imagerie est une étape indispensable pour le diagnostic et le bilan d'extension.
- Des prélèvements cytologiques ou histologiques réalisés précocement permettront de poser le diagnostic et d'orienter les examens complémentaires à proposer.
- L'explication de ces étapes au propriétaire est importante pour la compréhension des examens proposés et de la stratégie thérapeutique.

Le bilan d'extension en cancérologie

The extension assessment in oncology

Magali Ruiz

Eiffelvet, Paris.

MOTS-CLÉS

Tumeur
Métastase
Nœud lymphatique
Dissémination
Scanner

Keywords

Tumour
Metastasis
Lymph node
Dissemination
Scanner



Référence de l'article :
Méd Chir Anim – Anim Cie
2023;6:20-5.

RÉSUMÉ

Le bilan d'extension permet d'identifier les données cliniques et biologiques en amont de la prise en charge d'un patient atteint d'un cancer : son état de santé global, ses comorbidités éventuelles, et l'extension du cancer à l'échelle locale, locorégionale et à distance (TNM). Ce bilan nécessite des examens d'imagerie (scanner, notamment) et des prélèvements cytologiques ou histologiques des nœuds lymphatiques locorégionaux et des lésions primitives ou suspectes d'être métastatiques. Nous l'illustrerons par 2 exemples : le bilan d'extension d'un ostéosarcome appendiculaire et celui d'un lymphome multicentrique.

SUMMARY

The extension assessment allows to identify the clinical and biological data upstream of the care of a patient care with cancer: his overall state of health, his possible comorbidities, and the extension of the cancer at the local, locoregional and remote scale (TNM). This assessment requires imaging examinations (especially CT) and cytological or histological samples from locoregional lymph nodes and primary lesions or lesions suspected of being metastatic. We will illustrate this with two examples: the extension assessment of an appendicular osteosarcoma and a multicentric lymphoma.

La réalisation d'un bilan d'extension complet a pour objectif de réunir l'ensemble des informations nécessaires à la bonne prise en charge du patient en cancérologie. Nous détaillerons ici les modalités de mise en œuvre de cette étape essentielle, sans laquelle tout traitement pourrait être voué à l'échec, puis nous l'illustrerons par 2 exemples pratiques: le bilan d'extension d'un ostéosarcome appendiculaire et celui d'un lymphome multicentrique.

Modalités de mise en œuvre d'un bilan d'extension

Évaluer l'état de santé global du patient cancéreux

L'évaluation préalable de l'état de santé global du patient atteint d'un cancer est primordiale, notamment dans un contexte préanesthésique

en vue d'un scanner, ou avant d'envisager une chimiothérapie (en particulier, évaluation des fonctions rénale et hépatique, bilan hématologique). La recherche d'éventuels syndromes paranéoplasiques est par ailleurs importante en termes pronostiques. Ainsi, on recommandera a minima la réalisation d'un examen biochimique complet avec ionogramme (incluant la calcémie), d'une analyse d'urine et d'une numération-formule sanguine.

Évaluer la progression du cancer

Le bilan d'extension permet ensuite d'appréhender l'extension du cancer à l'échelle locale, locorégionale et à distance. La dissémination métastatique peut s'effectuer selon 2 voies [1]:

- la voie lymphatique, la plus fréquente, à l'origine d'une extension métastatique à hauteur des nœuds lymphatiques locorégionaux, des séreuses et des poumons;

- et la voie hématogène, dont les sites préférentiels de dissémination sont le foie, les poumons, le cerveau et les os.

Le bilan d'extension doit impérativement être mis en œuvre en amont de toute prise en charge thérapeutique, notamment chirurgicale ou par radiothérapie, afin de déterminer si le traitement sera à "visée palliative" (bilan d'extension positif) ou "à visée curative" (bilan d'extension négatif).

Examens d'imagerie

La mise en œuvre d'un bilan d'extension fait avant tout appel à des examens d'imagerie. Le scanner est à privilégier, notamment par rapport à l'IRM, pour sa polyvalence (examen des tissus mous, des os et des poumons), un temps anesthésique plus court, et sa supériorité topographique (examen des zones anatomiques difficiles d'accès, telles que le crâne, la région cervicale ventrale ou la filière pelvienne).

À défaut, si l'anesthésie est jugée trop risquée, des radiographies thoraciques (1 face + 2 profils) associées à une échographie abdominale peuvent être envisagées. La recherche radiographique des métastases pulmonaires est toutefois moins sensible, ne permettant d'identifier que les métastases pulmonaires supérieures ou égales à 7 mm de diamètre contre 1 mm de diamètre au scanner [2], certaines métastases, quelle que soit leur taille, ne pouvant être identifiées autrement en raison d'un effet de superposition des structures thoraciques. La radiographie thoracique peut néanmoins être un examen intéressant en amont du scanner, afin de s'assurer que le patient ne présente pas de dissémination métastatique "en lâcher de ballons" avant que le propriétaire ne s'engage dans des examens plus poussés. De même, l'examen échographique est limité par les interfaces osseuses ou aériques (thorax et filière pelvienne, notamment) et la difficulté à déterminer l'origine topographique des volumineuses masses abdominales.

Prélèvements pour examens cytologiques ou histologiques

Des prélèvements cytologiques ou histologiques (possiblement échoguidés) des nœuds lymphatiques locorégionaux et des lésions suspectes

à l'imagerie sont ensuite réalisés. L'intérêt du scanner dans ce contexte est d'optimiser la significativité des prélèvements afin d'éviter des zones nécrotiques ou kystiques au contenu liquidien (par comparaison avec des prélèvements à l'aveugle).

Les prélèvements ganglionnaires sont, par exemple, particulièrement indiqués dans le cas des tumeurs buccales, où les nœuds lymphatiques locorégionaux sont souvent multiples, difficiles à palper et non spécifiques à l'examen clinique (ganglions métastatiques ou réactionnels consécutifs à une gingivite, otite, etc.), avec jusqu'à près de 40 % de métastases ganglionnaires controlatérales dans certaines séries de la littérature [3].

Par ailleurs, les cytoponctions échoguidées hépatospléniques doivent être réalisées systématiquement en cas de mastocytome ou de lymphome, afin d'objectiver la présence éventuelle d'une infiltration néoplasique diffuse non identifiable à l'imagerie.

Schéma général du bilan d'extension en médecine vétérinaire

En s'appuyant sur le système de classement TNM [4], abréviation pour taille de la tumeur-nœuds lymphatiques-métastases à distance, établi par l'OMS pour chaque type de cancer afin d'homogénéiser les études et les prises en charge, la mise en œuvre d'un bilan d'extension en médecine vétérinaire pourra donc être schématisée comme dans le [tableau I, p. 22](#).

Exemples de mise en œuvre

Ostéosarcome appendiculaire

L'ostéosarcome appendiculaire est une tumeur agressive localement ([figure 3, p. 22](#)), intéressant le plus souvent la métaphyse des os longs, notamment le radius distal, l'humérus proximal, le fémur distal ou le tibia proximal [5], au fort potentiel métastatique. Les poumons ([figure 4, p. 22](#)) et les os constituent les sites de dissémination métastatique préférentiels, mais les nœuds lymphatiques, les organes viscéraux, le cerveau et le tissu sous-cutané peuvent également être concernés.

Tableau I. Schéma général du bilan d'extension d'une tumeur en médecine vétérinaire.

Étape du bilan d'extension	Pourquoi ?	Comment ?
1. Extension locale T	Connaître le caractère infiltrant ou non, plus ou moins vascularisé, et possiblement nécrotique de la lésion, ses marges, ainsi que son rapport avec les structures adjacentes (exemples figures 1 et 2)	Imagerie (scanner, à défaut radiographie ou échographie selon la localisation lésionnelle)
2. Extension locorégionale N	Connaître le caractère métastatique ou non des nœuds lymphatiques locorégionaux	Imagerie (aspect souvent hypertrophié, hétérogène ou hyperdense au scanner des nœuds lymphatiques métastatiques) + cytoponction ou biopsie des nœuds lymphatiques locorégionaux
3. Extension à distance M	Évaluer l'éventuelle présence de métastases dans le reste de l'organisme (poumons, foie, rate, os, muscles, tissu cutané ou sous-cutané, voire système nerveux central selon la tumeur primitive)	Imagerie (scanner, à défaut radiographie ou échographie selon la localisation lésionnelle) + cytoponction ou biopsie des lésions suspectes ± ponction de moelle (mastocytomes et lymphomes, surtout face à une anomalie de la formule sanguine)

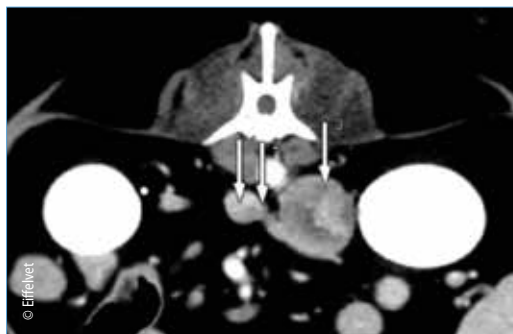


Figure 1. Tumeur surrénalienne avec embolie vasculaire au sein de la veine rénale et de la veine cave chez un chien.

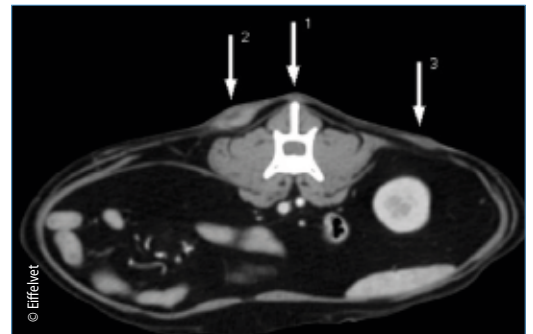


Figure 2. Fibrosarcome affleurant au contact direct de la musculature dorsale et du processus épineux de la 5^e vertèbre lombaire chez un chat.



Figure 3. Ostéosarcome huméral chez un chien.



Figure 4. Métastases pulmonaires en "lâcher de ballons" chez un chien atteint d'ostéosarcome huméral.

Face à une suspicion ou à un diagnostic d'ostéosarcome appendiculaire (par prélèvement cytologique ou histologique avec une sensibilité

équivalente de 83 % [6]), le bilan d'extension peut être réalisé comme sur la figure 5 et les vidéos 1-3.

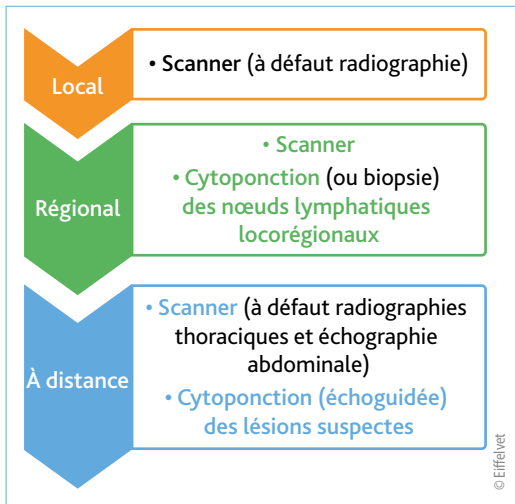


Figure 5. Proposition de bilan d'extension pour la prise en charge de l'ostéosarcome appendiculaire.

Lymphome multicentrique

Le lymphome multicentrique, caractérisé par une prolifération tumorale lymphocytaire dans les nœuds lymphatiques (figure 6), le foie et la rate (figure 7), voire le système nerveux central, la moelle osseuse et les tissus cutanés et

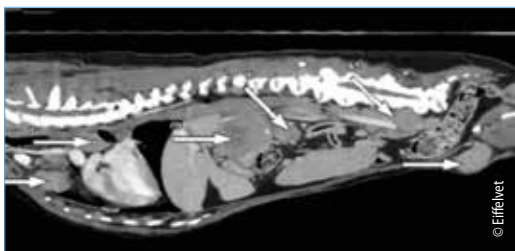
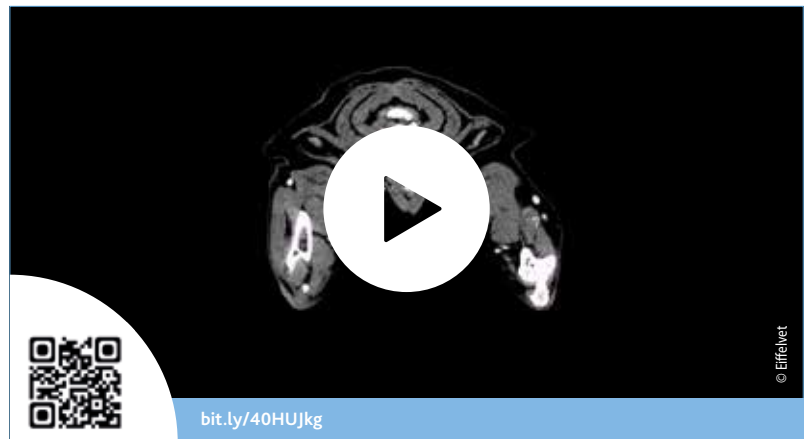


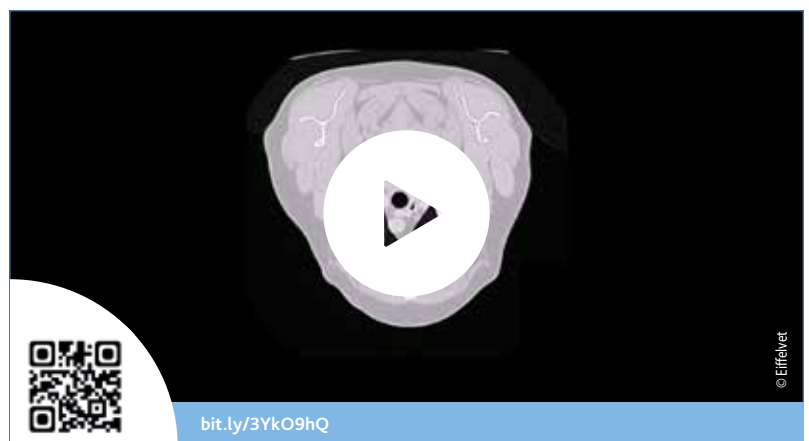
Figure 6. Polyadénomégalie sévère chez un chien atteint d'un lymphome multicentrique.



Figure 7. Splénomégalie au parenchyme "léopardé" ou en "nid d'abeille" chez un chien atteint d'un lymphome multicentrique.



Vidéo 1. Exemple de scanner thoraco-abdomino-pelvien pour le bilan d'extension d'un ostéosarcome huméral : fenêtre tissus mous.



Vidéo 2. Exemple de scanner pulmonaire pour bilan d'extension d'un ostéosarcome huméral.

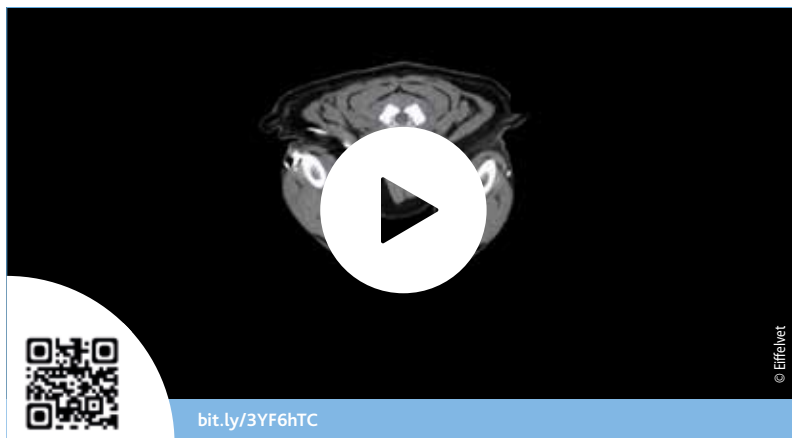


Vidéo 3. Exemple de scanner TAP (thorax-abdomen-pelvis) pour le bilan d'extension d'un ostéosarcome huméral : fenêtre os.

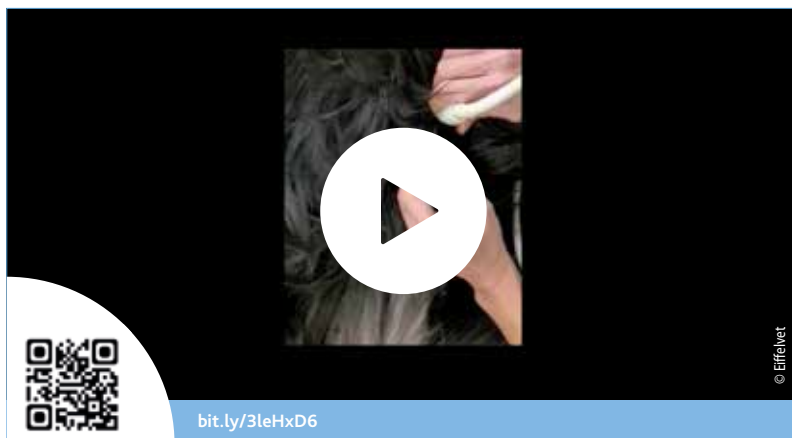
Local, régional
et à distance

- Numération-formule (anémie non régénérative, thrombopénie, leucocytose neutrophilique, blastes lymphoïdes circulants)
- Scanner (à défaut radiographies thoraciques et échographie abdominale)
- Cytoponction (ou biopsie) des adénomégalias (éviter les nœuds lymphatiques sous-mandibulaires, souvent nécrotiques)
- Cytoponction foie/rate systématique car possible infiltration non identifiable à l'imagerie
 - ± Ponction de moelle osseuse

Figure 8. Proposition de bilan d'extension pour la prise en charge du lymphome multicentrique.



Vidéo 4. Exemple de scanner thoraco-abdomino-pelvien pour le bilan d'extension d'un lymphome multicentrique : fenêtre tissus mous.



Vidéo 5. Réalisation de cytoponctions hépatiques échoguidées pour le bilan d'extension d'un lymphome multicentrique.

sous-cutané, est la tumeur hématopoïétique la plus fréquente chez le chien. La cytologie est l'examen de choix en 1^{re} intention et permet de diagnostiquer la majorité des lymphomes de haut grade.

La réalisation d'une analyse histologique complémentaire est toutefois recommandée afin de préciser le sous-type du lymphome (B le plus souvent, ou T) et son grade (pour les lymphomes de bas grade, notamment), en permettant également la mise en œuvre d'immunomarquages et du dosage du Ki67.

Dans certains cas, l'immunophénotypage peut également être effectué à partir d'un examen cytologique analysé en cytométrie de flux [7].

Pour le lymphome, peuvent également être réalisés un bilan hématobiochimique, le dosage du calcium ionisé et des marqueurs de l'inflammation, tels que les D-dimères, la thymidine kinase, la protéine C réactive (chez le chien) et la protéine sérum amyloïde A (SAA) (chez le chat).

Tableau II. Stades cliniques du lymphome (classification OMS), d'après L.N. Owen [4].

Stade clinique	Caractéristiques
I	Atteinte limitée à un seul nœud lymphatique ou au tissu lymphoïde d'un seul organe (mis à part la moelle osseuse)
II	Atteinte de plusieurs nœuds lymphatiques régionaux (d'un côté du diaphragme) ± amygdales
III	Atteinte généralisée des nœuds lymphatiques (des 2 côtés du diaphragme) (figure 6, p. 23)
IV	Atteinte hépatique et/ou splénique (figure 7, p. 23)
V	Envahissement du système nerveux central ou de la moelle osseuse (manifestation possible dans le sang périphérique)
Sous-stade	
a	Absence de signe clinique lié au cancer
b	Présence de signe(s) clinique(s) lié(s) au cancer

Contrairement aux tumeurs solides, la notion de métastase est impropre en cas de lymphome, et le bilan d'extension du lymphome peut être réalisé comme sur la **figure 8** et les **vidéos 4 et 5**.

Dans le cas particulier du lymphome, le stade est déterminé comme dans le **tableau II**.

En connaissant le stade clinique initial du lymphome, la réalisation d'un bilan d'extension complet en amont du traitement permettra donc a posteriori d'évaluer l'efficacité de la chimiothérapie mise en œuvre. Il est ainsi recommandé d'effectuer un scanner thoraco-abdomino-pelvien avant et après la réalisation de 2 cycles de chimiothérapie.

Conclusion

La réalisation d'un bilan d'extension complet et adapté à chaque cancer est donc primordiale afin de déterminer le stade clinique de la maladie, d'adapter la prise en charge thérapeutique à

venir, de suivre l'évolution de la maladie, et d'évaluer l'efficacité du traitement mis en place. ●

Magali Ruiz déclare ne pas avoir de liens d'intérêts en relation avec cet article.

POINTS CLÉS

- Le bilan d'extension doit être mis en œuvre en amont de toute prise en charge thérapeutique du patient en oncologie.
- Il nécessite des examens d'imagerie (scanner le plus souvent) et des prélèvements cytologiques ou histologiques des nœuds lymphatiques locorégionaux et des lésions primitives ou suspectes d'être métastatiques.
- Il permet de connaître le stade clinique du cancer, d'adapter la prise en charge initiale, et d'assurer le suivi thérapeutique (mise en maladie résiduelle?, suivi post-rémission éventuelle).

Références bibliographiques

1. Robert J. Biologie de la métastase. *Bull Cancer* 2013;100(4):333-42.
2. Nematic S et al. Comparison of thoracic radiographs and single breath-hold helical CT for detection of pulmonary nodules in dogs with metastatic neoplasia. *J Vet Intern Med* 2006;20(3):508-15.
3. Donaduzzi LC et al. Occurrence of contralateral lymph neck node metastasis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Clin Exp Dent* 2014;6(3):e209-13.
4. Owen LN. TNM classification of tumours in domestic animals. *WHO* 1980.
5. Fenger JM et al. Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology. *ILAR J* 2014;55(1):69-85.
6. Sabattini S et al. Comparative assessment of the accuracy of cytological and histologic biopsies in the diagnosis of canine bone lesions. *J Vet Intern Med* 2017;31:864-71.
7. Comazzi S, Gelain ME. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Vet J* 2011;188(2):149-55.

Votre soutien est indispensable à la vie de la revue

Abonnez-vous page 4

L'identification tumorale: cytologie, cytométrie en flux, histologie et immunohistochimie

Tumor identification: cytology, flow cytometry, histology and immunohistochemistry

Ingrid Bemelmans

Cerba Vet, Massy.

MOTS-CLÉS

Cytologie
Cytométrie en flux
Histologie
Immunohistochimie
Typage de tumeur
Immunotype de lymphome

Keywords

Cytology
Flow cytometry
Histology
Immunohistochemistry
Tumor nature identification
Lymphoma immunophenotype



Référence de l'article :
Méd Chir Anim – Anim Cie
2023;6:26-31.

RÉSUMÉ

Différentes analyses de laboratoire pourront être utilisées pour diagnostiquer un cancer chez un patient. Il s'agit d'analyses cytologiques et/ou histologiques (biopsie ou pièce opératoire) qui pourront être complétées par des analyses de type cytométrie en flux et immunohistochimie afin de préciser la nature de la tumeur, chaque type de tumeur ayant un pronostic et une thérapie spécifiques. La collaboration entre le vétérinaire praticien et le pathologiste est la clé d'une prise en charge optimale de l'animal.

SUMMARY

Different laboratory tests can be used to diagnose a patient with cancer. Cytology and/or histology (biopsy or surgical specimen) which may be supplemented by flow cytometry and immunohistochemistry in order to specify the nature of the tumour can be proposed, each type of tumor having a specific prognosis and therapy. Collaboration between the veterinary practitioner and the pathologist is the key to optimal care of the animal.

Lors de la prise en charge d'un patient avec suspicion de cancer, l'examen anatomocytopathologique constitue, avec les examens cliniques et d'imagerie médicale, une des étapes indispensables à l'établissement du diagnostic. Il permet de déterminer toutes les caractéristiques d'une tumeur: sa nature exacte, son risque de récurrence locale et de métastases. En médecine humaine, tout diagnostic histologique de cancer est accompagné d'analyses immunohistochimiques et le plus souvent d'analyses génomiques en vue d'une approche thérapeutique personnalisée. De même, en médecine vétérinaire, le pathologiste pourra proposer des analyses complémentaires de type immunohistochimie et de biologie moléculaire en fonction des données de la littérature et de ses hypothèses morphologiques. Une collaboration étroite entre le vétérinaire praticien et le pathologiste est indispensable au succès de la prise en charge de l'animal.

Cytologie

L'examen cytologique consiste à analyser au microscope optique un prélèvement, obtenu par ponction à l'aiguille fine, d'un organe ou de tissu, un liquide de ponction (liquides d'épanchements, liquide cérébrospinal, etc.), du sang ou de la moelle osseuse (vidéo 1). Les prélèvements sont étalés sur une lame et colorés. Il s'agit d'une méthode simple, non invasive, peu coûteuse et qui permet d'obtenir un résultat rapidement. Elle sera généralement effectuée en première intention afin de distinguer une lésion inflammatoire d'une tumeur, de préciser la nature d'une tumeur le cas échéant et de réaliser un bilan d'extension (ponction des nœuds lymphatiques, foie, rate, moelle osseuse).

La qualité du résultat sera inhérente à :

- la quantité de matériel ponctionné : les tumeurs à cellules rondes (lymphome, mastocytome, plasmocytome, etc.) et les tumeurs épithé-

liales exfolient plus facilement que les tumeurs mésoenchymateuses (sarcomes) dont le résultat pourra être plus équivoque ;

- la préservation cellulaire: les cytoponctions réalisées au sein de foyers de nécrose intratumorale ou avec une aspiration trop importante fragilisant les cellules pourront être non contributives ;
- la qualité de la coloration: la coloration standard et optimale la plus utilisée en laboratoire est le May-Grünwald Giemsa. Des colorations rapides de type RAL 555 ou Diff-Quik® sont utilisées par les praticiens au chevet du patient. Il conviendra de respecter les temps de coloration et d'entretenir les colorants (changement des bains régulièrement, stockage à l'abri de la lumière, etc.) afin de garantir une coloration satisfaisante. Il est également impératif de ne pas mettre en contact des lames de cytologie et des vapeurs de formol (transport séparé des prélèvements pour analyse cytologique et flacons de formol) au risque d'altérer la coloration des cellules et de rendre l'examen non conforme (figure 1) ;
- la représentativité de la ponction: il conviendra de garder en mémoire que la ponction peut être réalisée dans une région non représentative de la lésion. En cas de discordance entre le résultat d'analyse et le contexte clinique, de nouvelles ponctions ou d'autres prélèvements histologiques seront à considérer.

Bien que des critères de malignité puissent être identifiés, l'analyse cytologique, contrairement à l'analyse histologique, ne permettra pas de préciser avec certitude le grade de la tumeur. Quatre grandes catégories de tumeurs seront distinguées à l'examen cytologique (figure 2). Les tumeurs dites à cellules rondes seront caractérisées par des frottis riches en cellules de forme ronde et disjointes. En fonction de leur morphologie, on distinguera les lymphomes (à petites,



Vidéo 1. Cytologie d'un lymphome.

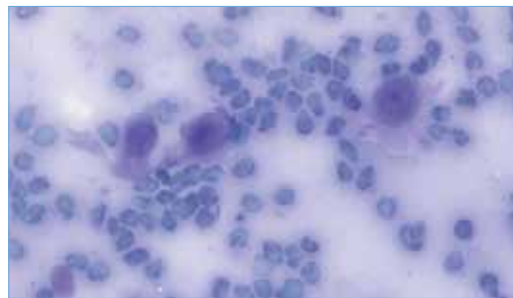


Figure 1. Altération de la qualité de la coloration due au contact du prélèvement cytologique avec des vapeurs de formol: coloration vert-bleu des hématies et faible distinction des détails cellulaires.

moyennes, grandes cellules) (vidéo 1), les mastocytomes, les plasmocytomes, les mélanomes et les tumeurs histiocytaires. Les tumeurs épithéliales se caractérisent par des amas de cellules cohésives de morphologie variable selon l'origine tissulaire (carcinome pulmonaire, mammaire, urothélial, etc.). Les sarcomes sont généralement moins denses en cellules de forme fusiforme, à limites floues, au noyau allongé. Enfin, les tumeurs de type endocrine ou neuroendocrine (tumeur thyroïdienne, surrénalienne, paragangliome, etc.)

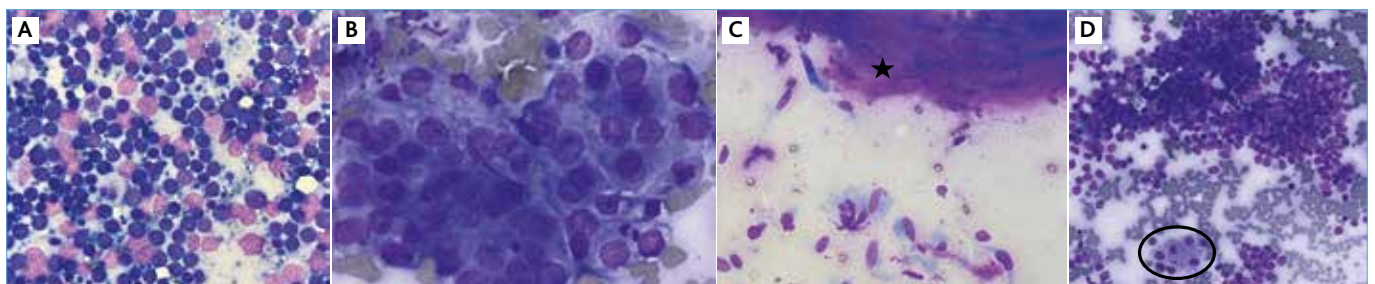


Figure 2. A. Lymphome ganglionnaire à moyennes et grandes cellules chez un chien. B. Carcinome pulmonaire chez un chat. C. Sarcome des tissus mous chez un chien (étoile: matrice collagénique). D. Carcinome neuroendocrine hépatique métastatique chez un chien (rond: amas d'hépatocytes).

se caractérisent par des frottis riches en noyaux nus avec population abondante de cellules isolées ou en amas, au noyau rond, peu atypiques.

Des analyses immunocytochimiques peuvent être réalisées à partir de prélèvements cytologiques. Elles peuvent être effectuées à partir d'étalements directs sur lames dédiées aux analyses immunocytochimiques (lames chargées). Cette méthode sera principalement utilisée dans le cadre de l'immunophénotypage des lymphomes. La qualité du résultat dépendra de la densité des frottis et de la préservation des cellules sur tous les frottis analysés. Plus récemment, des techniques de type Cytoblock™ permettant d'inclure en paraffine des prélèvements cytologiques ont aussi été décrites, mais peu ou non utilisées en routine en médecine vétérinaire.

Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique d'analyse cellulaire réalisée à partir de liquides : sang, ponction de moelle osseuse, ponction ganglionnaire, liquide d'épanchement, etc., en complément d'une analyse cytologique. Elle permet de caractériser et compter des cellules en suspension dans un flux liquidien. L'interaction des éléments avec la lumière émise par une ou plusieurs sources lumineuses permet de caractériser les cellules selon différents critères tels que la taille, la granularité ou l'expression de protéines de surface révélées par un fluorochrome couplé à un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène de surface d'intérêt. Les cellules étant fragiles, l'analyse doit être réalisée 24 heures maximum après le prélèvement. Cette technique aura principalement des applications en héματο-oncologie. À titre d'exemple, elle pourra être couplée à l'analyse cytologique des lymphomes ganglionnaires canins afin d'en préciser la lignée cellulaire (B, T ou cellules *Natural Killer*), le pronostic et la thérapeutique mise en œuvre étant dépendants du sous-type de lymphome [1]. Les lymphomes B ganglionnaires de haut grade canins sont, de manière générale, de meilleur pronostic et répondent mieux à la chimiothérapie cytotoxique que les lymphomes T. La cytométrie en flux permet également de différencier une leucémie aiguë d'une leucémie chronique chez le chien et d'identifier la lignée cellulaire tumorale (lignée myéloïde, lymphoïde ou non différenciée). Le pronostic des leucémies

lymphoïdes chroniques sera variable en fonction de l'origine de la lignée : les médianes de survie des leucémies lymphoïdes chroniques de type T, B ou atypiques sont de 2,5 ans, 1 an et 22 jours, respectivement [2].

Histologie

L'examen histologique consiste à analyser au microscope optique un prélèvement de tissu (biopsie ou pièce opératoire) fixé dans le formol. L'examen histologique sur biopsies offre les mêmes avantages que l'examen cytologique. Il s'agit d'une méthode simple, rapide et peu invasive. Elle permet également d'estimer le grade d'une tumeur en évaluant, en fonction du type tumoral, l'architecture, les atypies cytonucléaires, l'activité mitotique et la présence de nécrose intratumorale. Le grade d'une tumeur dépendra néanmoins de la représentativité de la biopsie analysée. De même, pour certains types de lymphomes, les biopsies ganglionnaires peuvent être insuffisantes, l'observation de l'architecture globale du ganglion étant nécessaire pour l'établissement du diagnostic du lymphome, donc la précision du pronostic et de la thérapeutique associée. Ce sera le cas, par exemple, des lymphomes folliculaires, des lymphomes de la zone marginale, des lymphomes du manteau ou de certains lymphomes à grandes cellules B riches en cellules T. Les analyses complémentaires de type immunohistochimie et de biologie moléculaire seront aussi facilitées en raison de la quantité de matériel plus importante que dans le cas de prélèvements cytologiques ainsi que l'uniformité de l'échantillon, l'ensemble des anticorps en analyses immunohistochimiques sera en effet testé à partir du même échantillon biologique.

La qualité d'un examen histologique d'une pièce opératoire commencera impérativement par un respect des conditions préanalytiques d'envoi au laboratoire, un examen macroscopique précis et un protocole standardisé de recoupes du prélèvement selon les recommandations de la littérature [3].

Conditions préanalytiques :

- les prélèvements doivent être placés dans leur intégralité dans un flacon de formol adapté à la taille du prélèvement. Le pathologiste pourra ainsi fournir une analyse la plus précise possible

du prélèvement (taille de la pièce opératoire, analyses des marges d'exérèse). On évitera aussi un mauvais échantillonnage de la lésion soumise au laboratoire qui pourrait conduire à une erreur diagnostique ou à un diagnostic incertain (par exemple: région hémorragique d'un hémangiosarcome splénique non présent sur l'échantillon soumis à analyse);

- les prélèvements ne doivent pas être sectionnés afin de faciliter l'examen macroscopique au laboratoire;
- les prélèvements peuvent être orientés à l'aide de fils de suture afin de permettre au pathologiste de préciser la qualité et la nature des marges d'exérèse dans les différents plans;
- les prélèvements doivent être identifiés en cas de localisation différente.

À réception au laboratoire, la première étape de l'analyse anatomopathologique consiste en une description macroscopique des pièces opératoires (taille, aspect macroscopique), suivie de la réalisation de sections multiples les plus représentatives de la lésion. Les marges d'exérèse seront encrées afin de les identifier sur lames histologiques (figure 3).

L'ensemble des sections réalisées macroscopiquement sera ensuite examiné en microscopie optique, après inclusion en paraffine, coupe du tissu à 3 ou 4 microns d'épaisseur et coloration de type hématoxyline-éosine. L'analyse histologique de la pièce d'exérèse va permettre d'observer l'architecture de la tumeur et ses relations avec les tissus environnants, de décrire la morphologie des cellules et de rechercher des critères de malignité et d'agressivité (atypies cytonucléaires, nombre de mitoses, nécrose intratumorale, présence d'embolus vasculaires). L'ensemble de ces critères permettra au pathologiste d'orienter son diagnostic

morphologique. Il précisera également la nature (tissu adipeux, tissu musculaire, etc.) et la taille des marges d'exérèse, informations indispensables pour l'évaluation du risque de récurrence locale. À titre d'exemple, dans le cas d'un fibrosarcome félin, une marge profonde de nature musculaire non infiltrée par la tumeur constituera un critère pronostique plus favorable qu'une marge de nature adipeuse.

La description des lésions et leur interprétation par le pathologiste feront l'objet d'un compte-rendu. Plusieurs études menées en oncologie vétérinaire ont montré une discordance de diagnostic entre pathologistes pouvant avoir une incidence sur le pronostic et le traitement dans 37,0 % [4] et 38,5 % des cas [5]. Lors de discordance entre vos hypothèses cliniques et le diagnostic histologique, une relecture et une demande de seconde opinion pourront être envisagées.

Immunohistochimie

Principe

Une analyse immunohistochimique consiste à rechercher la présence d'une protéine d'intérêt à la surface, dans le cytoplasme ou le noyau de cellules grâce à des anticorps spécifiques. Le couple antigène-anticorps est visualisé sur coupes histologiques via une réaction enzymatique (technique utilisée le plus souvent en laboratoire de diagnostic) ou un fluorochrome. La localisation, l'intensité du marquage ainsi que le pourcentage de cellules positives sont interprétés par le pathologiste et vont orienter son diagnostic. Plusieurs applications sont décrites en médecine vétérinaire à la fois diagnostiques afin de préciser la nature d'une tumeur ainsi que le phénotype de lymphome et pronostiques, ces

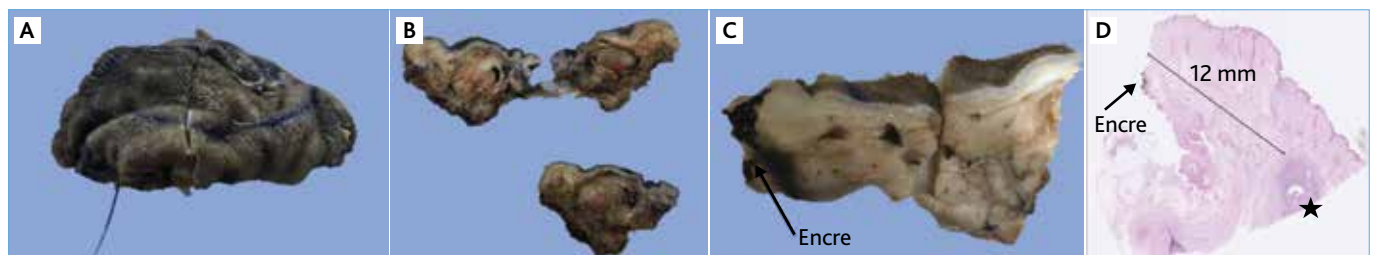


Figure 3. Examen macroscopique et sections d'un sarcome des tissus mous en région dorsale. **A.** Sections de la pièce opératoire en croix (marges latérales crâniocaudales, gauche et droite). **B.** Vue des sections passant par la masse avec identification des marges latérales et profondes. **C.** Encre apposée à la marge latérale. **D.** Vue à faible grossissement en microscopie optique : encre visualisée en marge latérale (flèche) ; mesure d'une marge latérale : distance entre la tumeur (étoile) et la marge encrée : 12 mm.

dernières seront discutées dans l'article "Biomarqueurs tumoraux" (p. 36).

Préciser la nature d'une tumeur

Comme discuté précédemment, le pathologiste analyse, à l'examen microscopique, l'architecture de la tumeur ainsi que la morphologie des cellules afin de conclure à un diagnostic morphologique. Celui-ci peut être non équivoque ou nécessiter des investigations complémentaires afin de préciser la nature de la population tumorale. Un panel d'anticorps sera proposé en fonction des hypothèses morphologiques : anticorps spécifiques de cellules lymphoïdes (CD3, CD20, PAX5), macrophagiques (CD204, CMH2, CD18, Iba1, etc.), cellules de Langerhans (E-cadhérine), mastocytaires (CD117), mélanocytaires (Melan-A, PNL2, PS100), plasmocytaires (MUM-1), épithéliales (CK AE1/AE3), vasculaires (CD31), endocrines (chromogranine, synaptophysine), musculaires (desmine, actine), etc. Une connaissance la plus précise possible de la nature d'une tumeur est indispensable pour évaluer le pronostic du patient et mettre en place un protocole de prise en charge adapté : bilan

d'extension et thérapie adjuvante (radiothérapie, chimiothérapie, immunothérapie, etc.). À titre d'exemple, une analyse immunohistochimique sera conseillée en cas de tumeurs à cellules rondes peu différenciées afin de distinguer un mastocytome agranuleux d'un sarcome histiocyttaire ou d'un plasmocytome, notamment. Dans le cas d'une tumeur intestinale à cellules fusiformes, le léiomyosarcome pourra être distingué d'une tumeur stromale gastro-intestinale : expression des antigènes actine et desmine pour les léiomyosarcomes et Kit pour les tumeurs stromales gastro-intestinales. Ces dernières pourront faire l'objet d'un traitement adjuvant de type inhibiteur de tyrosine kinase.

Préciser l'immunotype d'un lymphome

La classification de l'OMS des lymphomes canins [6] est basée sur des critères morphologiques (architecture, taille des cellules), sur l'activité proliférative (bas grade ou haut grade) et sur l'immunophénotype (lymphome B ou T) (figure 4) (vidéo 2). Le pronostic et la prise en charge du patient (bilan d'extension, protocole

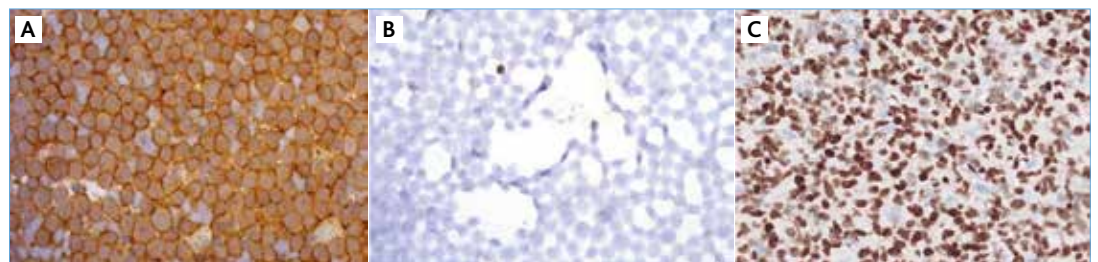


Figure 4. Profil immunohistochimique d'un lymphome ganglionnaire d'immunophénotype B canin. A. Expression membranaire diffuse d'intensité forte de l'antigène CD20 (marqueur de lymphocytes B). B. Absence d'expression de l'antigène CD3 (marqueur de lymphocytes T). C. Expression nucléaire d'intensité forte de l'antigène PAX 5 (marqueur de lymphocytes B).

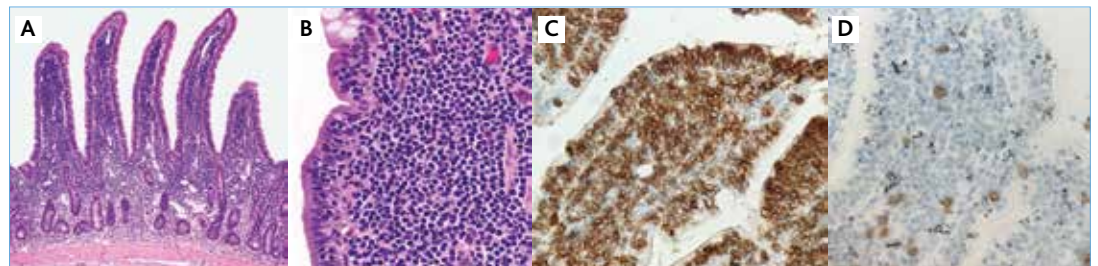


Figure 5. Lymphome intestinal à petites cellules chez un chat. A. Infiltration de la muqueuse intestinale par une population de petits lymphocytes (coloration HES). B. Abondants petits lymphocytes infiltrant une villosité intestinale avec épithéliotropisme pour l'épithélium villositaire (coloration HES). C. Lymphocytes exprimant majoritairement l'antigène CD3 (lymphocytes d'immunophénotype T) avec épithéliotropisme marqué pour l'épithélium villositaire. D. Rares lymphocytes exprimant l'antigène CD20 (lymphocytes d'immunophénotype B).

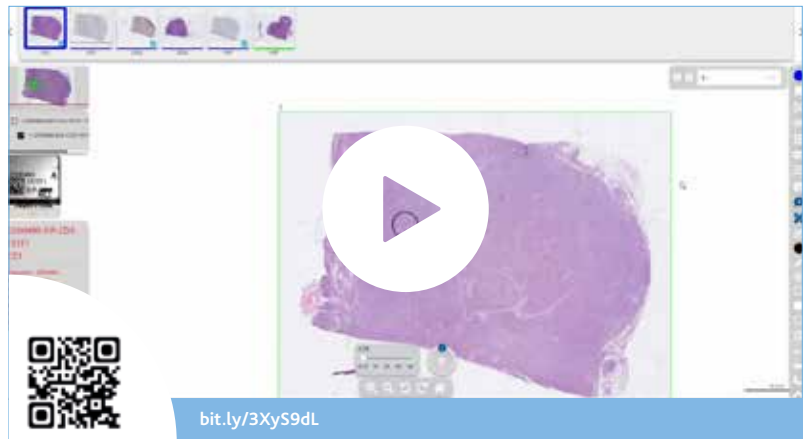
de chimiothérapie, suivi thérapeutique) vont dépendre du type de lymphome. Un lymphome ganglionnaire indolent ou de bas grade chez le chien montre une médiane de survie de 21 à 33 mois contre 2 mois pour ceux de haut grade sans traitement. Le traitement de choix sera aussi adapté: prednisolone et chlorambucil pour les lymphomes de bas grade et polychimiothérapie cytotoxique pour ceux de haut grade.

Chez le chat, le diagnostic différentiel de l'entéropathie chronique et du lymphome intestinal à petites cellules T de bas grade constitue un défi diagnostique. En effet, ces 2 entités partagent les mêmes signes cliniques (perte de poids, vomissements, anorexie, diarrhée), et résultats d'examen clinique et d'imagerie médicale (épaississement diffus de l'intestin à l'examen échographique). Le diagnostic du lymphome intestinal à petites cellules T de bas grade félin repose sur des critères histologiques et immunohistochimiques sur biopsies. En effet, la proportion de lymphocytes T (significativement plus élevée chez les chats atteints de lymphome que chez les chats atteints d'entérite) ainsi que leur distribution (infiltration de l'épithélium des villosités intestinales par des lymphocytes T: épithéliotropisme) sont des critères diagnostiques du lymphome (figure 5) [7, 8]. D'autres examens immunohistochimiques (index de prolifération Ki67) et de biologie moléculaire (test de clonalité lymphoïde) sont aussi décrits dans la littérature comme des critères pouvant permettre de discriminer ces 2 entités et seront discutés dans l'article "Biomarqueurs tumoraux" (p. 36).

Conclusion

Diverses analyses de laboratoire pourront être réalisées en complément des examens cliniques et d'imagerie médicale pour diagnostiquer un cancer chez l'animal. Il s'agira de la cytologie, de l'anatomopathologie sur biopsies ou pièces opératoires, ainsi que des analyses complémentaires de type cytométrie en flux (sur matériel liquide) et immunocytohistochimie. Le dialogue entre le vétérinaire praticien et le pathologiste est indispensable dans le choix des analyses les plus adaptées dans un contexte clinique spécifique à chaque patient. ●

Ingrid Bemelmans déclare exercer au sein d'un laboratoire réalisant des analyses d'anatomocytopathologie.



Vidéo 2. Histologie d'un lymphome.

POINTS CLÉS

- Différents types d'analyses de laboratoire peuvent être utilisés pour diagnostiquer un cancer : cytologie, cytométrie en flux, histologie et immunohistochimie.
- Il est important de connaître les avantages et les limites de chaque analyse.
- La cytologie et l'analyse histologique sur biopsies sont des méthodes rapides, non invasives et peu coûteuses.
- La cytométrie en flux peut être utilisée sur matériel liquide afin de typer les lymphomes ganglionnaires et les leucémies chez le chien.
- Il est essentiel d'envoyer une pièce opératoire dans son intégralité pour analyse histologique.
- Des analyses immunohistochimiques complémentaires à une histologie peuvent permettre de préciser la nature d'une tumeur et de typer les lymphomes.
- Une collaboration et une communication étroites entre le vétérinaire praticien et le pathologiste sont indispensables à la prise en charge du patient cancéreux.

Références bibliographiques

1. Comazzi S, Gelain ME. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Vet J* 2011;188:149-55.
2. Comazzi S et al. Immunophenotype predicts survival in dogs with chronic lymphocytic leukemia. *J Vet Intern Med* 2011;25:100-6.
3. Kamstock DA et al. Recommended guidelines for submission, trimming, margin evaluation, and reporting of tumor biopsy specimens in veterinary surgical pathology. *Vet Pathol* 2011;48(1):19-31.
4. Regan RC et al. A prospective evaluation of the impact of second-opinion histopathology on diagnostic testing, cost and treatment in dogs and cats with cancer. *Vet Comp Oncol* 2015;13(2):106-16.
5. Laliberté SM et al. A retrospective comparison of first and second opinion histopathology with patient outcomes in veterinary oncology cases (2011-2019). *Vet Comp Oncol* 2022;20:198-206.
6. Valli VE et al. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet Pathol* 2011;48(1):198-211.
7. Moore PF et al. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality. *Vet Pathol* 2012;49(4):658-68.
8. Freiche V et al. Histopathologic, phenotypic, and molecular criteria to discriminate low-grade intestinal T-cell lymphoma in cats from lymphoplasmacytic enteritis. *J Vet Intern Med* 2021;35:2673-84.

Le nœud lymphatique sentinelle dans les tumeurs cutanées et sous-cutanées canines : comment le repérer, pour quelle significativité ?

The sentinel lymph node in canine cutaneous and subcutaneous tumors: how to spot it, for what significance?

Nora Bouhsina

Oniris, site de la Chantrerie, Nantes; Oncovet, Villeneuve-d'Ascq.

MOTS-CLÉS

Nœud lymphatique sentinelle
Métastases
Tumeurs cutanées
Lymphangiographie

Keywords

Sentinel lymph node
Metastasis
Cutaneous tumors
Lymphangiography



Référence de l'article :
Méd Chir Anim – Anim Cie
2023;6:32-5.

RÉSUMÉ

Cet article a pour objectif de présenter l'intérêt et les techniques de détection du nœud lymphatique sentinelle dans le cadre du bilan d'extension de tumeurs cutanées et sous-cutanées chez le chien.

SUMMARY

This article aims to present the interest and the detection of the sentinel lymph node in the evaluation of cutaneous and subcutaneous tumors in dogs.

Les tumeurs cutanées et sous-cutanées font partie des tumeurs canines les plus fréquentes et entre 20 et 40 % d'entre elles sont malignes. Parmi les tumeurs cutanées et sous-cutanées les plus représentées peuvent être cités le mastocytome (16,8-22,7 %) et le mélanome (5,6 %) [1, 2]. Elles touchent majoritairement les chiens âgés (8-10 ans), même si elles sont également observées chez des chiens d'âge moyen, avec une localisation préférentielle à la tête et aux membres. Ces tumeurs métastasent facilement, en particulier par voie lymphatique. Si la plupart du temps le nœud lymphatique (NL) drainant est celui qui est anatomiquement le plus proche, cela n'est pas systématique et l'identification du nœud lymphatique sentinelle est alors indiquée.

Définition du nœud lymphatique sentinelle

Le NL sentinelle est défini comme le premier NL drainant la région étudiée, qui est donc le premier susceptible d'être infiltré par des métastases de la tumeur. Son identification est primordiale puisque si son analyse (préférentiellement histologique) ne révèle pas de cellules métastatiques, une infiltration à distance dans d'autres organes cibles de la tumeur apparaît très peu probable. De plus, en médecine humaine, et il en va de même en médecine vétérinaire, la recherche du ou des NL sentinelles est essentielle pour planifier une exérèse du NL drainant lors d'une chirurgie oncologique (par exemple, mammectomie dans le cas d'une tumeur du sein). Elle permettrait de dimi-

nuer la morbidité et la douleur postopératoires ainsi que le risque de lymphœdème postchirurgical [3].

Le système lymphatique est anatomiquement complexe et présente une variabilité individuelle [4, 5]. Si une tumeur est latéralisée, il est logique de suspecter le NL locorégional ipsilatéral comme premier NL drainant. Ce n'est cependant pas rare de mettre en évidence un drainage croisé par le NL controlatéral. De la même façon, il existe de nombreux NL accessoires inconstants qui peuvent être facilement ignorés lors du bilan d'extension classique, en particulier si les NL principaux locorégionaux paraissent modifiés. Enfin, la localisation des tumeurs de la face, du tronc ou de la région périnéale peut ne pas être latéralisée. Il n'est donc pas possible d'identifier avec précision le premier NL drainant afin d'envisager son exérèse chirurgicale sans avoir recours à des examens complémentaires par imagerie ou en chirurgie.

Imagerie du nœud lymphatique sentinelle

L'injection d'un produit de contraste dans la tumeur ou à sa périphérie permet de mettre en évidence les trajets lymphatiques et de les suivre jusqu'au marquage du premier NL drainant. Il s'agit la plupart du temps de méthodes indirectes. Si plusieurs modalités ont été décrites en médecine humaine et vétérinaire, la lymphangiographie par scanner est la plus classiquement réalisée.

Lymphangiographie par scanner

L'objectif de cette méthode indirecte est d'obtenir un drainage lymphatique du produit de contraste après son injection en périphérie des vaisseaux lymphatiques. S'il est habituel d'utiliser le même produit de contraste iodé que celui injecté par voie intraveineuse lors de l'examen scanner classique (iopamidol, iohexol), l'emploi d'un éthylester iodé d'acides gras avec huile de paraffine, dont l'élimination serait plus lente, a également été décrite (Lipiodol® ultra-fluide) [6].

Un millilitre de produit de contraste est injecté dans la tumeur ou à sa périphérie en 4 points par voie intradermique (figure 1). L'injection



Figure 1. Injection péri-tumorale de 1 mL de produit de contraste iodé dans un mastocytome sous-cutané interdigité localisé entre les doigts 2 et 3 du membre thoracique droit.

peut également être réalisée en périphérie de la cicatrice chirurgicale si une exérèse de la tumeur a été préalablement effectuée. La voie intradermique permet une meilleure absorption du produit iodé par le système lymphatique. Plusieurs acquisitions en fenêtré "tissus mous" centrées sur la région d'intérêt sont ensuite réalisées 1 minute (T+1), 3 minutes (T+3), 5 minutes (T+5), 10 minutes (T+10) et 15 minutes (T+15) après l'injection, jusqu'à ce que le NL sentinelle soit identifié (figure 2 et vidéo, p. 34). Il a été montré que le temps optimal pour cette identification serait de 10 minutes après l'injection chez des chiens présentant un mastocytome cutané [5]. En pratique, il est indispensable de réaliser au moins une séquence avant 10 minutes (classiquement à T+3 et/ou T+5). En effet, si la sensibilité est proche de 100 % à T+10, il est possible d'observer à ce moment-là le

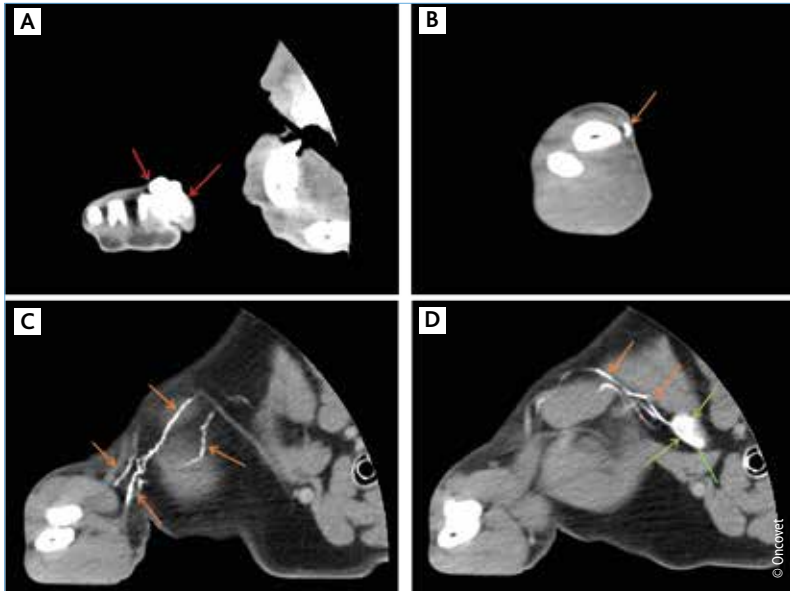
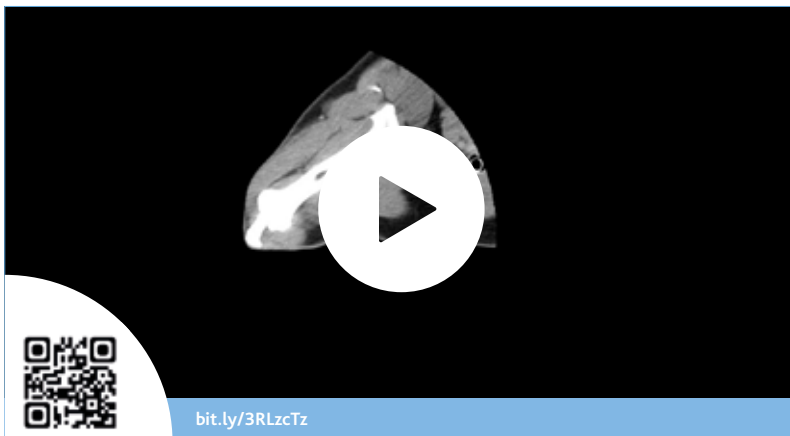


Figure 2. Examen tomodensitométrique du membre thoracique droit en fenêtre tissus mous après injection péritumorale de produit de contraste à hauteur : **A.** de la partie distale des métacarpes, **B.** du radius et de l'ulna, **C.** de l'humérus et **D.** en région préscapulaire. On note une accumulation du produit de contraste au site d'injection (flèches rouges) (A), puis les trajets lymphatiques (simple, puis multiples) sont visualisés jusqu'en région préscapulaire (flèches orange) (B-D) jusqu'au nœud lymphatique préscapulaire droit (flèches vertes) identifié comme le nœud lymphatique sentinelle.



Vidéo. Lymphangiographie indirecte par scanner.

marquage de plusieurs NL, donc de ne pas être en mesure d'identifier avec certitude le premier NL drainant la tumeur.

La lymphangiographie indirecte par scanner est donc facile à réaliser, relativement rapide et peut être effectuée au cours du bilan d'extension régionale, thoracique et/ou abdominale. Elle peut également être couplée à un examen cytologique immédiat du NL sentinelle identifié.

Autres techniques d'imagerie

La lymphangiographie indirecte par radiographie a également été décrite. Elle présente l'avantage d'être facilement accessible à moindre coût et ne nécessite pas d'anesthésie générale. Sa réalisation est similaire à ce qui est décrit pour le scanner, cependant l'acquisition des clichés est plus tardive et les superpositions des différentes structures peuvent gêner l'interprétation. De plus, le marquage de plusieurs NL peut être observé concomitamment et il est fréquent de ne pas identifier les éventuels NL accessoires [3, 6].

La scintigraphie est la technique de référence en médecine humaine pour la détection par imagerie du NL sentinelle [3, 7]. L'injection d'un marqueur radioactif (Tc-99m) selon le même procédé que ce qui a été décrit précédemment couplée à une visualisation par gamma-caméra permet de mettre en évidence le premier NL drainant, d'autant plus quand les images sont superposées à celles obtenues par tomographie. Cependant, le coût très élevé de cette technique, associé à une très faible disponibilité dans les structures vétérinaires françaises, et l'utilisation de substances radioactives limitent grandement son utilisation.

L'échographie de contraste est également une technique décrite en médecine humaine, mais peu utilisée actuellement en médecine vétérinaire [3, 8]. L'agent de contraste est constitué de microbulles de gaz contenues dans une enveloppe lipidique. Il est injecté en périphérie de la tumeur suivant le même mode opératoire que celui décrit précédemment et peut être détecté dans les NL drainants dans les minutes qui suivent l'injection. Cette technique de faible coût ne nécessite pas d'anesthésie générale. Cependant, si sa faisabilité a été démontrée en médecine vétérinaire, la détection du NL sentinelle peut être opérateur-dépendante et comporte les mêmes limites que la lymphangiographie par radiographie.

Identification peropératoire

Si l'identification du NL sentinelle peut se faire aisément par imagerie, son aspect ne permet pas de présager de son infiltration par les cellules tumorales [9]. Une analyse histologique après exérèse chirurgicale est donc nécessaire pour compléter l'examen. Cependant, la dissection chirurgicale

du NL sentinelle peut être difficile à appréhender, en particulier pour les NL de très petite taille (accessoires, par exemple). Une recherche peropératoire du NL sentinelle peut donc être effectuée en complément des examens d'imagerie. Pour cela, la technique classiquement utilisée est l'injection péri-tumorale de bleu de méthylène une quinzaine de minutes avant la chirurgie, toujours de la même façon que celle décrite en imagerie. Le trajet lymphatique peut être observé à travers la peau, en particulier dans les zones peu ou non pigmentées, et le NL sentinelle prend un aspect bleuté facilitant ainsi son identification et permettant une dissection régionale ciblée (figure 3).

Conclusion

La recherche du NL sentinelle est une étape clé dans le bilan d'extension d'une tumeur cutanée ou sous-cutanée et dans la planification de l'intervention chirurgicale. Si plusieurs techniques d'imagerie sont décrites, la lymphangiographie indirecte par scanner est la plus indiquée en pratique. Il s'agit d'une technique sensible et spécifique, facile et rapide à réaliser comme à interpréter. Elle peut être incluse en routine dans le bilan d'extension tomodensitométrique. L'identification peropératoire par injection de bleu de méthylène permet de compléter cet examen et de faciliter l'exérèse du NL sentinelle en vue de son analyse histologique. ●

Nora Bouhsina déclare ne pas avoir de liens d'intérêts en relation avec cet article.

POINTS CLÉS

- Le nœud lymphatique sentinelle est le premier nœud lymphatique drainant une tumeur.
- Le nœud lymphatique sentinelle peut être différent du nœud lymphatique locorégional.
- La lymphangiographie indirecte par scanner est une technique facile, rapide et sensible pour détecter le nœud lymphatique sentinelle.
- L'injection de bleu de méthylène permet de mieux visualiser le nœud lymphatique sentinelle pendant la chirurgie.



Figure 3. Identification et dissection du nœud lymphatique sentinelle teinté de bleu après injection peropératoire de bleu de méthylène.

Intérêt clinique de la recherche du nœud lymphatique sentinelle

Le but de la recherche du NL sentinelle lors du bilan d'extension initial d'une tumeur cutanée ou sous-cutanée est de cibler la suite de la prise en charge [5]. En effet, elle permet d'identifier le NL à retirer en priorité lors de l'exérèse chirurgicale de la tumeur. Dans les cas où son exérèse ne peut être réalisée, elle permet également d'inclure ce NL dans le plan de traitement de radiothérapie, de manière curative ou prophylactique. Cependant, si en médecine humaine l'importance de l'évaluation du NL sentinelle dans l'orientation de la prise en charge thérapeutique et l'établissement du pronostic a été bien établie, ce n'est pas encore le cas en médecine vétérinaire. Bien que de plus en plus d'études soient menées sur ce sujet, son intérêt dans l'amélioration de la prise en charge thérapeutique des tumeurs cutanées et sous-cutanées en oncologie canine reste à démontrer [3, 10].

Références bibliographiques

1. Withrow SJ et al. *Withrow and MacEwen's. Small Animal. Clinical Oncology, 5th edition.* Philadelphie : Elsevier Saunders, editor, 2013. 763 p.
2. Martins AL et al. *Retrospective study of canine cutaneous tumors submitted to a diagnostic pathology laboratory in Northern Portugal (2014-2020).* *Canine Med Genet* 2022;9(1):2.
3. Beer P et al. *The role of sentinel lymph node mapping in small animal veterinary medicine: a comparison with current approaches in human medicine.* *Vet Comp Oncol* 2018;16(2):178-87.
4. Linden DS et al. *Sentinel lymph node mapping of the canine anal sac using lymphoscintigraphy: a pilot study.* *Vet Radiol Ultrasound* 2019;60(3):346-50.
5. Lapsley J et al. *Influence of locoregional lymph node aspiration cytology vs sentinel lymph node mapping and biopsy on disease stage assignment in dogs with integumentary mast cell tumors.* *Vet Surg* 2021;50(1):133-41.
6. Brissot HN, Ederly EG. *Use of indirect lymphography to identify sentinel lymph node in dogs: a pilot study in 30 tumors.* *Vet Comp Oncol* 2017;15(3):740-53.
7. Worley DR. *Incorporation of sentinel lymph node mapping in dogs with mast cell tumours: 20 consecutive procedures.* *Vet Comp Oncol* 2014;12(3):215-26.
8. Fournier Q et al. *Contrast-enhanced ultrasound for sentinel lymph node mapping in the routine staging of canine mast cell tumours: a feasibility study.* *Vet Comp Oncol* 2021;19(3):451-62.
9. Grimes JA et al. *Use of indirect computed tomography lymphangiography to determine metastatic status of sentinel lymph nodes in dogs with a pre-operative diagnosis of melanoma or mast cell tumour.* *Vet Comp Oncol* 2020;18(4):818-24.
10. De Bonis A et al. *Sentinel Lymph Node Mapping with Indirect Lymphangiography for Canine Mast Cell Tumour.* *Vet Sci.* 2022;9(9):484.

Les marqueurs tumoraux

Tumor biomarkers

Kristina Museux, Ingrid Bemelmans

Cerba Vet, Massy.

MOTS-CLÉS

PTH/PTHrp
Métanéphrines
BRAF
Thymidine kinase 1
Test de clonalité
Activité mitotique
Ki67
Protéine Kit
Mutation du gène
c-kit

RÉSUMÉ

Les marqueurs tumoraux sont des biomolécules (protéines, enzymes, hormones, récepteurs ou ADN de cellules cancéreuses, etc.) dont le dosage est complémentaire à une analyse histologique et/ou cytologique afin de permettre de poser un diagnostic, de préciser la nature d'une tumeur, d'affiner le pronostic, d'orienter le traitement et de diagnostiquer des rechutes. Ces biomarqueurs peuvent avoir une ou plusieurs fonctions.

SUMMARY

Tumor markers are biomolecules (proteins, enzymes, hormones, receptors or DNA of cancer cells...) complementary to a histological or cytological diagnosis that are used for diagnosis, prognosis, treatment and diagnosis of relapses. These biomarkers can have one or multiple functions.

Keywords

PTH/PTHrp
Metanephrens
BRAF
TK1
Clonality testing
Mitotic count
Ki67
Kit protein
c-kit gene mutation



Référence de l'article :
Méd Chir Anim – Anim Cie
2023;6:36-45.

Le dosage des marqueurs tumoraux permet d'identifier dans le sang, les urines ou certains tissus de l'organisme différentes substances pouvant indiquer la présence d'un cancer. Il peut être utile à différents stades de la prise en charge d'un cancer: pour son dépistage, son diagnostic, la détermination de son stade (propagation) ou de son pronostic (agressivité de la tumeur). Il est également utile pour choisir et surveiller le traitement, évaluer son efficacité (réponse) ou encore estimer le risque de récurrence (**tableau**). Il est important de retenir que le dosage de certains marqueurs tumoraux peut être élevé sans mise en évidence systématique d'une affection cancéreuse sous-jacente. La thymidine kinase 1 peut être augmentée lors d'autres proliférations cellulaires (au cours d'une anémie hémolytique à médiation immunitaire, par exemple). Un marqueur tumoral isolé n'est pas suffisant pour diagnostiquer un cancer, mais c'est un outil important dans la prise en charge oncologique, tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire.

Syndrome paranéoplasique : l'hypercalcémie et l'hypoglycémie

L'hypercalcémie maligne

Certains marqueurs tumoraux sont bien connus et utilisés depuis longtemps. Il s'agit notamment du calcium. Chez le chien, la première cause d'hypercalcémie (dans deux tiers des cas) est le syndrome paranéoplasique, observé le plus souvent en cas de lymphome de type T ou d'adénocarcinome des glandes apocrines des sacs anaux. Il conviendra donc d'inclure un examen rectal dans l'exploration de l'hypercalcémie. D'autres tumeurs peuvent être responsables d'hypercalcémie maligne, comme le myélome multiple, le carcinome mammaire, le carcinome pulmonaire, le thymome, etc. Chez le chat, environ 20 à 30 % des cas d'hypercalcémie sont d'origine tumorale maligne (lymphome, carcinome épidermoïde, etc.).

Tableau. Synthèse de l'utilisation des marqueurs tumoraux.

	Diagnostic	Pronostic	Détection de récurrence
Prélèvement sanguin en clinique	Calcium total, calcium ionisé, glucose, protéines totales, troponine I, CRP	NFS, ratio neutrophiles/lymphocytes, PAL, troponine I, CRP	Calcium, électrophorèse de protéines, NFS, TK1, nucléosomes
Prélèvement sanguin au laboratoire	Calcium total et ionisé/PTH/PTHrp, insuline, protéines totales, électrophorèse de protéines, CRP/SAA, troponine I, cytométrie en flux, test de clonalité	NFS, ratio neutrophiles/lymphocytes, PAL, troponine I, CRP, TK1, cytométrie en flux	
Prélèvement urinaire	Métanéphrines, mutation BRAF		Mutation BRAF
Prélèvement cytologique	Mutation BRAF, cytométrie en flux, test de clonalité, immunocytochimie		
Prélèvement histologique	Immunohistochimie, mutation BRAF, activité mitotique, index de prolifération Ki67, test de clonalité	Mutation du gène c-kit, pattern et intensité d'expression de la protéine Kit, activité mitotique, index de prolifération Ki67	

Les syndromes paranéoplasiques correspondent à des manifestations anormales de l'organisme qui surviennent à la suite de l'évolution d'un cancer. La détection d'une hypercalcémie doit toujours être confirmée par une 2^e prise de sang. L'hémolyse et la lipémie peuvent interférer dans le dosage, une hypoalbuminémie peut également faussement abaisser la calcémie. Le calcium plasmatique est distribué en 3 fractions distinctes : la forme libre, ou calcium ionisé, représente environ 50 % du calcium total, la forme liée aux protéines en constitue environ 40 %, et la forme complexée à des anions (bicarbonates, phosphates, etc.), environ 10 %. Le dosage du calcium ionisé permet une évaluation plus précise du calcium biologiquement actif qui ne sera pas modifié par l'hémolyse, la lipémie et l'albuminémie et est considéré plus sensible que le calcium total [1].

Si aucune tumeur n'est détectée à l'examen clinique du chat ou du chien lors d'une hypercalcémie, d'autres marqueurs tumoraux peuvent être utilisés pour explorer cette anomalie. Il s'agit des dosages de la PTH et de la PTHrp.

La PTH est l'hormone produite par les glandes parathyroïdiennes. Certaines tumeurs de la glande parathyroïdienne (souvent des adénomes) vont provoquer une hypercalcémie par sécrétion de PTH ("hyperparathyroïdie primaire"), c'est pourquoi la mesure de la PTH en cas d'hypercalcémie est intéressante : en raison du rétrocontrôle négatif, physiologiquement, la PTH doit être basse (à minima dans les normes inférieures de l'intervalle de valeurs usuelles). Si elle est supérieure ou

dans les normes de l'intervalle, le résultat est en faveur d'une hyperparathyroïdie.

La PTHrp (*PTH related peptide*) est une "fausse" PTH sécrétée par certaines tumeurs (lymphome, adénocarcinome des glandes apocrines des sacs anaux, etc.) ayant les mêmes effets que la PTH (réabsorption de calcium au niveau rénal, résorption osseuse et réabsorption de calcium au niveau intestinal par le biais de la vitamine D3). Une PTHrp élevée associée à une hypercalcémie est en faveur d'une néoplasie. En revanche, une PTHrp dans les normes ou basse n'exclut pas la présence d'une néoplasie responsable de l'hypercalcémie. Quand la PTHrp est élevée, la PTH est souvent effondrée en raison d'un rétrocontrôle négatif.

Un phénomène ostéolytique peut également induire une hypercalcémie, par exemple lors d'un myélome multiple. Il est en revanche très rare d'avoir une hypercalcémie dans le cas d'un ostéosarcome, car l'ostéolyse est très localisée dans la plupart des cas.

Le traitement de l'hypercalcémie passe d'abord par la prise en charge de la cause primaire. D'autres traitements peuvent être instaurés en fonction de la rapidité d'installation de l'hypercalcémie et de la sévérité des signes cliniques.

Un suivi sanguin de la calcémie pourra aussi permettre de diagnostiquer des rechutes, par exemple après une chirurgie d'un adénocarcinome des glandes apocrines des sacs anaux. Une récurrence de l'hypercalcémie incitera à rechercher des métastases.

Le glucose comme marqueur tumoral

D'autres marqueurs courants peuvent être utilisés comme marqueur tumoral. C'est le cas de la glycémie dans le diagnostic de l'insulinome ou d'autres tumeurs hypoglycémiantes (léiomyosarcome...). Il est important de mesurer l'insuline au moment d'une hypoglycémie (glucose < 0,6 g/L). Comme pour la PTH, l'interprétation du résultat nécessite de prendre en considération l'existence physiologique d'un rétrocontrôle négatif : chez un animal sain, l'insuline doit être basse au moment d'une glycémie basse.

Marqueurs tumoraux sanguins

Certains marqueurs peuvent facilement être dosés en clinique (calcium, glucose, numération-formule sanguine, protéines totales, PAL, etc.), d'autres doivent être envoyés au laboratoire (électrophorèse des protéines sériques et urinaires, myélogramme, etc.).

La numération-formule sanguine

La numération-formule sanguine peut aussi être considérée comme un marqueur tumoral. En effet, en cas de lymphome, la présence d'une anémie est un facteur pronostique péjoratif associé à des temps de survie plus courts. L'anémie peut être due à différents mécanismes lors d'un lymphome et au cours d'une leucémie : une anémie inflammatoire entraîne une survie réduite des hématies, une diminution de la biodisponibilité du fer et de l'érythropoïèse. L'anémie peut aussi être due à une myélophthisie, c'est-à-dire une prolifération de cellules tumorales étouffant les cellules hématopoïétiques. Lors d'une leucémie aiguë, on constate d'abord une diminution des granulocytes neutrophiles, puis des plaquettes, enfin des hématies. Les neutrophiles ne survivent que quelques jours chez le chien, tandis que les hématies ont une durée de vie pouvant aller jusqu'à 120 jours. L'anémie peut également être présente lors d'un hémangiosarcome. Elle est alors souvent associée à la présence de schizocytes (hématies fragmentées mécaniquement en raison des anomalies des vaisseaux sanguins dans l'hémangiosarcome).

Une augmentation du rapport neutrophiles/lymphocytes est un facteur pronostique péjoratif de survie chez l'Homme et chez l'animal porteur d'un cancer tel que le myélome multiple, le carcinome mammaire félin et probablement le sarcome au site d'injection [2-5], mais ne semble pas être un facteur de pronostic péjoratif lors d'un lymphome ou d'un ostéosarcome chez le chien [4, 6].

L'exemple du myélome multiple

L'examen complémentaire de choix pour l'exploration d'une hyperprotéïnémie est l'électrophorèse des protéines sériques. La présence d'un pic d'allure monoclonale en gammaglobulines (base du pic plus mince que la base de l'albumine) peut évoquer un myélome multiple. Ce pic est dû à une sécrétion d'immunoglobulines par une population monoclonale tumorale de plasmocytes. Le diagnostic de myélome multiple repose sur la présence d'un pic monoclonal et de plus de 20 % de plasmocytes dans la moelle. D'autres critères biologiques peuvent orienter vers un myélome multiple : la présence de protéines de Bence-Jones dans les urines. Ces protéines ne sont pas détectables par la bandelette urinaire. Cependant, l'électrophorèse des protéines urinaires par SDS-PAGE permet de suspecter la présence de chaînes légères libres, mais nécessite une confirmation par immunoelectrophorèse. Un autre critère pour le diagnostic de myélome multiple est la présence de lésions ostéolytiques à la radiographie ou à l'examen tomodensitométrique (plus sensible que la radiographie).

Les PAL et l'ostéosarcome

Les PAL (plus précisément les iso-enzymes osseuses et les PAL totales) ont une valeur pronostique lors d'un ostéosarcome. Une augmentation des PAL avant le traitement a été associée à des survies plus courtes [7]. Cette augmentation des PAL est la conséquence indirecte du métabolisme osseux tumoral. Il s'agit d'un test simple à réaliser dans un contexte de suspicion d'ostéosarcome, au même titre que la détection de métastases pulmonaires radiographiques. Il faut noter cependant que des PAL normales ou l'absence de métastases pulmonaires radiographiques ne permettent pas d'affirmer qu'il s'agit d'un ostéosarcome de bon

pronostic. Attention, les PAL sont peu spécifiques chez le chien et leur augmentation peut être liée à une hépatopathie, à des traitements (corticoïdes, phénobarbital, etc.), à un stress ou une maladie chronique (cortico-induite), à un hypercorticisme ou juste à la croissance d'un jeune animal.

La troponine I

La troponine I est généralement utilisée comme marqueur cardiaque, car elle signe une nécrose des cardiomyocytes. Elle peut aussi être utilisée en tant que marqueur tumoral lors d'un hémangiosarcome chez le chien. En cas de suspicion ou lors d'un diagnostic d'hémangiosarcome splénique, la recherche d'un hémangiosarcome cardiaque est conseillée, puisqu'un quart des chiens atteints d'un hémangiosarcome splénique ont également un hémangiosarcome cardiaque. Une valeur de la troponine I supérieure à un seuil de 0,25 ng/mL permet de détecter un hémangiosarcome cardiaque avec une sensibilité de 78 % et une spécificité de 71 %.

La troponine I permet aussi de faire la différence entre un épanchement péricardique idiopathique et un épanchement péricardique d'origine tumorale avec une sensibilité de 81 % et une spécificité de 100 % [8].

La thymidine kinase 1 dans le suivi d'une chimiothérapie

Certains de ces marqueurs sanguins permettent aussi le suivi de tumeurs. Utilisés en routine en médecine humaine, il n'existait pas de marqueur efficace en médecine vétérinaire jusqu'à peu. La CRP s'est montrée décevante pour détecter une rechute et ne peut être utilisée que comme valeur pronostique au moment du diagnostic de lymphome.

En revanche, la thymidine kinase 1 (TK1) s'est révélée un bon marqueur de suivi des tumeurs fortement prolifératives (surtout pour le lymphome et l'hémangiosarcome chez le chien et le lymphome chez le chat). Il s'agit d'une enzyme cytoplasmique impliquée dans le recyclage de l'ADN lors de forte prolifération cellulaire. En aucun cas, elle ne pourra remplacer le diagnostic cytologique ou histologique, car une augmentation de son activité peut aussi être observée dans d'autres processus fortement prolifératifs, comme une anémie hémolytique à médiation immune ou une leucocytose inflammatoire.

La TK1 est un des marqueurs les plus documentés dans la surveillance de la rémission lors d'un lymphome chez le chien. Il est indispensable

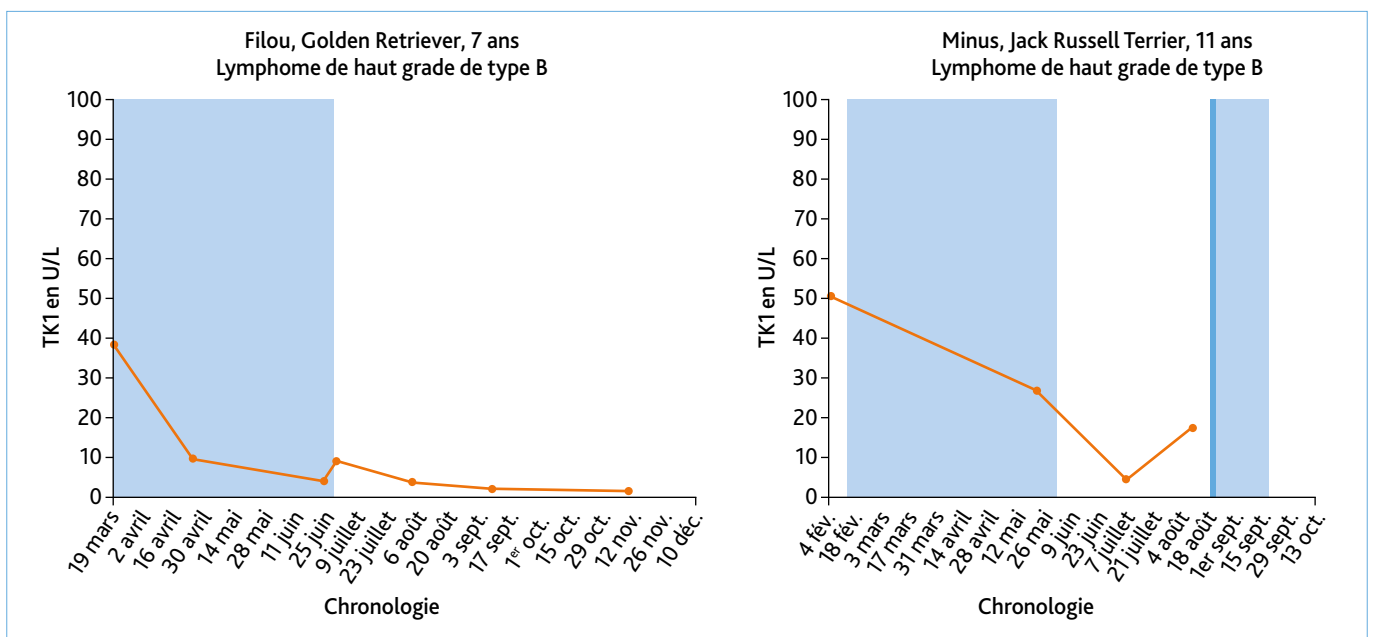


Figure 1. Suivi de la thymidine kinase 1 lors de chimiothérapie. Le carré bleu correspond au temps de chimiothérapie. Le premier chien, Filou, est entré en rémission. Le second, Minus, avait une augmentation de la TK1 2 semaines avant la rechute clinique, mise en évidence le 18 août. Suivis réalisés par le Dr David Sayag.

de suivre la cinétique chez un même patient pour détecter une maladie résiduelle et pour anticiper une rechute. Une évolution de 50 UI/L à 10 UI/L sous chimiothérapie est considérée comme une évolution favorable (figure 1, p. 39).

L'augmentation de la TK1 semble associée au stade de lymphome ainsi qu'au pronostic chez le chien. Généralement, les augmentations de TK1 sont plus importantes lors d'un lymphome B que lors d'un lymphome T.

Ce test est capable de détecter une rechute 4 semaines avant l'apparition d'une récurrence clinique avec une bonne spécificité [9], et il est habituellement accepté (même si cela reste à prouver) qu'en traitant la rechute le plus précocement possible, la rémission est plus longue.

La TK1 est parfois associée à un dosage de la CRP. Si l'animal présente un mauvais état général après la chimiothérapie et s'il est question de faire la différence entre une rechute et une inflammation ou une infection, le dosage combiné de TK1 et de CRP permet souvent d'orienter le diagnostic (TK1 faible, CRP augmentée: inflammation ou infection; TK1 élevée, CRP normale: rechute de la tumeur).

D'autres biomarqueurs de suivi ou de dépistage pourront éventuellement être disponibles dans le futur, comme la mesure du nucléosome plasmatique, qui est aussi un marqueur de prolifération [10].

Marqueurs tumoraux urinaires

L'exemple du dosage des métanéphrines lors de tumeurs surrenaliennes

D'autres hormones peuvent être mesurées pour détecter une tumeur. En présence d'une masse surrenalienne, il sera nécessaire de distinguer une lésion non sécrétante d'une tumeur hormono-sécrétante qui nécessitera, elle, des traitements adaptés. Ainsi, on peut doser le cortisol lors d'un test dynamique (test de stimulation à l'ACTH ou test de freinage à la dexaméthasone à faible dose) pour diagnostiquer un syndrome de Cushing chez le chien ou le chat, ou l'aldostérone pour diagnostiquer un hyperaldostéronisme

primaire chez le chat, ce dernier pouvant être dû à une lésion tumorale ou simplement hyperplasique.

Le dosage des métanéphrines, métabolites des catécholamines produits en continu, permet souvent un diagnostic non invasif d'un phéochromocytome (tumeur surrenalienne de la médulla). Une équipe de l'école vétérinaire de Zurich a démontré une supériorité du ratio normétanéphrine/créatinine urinaire par rapport au dosage plasmatique ou urinaire des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) et de la métanéphrine. Le dosage des métanéphrines urinaires nécessitera des conditions préanalytiques particulières. Il faut, en effet, acidifier les urines à un pH inférieur à 2 avec de l'acide chlorhydrique à 25 %, puis envoyer au laboratoire les urines congelées et à l'abri de la lumière. Le prélèvement peut être fait par miction ou par cystocentèse, à n'importe quel moment de la journée. Des études récentes s'intéressent aussi au dosage chez le chat (communication au congrès ECVIM 2022).

La mutation BRAF

La recherche par biologie moléculaire de la mutation BRAF permet de détecter, dans les urines, des cellules cancéreuses d'un carcinome urothélial ou prostatique par PCR chez le chien. La mutation BRAF joue un rôle dans la voie MAP kinase, qui est responsable de la survie, de la croissance et de la prolifération des cellules cancéreuses. Cette voie inclut une tyrosine kinase qui pourrait être ciblée par un inhibiteur de tyrosine kinase et pourrait ainsi éventuellement ouvrir de nouvelles perspectives de traitement dans le futur.

En 2015, B. Decker et al. et H. Mochizuki et al. commencent à s'intéresser à la mutation BRAF, spécifique du cancer et présente dans différentes tumeurs chez l'homme, dont le mélanome, le carcinome thyroïdien et certaines leucémies [11, 12]. Ils arrivent à démontrer une mutation homologue du gène BRAF (la mutation BRAF V595E) dans un grand nombre de carcinomes urothéliaux de la vessie et de carcinomes prostatiques chez le chien [11]. Ce test remplace le test antigénique qui a été utilisé dans le passé pour détecter les carcinomes urothéliaux, mais qui présentait malheureusement de nombreux faux positifs en cas d'hématurie.

Le diagnostic de carcinome urothélial vésical peut s'avérer délicat, certaines présentations échographiques pouvant être similaires, telles que celles d'une lésion polypeuse non tumorale et d'un carcinome urothélial (figure 2).

Le diagnostic de carcinome urothélial de la vessie est histologique. C'est un test invasif, qui nécessite soit une cystoscopie avec biopsie, soit une laparotomie avec le risque de disséminer la tumeur.

Pour cette raison, la cytologie est souvent préférée à l'histologie. À l'examen cytologique, un carcinome urothélial se caractérise généralement par une population abondante de cellules épithéliales isolées ou en amas montrant des atypies marquées (figure 3A). Dans le cas d'une cellularité faible ou d'atypies modérées, le pathologiste ne pourra pas distinguer avec certitude un carcinome bien différencié de cellules urothéliales hyperplasiques (figure 3B). Dans ce cas de figure, une recherche d'une mutation BRAF sur sédiment urinaire sera conseillée.

La mutation BRAF est spécifique du cancer. Dans la littérature vétérinaire, il n'a pas été rapporté de mutation lors de cystites, de polypes ou de tumeurs bénignes de la vessie ou de la prostate. Un résultat positif dans le contexte d'une masse vésicale ou prostatique est définitif et ne nécessite pas de confirmation par un examen histologique.

La sensibilité de la recherche de la mutation BRAF lors d'un carcinome urothélial est de 73 % pour les races terriers et de 80 % pour le carcinome prostatique toutes races confondues. La sensibilité est moindre pour les carcinomes urothéliaux chez les chiens de grande race.

Un résultat négatif signifie :

- soit l'absence de carcinome urothélial ou prostatique ;
- soit la présence d'une tumeur BRAF négative ;



Figure 2. Lésions prolifératives dans le trigone vésical laissant fortement suspecter un carcinome urothélial. Deux tests de la mutation BRAF se sont révélés négatifs. En raison de ces tests négatifs, une histologie a été réalisée qui a mis en évidence une cystite polypoïde.

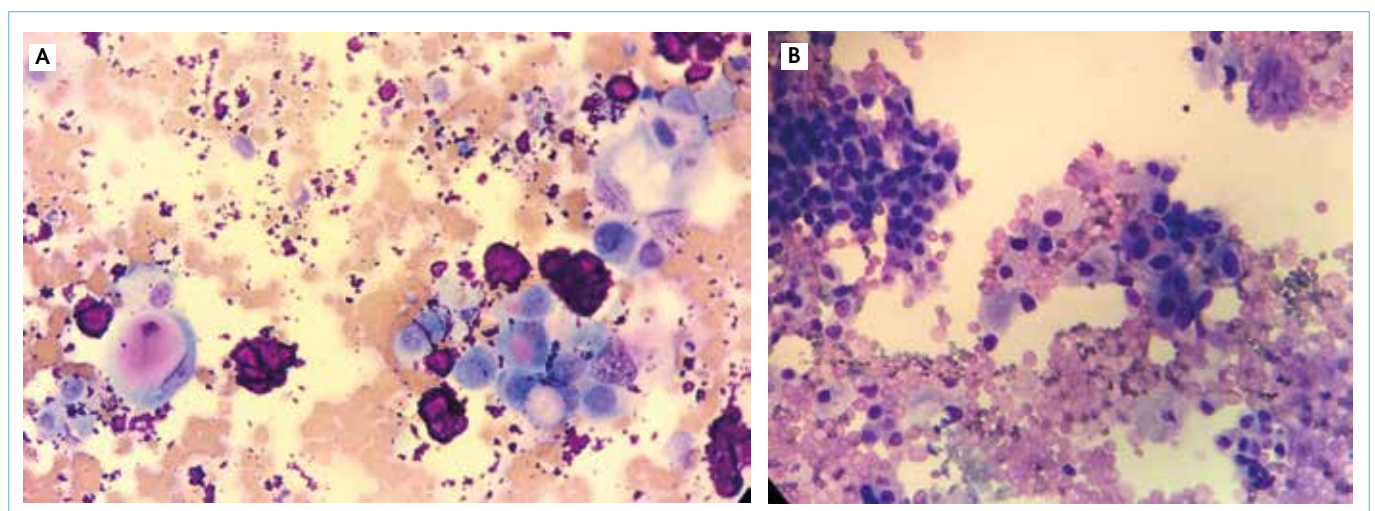


Figure 3. Cytologie de sédiment urinaire. A. Cytologie en faveur d'un carcinome urothélial. B. Cytologie douteuse : abondantes cellules urothéliales modérément atypiques.

- soit un prélèvement trop peu cellulaire pour pouvoir détecter la mutation BRAF (envoyer toujours un prélèvement riche en sédiment).

Le diagnostic de carcinome urothélial de la vessie et de la prostate est malheureusement souvent posé trop tardivement ; 20 à 37 % des carcinomes transitionnels de la vessie ont en effet déjà métastasé au moment du diagnostic versus 80 % dans le cas des carcinomes prostatiques. Le test de la mutation BRAF peut être utilisé comme outil pour diagnostiquer un carcinome plus précocement par simple recherche sur urines (lors de cystites récidivantes, par exemple). Il permet enfin de détecter une rechute après chimiothérapie simplement sur culot urinaire. La recherche de la mutation BRAF n'est possible que chez le chien.

Marqueurs tumoraux sur prélèvement histologique

L'évaluation de la prolifération tumorale

L'évaluation de la prolifération tumorale est un paramètre pronostique largement étudié dans la littérature en médecine humaine et vétérinaire. Elle a pour objectif de rechercher des corrélations statistiquement significatives entre l'activité proliférative d'une tumeur, pouvant être évaluée via l'activité mitotique et l'index de prolifération Ki67, et le pronostic spécifique de tumeur dans l'espèce considérée.

L'activité mitotique

La mitose correspond à l'étape de la division cellulaire des cellules somatiques. L'évaluation de l'activité mitotique des cellules tumorales correspond donc à estimer leur activité proliférative et en conséquence évaluer l'agressivité potentielle d'une tumeur. En fonction des études, on parlera de comptage mitotique, nombre de mitoses comptées dans une taille spécifique de champ ou de surface définie au microscope optique, ou d'index mitotique, nombre de cellules en phase de mitose divisé par le nombre de cellules totales.

L'activité mitotique peut être évaluée comme un critère pronostique indépendant ou faire partie d'un critère parmi d'autres dans la détermination

d'un grade tumoral. Pour chaque paramètre, il sera évalué une médiane de survie, un risque de récurrence et un risque de métastase spécifique.

L'étude de R.C. Smedley et al. [13] a montré que les tumeurs mélaniques orales ou labiales dont le comptage mitotique est supérieur ou égal à 4 mitoses par champ à fort grossissement et les tumeurs mélaniques cutanées ou digitées dont le comptage mitotique est supérieur ou égal à 3 mitoses par champ à fort grossissement sont associées à un pronostic péjoratif. Les lymphomes ganglionnaires canins dont le comptage mitotique par champ à fort grossissement se situe entre 0 et 5 sont de bas grade, entre 6 et 10, de grade intermédiaire, et supérieur à 10, de haut grade [14].

L'activité mitotique est un critère toujours pris en compte dans la détermination du grade tumoral. Plusieurs grades sont décrits et utilisés en routine en pathologie vétérinaire [15]. Le grade des sarcomes des tissus mous chez le chien est évalué sur 3 critères : le degré de différenciation histologique, le comptage mitotique sur 10 champs à fort grossissement et le pourcentage de nécrose [16]. Le grade des carcinomes mammaires canins est également évalué sur 3 critères : le pourcentage de formation de tubes, le pléomorphisme nucléaire et le comptage mitotique sur 10 champs à fort grossissement [17]. Pour ces 2 exemples, un score de 1 à 3 est attribué à chaque critère. La somme des critères permet de classer les tumeurs en grade 1, 2 ou 3.

L'index de prolifération Ki67

L'antigène Ki67 est un marqueur de prolifération cellulaire. Il s'agit d'une protéine nucléaire exprimée pendant toutes les phases du cycle cellulaire, sauf pendant la phase G0. L'index de prolifération Ki67 correspond au pourcentage de cellules exprimant l'antigène Ki67 (nombre de cellules tumorales positives divisé par le nombre total de cellules tumorales) : plus l'index est élevé, plus les cellules tumorales sont en phase de prolifération et plus la tumeur est potentiellement agressive.

Des études rétrospectives ont précisé, pour un certain nombre de tumeurs, un seuil au-delà duquel la tumeur est considérée comme de plus mauvais pronostic ou de haut grade. Les études de R.S. Horta et al. [18] et de J.J. Abadie

et al. [19] ont montré des seuils de 5,6 et 9,3 %, respectivement, au-delà desquels les mastocytomes cutanés canins montrent un risque de récurrence et de métastases plus élevé. Les tumeurs mélaniques cutanées et digitées canines dont l'index de prolifération Ki67 est supérieur à 15 % sont de mauvais pronostic [13]. Les lymphomes ganglionnaires canins dont l'index de prolifération Ki67 est supérieur à 21 % sont considérés comme de haut grade (figure 4) [20]. Plus récemment, une étude a montré un index de prolifération Ki67 dans la lamina propria et dans l'épithélium villositaire de l'intestin significativement plus élevé chez les chats atteints d'un lymphome intestinal avec un taux d'expression supérieur à 20 % [21].

La répartition de l'expression de la protéine Kit

La protéine Kit (ou CD117) est un récepteur transmembranaire de cytokines à activité tyrosine kinase exprimé à la surface de certaines cellules, qui se lie au *stem cell factor* (SCF). L'activation de la protéine kinase induit une activation de voies de transduction du signal (voies PI3 kinase et RAS/ERK, notamment), qui jouent un rôle dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaires. Des mutations du gène *c-kit* ont été mises en évidence en particulier dans les mastocytomes et les tumeurs stromales gastro-intestinales chez l'Homme et dans plusieurs espèces animales, dont le chien.

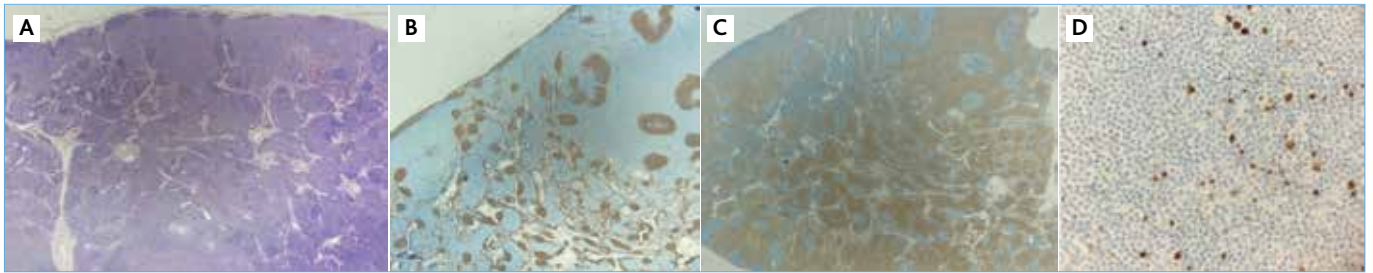


Figure 4. Lymphome ganglionnaire des zones T de bas grade canin. A. Lymphome à petites cellules des zones T (coloration HES). B. Expression de l'antigène CD20 (marqueur des lymphocytes B) au sein des centres germinatifs. C. Expression de l'antigène CD3 (marqueur de lymphocytes T) par la population tumorale. D. Index de prolifération Ki67 de 5,9 % (< seuil de 21 %), d'après C. Fournel-Fleury et al. [20].

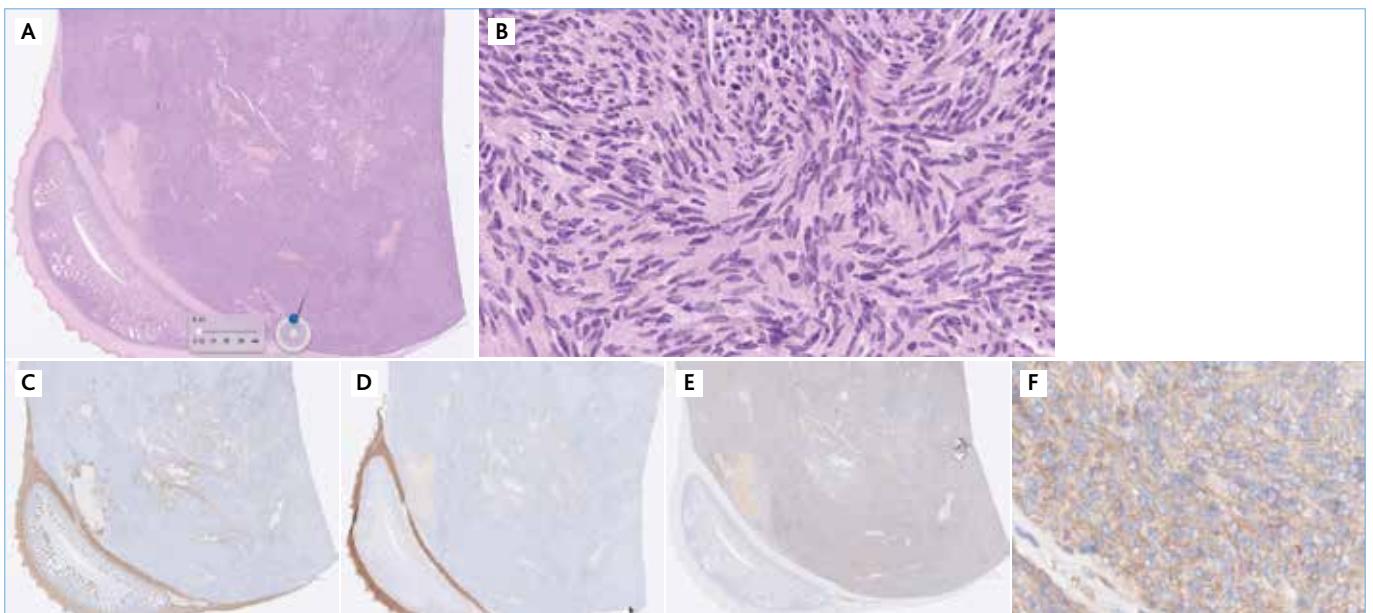


Figure 5. Tumeur stromale gastro-intestinale canine. A et B. Tumeur à cellules fusiformes infiltrant la musculature intestinale (coloration HES). C. Absence d'expression de l'antigène actine par les cellules tumorales. D. Absence d'expression de l'antigène desmine par les cellules tumorales. E et F. Expression d'intensité faible de l'antigène Kit par les cellules tumorales.

L'étude de R.M. Gil da Costa et al. [22] a montré une corrélation significative entre l'expression aberrante cytoplasmique de la protéine Kit dans les mastocytomes cutanés canins, une activité proliférative et un grade élevés, celle de R.S. Horta et al. [18], une médiane de survie de 224 jours en cas de localisation cytoplasmique du marquage de la protéine Kit, alors qu'elle n'était pas atteinte en cas de localisation membranaire normale de la protéine Kit.

L'intensité de l'expression de la protéine Kit

L'intensité d'expression immunohistochimique d'une protéine (faible, moyenne ou forte) peut constituer un critère pronostique d'une tumeur. C.M. Del Alcazar et al. [23] ont étudié des critères histologiques et des facteurs pronostiques des tumeurs stromales gastro-intestinales sur une cohorte de 47 chiens. Ils ont montré qu'un index mitotique supérieur à 9 mitoses en 10 champs, des marges infiltrées ainsi qu'une faible expression de la protéine Kit constituaient des critères pronostiques péjoratifs (figure 5D, p. 43). Plus précisément, dans cette étude, la médiane de survie était de 250 jours en cas de faible expression de la protéine, contre 1418 jours en cas d'expression modérée à forte.

Analyse de biologie moléculaire

La mutation du gène c-kit

De multiples études ont montré la présence de mutations du gène c-kit dans les mastocytomes cutanés canins. L'étude de R.S. Horta et al. [18] a mis en évidence une corrélation positive entre la mutation de l'exon 11 du gène c-kit et le stade clinique, la récurrence, les grades de Patnaik et Kiupel, l'activité mitotique et l'index de prolifération Ki67. La médiane de survie n'était pas atteinte pour les patients exempts de mutation alors qu'elle était de 164 jours chez les patients atteints d'un mastocytome avec une duplication de l'exon 11 du gène c-kit.

La clonalité lymphoïde

L'objectif du test de clonalité est de différencier une lymphocytose réactionnelle (polyclonale)

d'une lymphocytose néoplasique (monoclonale). Le test de clonalité consiste en une amplification par PCR d'une région génomique spécifique des lymphocytes codant pour les récepteurs aux antigènes: région CDR3 (*complementary-determining region 3*) du TCR (*T-cell receptor*) pour les lymphocytes T et chaînes lourdes d'immunoglobulines pour les lymphocytes B. Le résultat de la PCR donne un profil mono- ou polyclonal pour chaque population de lymphocytes B et T. Il est considéré comme inférieur à la cytométrie en flux et aux immunomarquages pour préciser l'immunophénotype.

Cet outil a été exploré dans de multiples études visant à différencier des lymphocytoses réactionnelles des leucémies ou des lymphomes. Lors d'une lymphocytose sanguine, il est conseillé d'explorer des maladies infectieuses (comme l'ehrlichiose) en première intention, car certains agents infectieux peuvent amener à une prolifération monoclonale de lymphocytes.

Ce test trouve aussi son utilité pour les entérites chroniques et les lymphomes intestinaux à petites cellules T de bas grade chez les chats, 2 entités difficilement distinguables comme discuté précédemment. Dans plus de 85 % des lymphomes, une population clonale T a été décrite. Une étude récente [21] a néanmoins montré une population monoclonale T ou monoclonale sur un fond polyclonal chez 70 % des chats atteints d'entérite chronique. Les hypothèses pouvant expliquer ces résultats sont l'émergence de clones néoplasiques sur un fond inflammatoire polyclonal ou par une stimulation antigénique forte chez les chats atteints d'entérite chronique. Le test de clonalité lymphoïde ne peut donc, en aucun cas, remplacer l'analyse immunohistochimique et doit être interprété au regard des résultats d'analyses histologiques conventionnelles et immunohistochimiques.

Conclusion

Avec les progrès des connaissances de la carcinogénèse et les nouveaux procédés techniques, de nouveaux marqueurs sont apparus récemment en médecine vétérinaire (TK1, mutation BRAF, etc.). Les avancées des connaissances

dans le domaine de la carcinogénèse tumorale ouvrent la voie à la découverte de nouveaux biomarqueurs (mesure de nucléosome, dépistage de l'ADN libre circulant, etc.). La prise en charge d'un cancer peut être mieux adaptée au patient et permet de personnaliser le traitement, tout en sachant qu'il existe des limites dans l'interprétation d'un dosage. ●

POINTS CLÉS

- Les marqueurs tumoraux sont une aide pour le diagnostic, le traitement, le pronostic et la détection de rechute en oncologie (tableau, p. 37).
- Certains sont utilisés pour le diagnostic (PTHrp, métanéphrines, mutation BRAF, panel d'anticorps sur prélèvement histologique, etc.), d'autres pour le pronostic (NFS, Ki67, Kit, etc.), d'autres encore pour le suivi de traitement et la détection de rechute (TK1, nucléosomes, calcium, etc.). Parfois, ils ont plusieurs fonctions (diagnostic, pronostic, traitement et détection de rechute).

Kristina Museux et Ingrid Bemelmans déclarent exercer au sein d'un laboratoire commercialisant des marqueurs tumoraux.

Références bibliographiques

1. Messinger JS et al. Ionized hypercalcemia in dogs: a retrospective study of 109 cases (1998-2003). *J Vet Intern Med* 2009;23(3):514-9.
2. Fernandez R, Chon E. Comparison of two melphalan protocols and evaluation of outcome and prognostic factors in multiple myeloma in dogs. *J Vet Intern Med* 2018;32(3):1060-9.
3. Petrucci GN et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent prognostic marker for feline mammary carcinomas. *Vet Comp Oncol* 2021;19(3):482-91.
4. Macfarlane L et al. Diagnostic value of neutrophil-lymphocyte and albumin-globulin ratios in canine soft tissue sarcoma. *J Small Anim Pract* 2016;57(3):135-41.
5. Chiti LE et al. Evaluation of leukocyte counts and neutrophil-to-lymphocyte ratio as predictors of local recurrence of feline injection site sarcoma after curative intent surgery. *Vet Comp Oncol* 2020;18(1):105-16.
6. Mutz M et al. Prognostic value of baseline absolute lymphocyte concentration and neutrophil/lymphocyte ratio in dogs with newly diagnosed multi-centric lymphoma. *Vet Comp Oncol* 2015;13(4):337-47.
7. Garzotto CK et al. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase activity in canine appendicular osteosarcoma. *J Vet Intern Med* 2000;14(6):587-92.
8. Chun R. Comparison of plasma cardiac troponin I concentrations among dogs with cardiac hemangiosarcoma, noncardiac hemangiosarcoma, other neoplasms, and pericardial effusion of nonhemangiosarcoma origin. *J Am Vet Med Assoc* 2010;237(7):806-11.
9. Boyé P et al. Evaluation of serum thymidine kinase 1 activity as a biomarker for treatment effectiveness and prediction of relapse in dogs with non-Hodgkin lymphoma. *J Vet Intern Med* 2019;33(4):1728-39.
10. Wilson-Robles HM et al. Evaluation of plasma nucleosome concentrations in dogs with a variety of common cancers and in healthy dogs. *BMC Vet Res* 2022;18(1):329.
11. Decker B et al. Homologous mutation to human BRAF V600E is common in naturally occurring canine bladder cancer evidence for a relevant model system and urine-based diagnostic test. *Mol Cancer Res* 2015;13:993-1002.
12. Mochizuki H et al. Detection of BRAF mutation in urine DNA as a molecular diagnostic for canine urothelial and prostatic carcinoma. *PLoS One* 2015;10(12):e0144170.
13. Smedley RC et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. *Vet Pathol* 2011;48(1):54-72.
14. Valli VE et al. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet Pathol* 2011;48(1):198-211.
15. Avallone G et al. Review of histological grading systems in veterinary medicine. *Vet Pathol* 2021;58(5):809-28.
16. Dennis MM et al. Prognostic factors for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs. *Vet Pathol* 2011;48(1):73-84.
17. Peña L et al. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol* 2013;50(1):94-105.
18. Horta RS et al. Assessment of canine mast cell tumor mortality risk based on clinical, histologic, immunohistochemical, and molecular features. *Vet Pathol* 2018;55(2):212-23.
19. Abadie JJ et al. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1999;215(11):1629-34.
20. Fournel-Fleury C et al. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67 antigen. *J Comp Path* 1997;117(1):61-72.
21. Freiche V et al. Histopathologic, phenotypic, and molecular criteria to discriminate low-grade intestinal T-cell lymphoma in cats from lymphoplasmacytic enteritis. *J Vet Intern Med* 2021;35:2673-84.
22. Gil da Costa RM et al. CD117 immunorexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Vet Res* 2007;3:19.
23. Del Alcazar CM et al. Outcome, prognostic factors and histological characterization of canine gastrointestinal sarcomas. *Vet Comp Oncol* 2021;19(3):578-86.

Séquençage et biopsies liquides : de nouveaux outils qui suscitent de grands espoirs

Sequencing and liquid biopsies: new tools that raise great hopes

Olivier Keravel

Eiffelvet, Paris.

MOTS-CLÉS

ADN tumoral
Séquençage
Biopsie liquide
Cellules tumorales circulantes
ADN tumoral circulant
Nucléosome
Mutation
Multiomique
Oncologie
Transcriptome
Exome
Mastocytome canin

Keywords

Sequencing
Tumor DNA
Liquid biopsy
Circulating tumor cells
Circulating tumor DNA
Nucleosome
Mutation
Multiomic
Oncology
Transcriptome
Exome
Canine mast cell tumor

Référence de l'article :
Méd Chir Anim – Anim Cie
2023;6:46-55.

RÉSUMÉ

Les récentes avancées technologiques sur le séquençage du génome en cancérologie et sur les biopsies liquides concernent également la médecine vétérinaire. Comprendre ces techniques, leurs potentiels mais aussi leurs limites implique des connaissances de base résumées dans cet article. Un tour d'horizon des solutions existantes en cancérologie vétérinaire est proposé, y compris à travers la propre expérience de l'auteur au sujet du séquençage des tumeurs canines en pratique.

SUMMARY

Genome sequencing and liquid biopsy represent a growing area of research in human oncology and are already part of the patient approach, including in veterinary oncology. Understanding their limits and potentials is crucial for the veterinarians including the general practitioners. The existing solutions in veterinary practice today are presented, including through the author's experience with tumor sequencing in veterinary oncology.

Le séquençage des tumeurs et la réalisation de biopsies liquides sont en médecine humaine de tous nouveaux outils permettant d'espérer une individualisation accrue des stratégies thérapeutiques en cancérologie dans leur ensemble et tout particulièrement dans les domaines de la médecine de précision et de l'immunothérapie. Ces outils permettent également d'acquérir une connaissance de plus en plus fine des mécanismes de l'oncogenèse. Toutes ces découvertes, très récentes, foisonnantes, posent aujourd'hui plus de questions qu'elles n'apportent de réponses pratiques, mais le chemin est tracé même s'il pourrait être encore long. La cancérologie vétérinaire bénéficie indirectement de ces avancées et solutions, quasi exclusivement à visée diagnostique aujourd'hui, rarement thérapeutique. Nous nous proposons d'en dresser un état des lieux en précisant d'emblée que ces outils ne

concernent actuellement que nos patients canins, les chats devront encore patienter un peu...

Quelques bases théoriques sur le séquençage du génome

James Watson et Francis Crick découvrent la structure de l'ADN en 1953. Le séquençage de l'ADN humain commence au cours de la seconde moitié des années 1970. L'intégralité du génome humain est séquencée en 2003, celui du chien en 2006 [1]. Si le coût initial de ce séquençage était de plusieurs millions de dollars, il a aujourd'hui drastiquement diminué avec les dernières techniques développées (*next-generation sequencing*, NGS) [2]. En 2022, la société de biotechnologie américaine FidoCure proposait un séquençage partiel du génome tumoral canin pour 750 dollars.

Le génome est inscrit dans la double hélice d'ADN, sous forme d'un enchaînement précis des fameuses bases nucléiques (adénine (A), cytosine (C), guanine (G), thymine (T)) au sein des chromosomes. On considère que, chez le chien comme chez l'Homme, 80 à 98 % du génome ne code pas pour des protéines, mais présente un rôle fonctionnel complémentaire indispensable [3]. La partie codante de l'ADN (environ 20 à 25 000 protéines) représente l'exome (figure 1).

Parmi ces protéines, certaines se sont révélées importantes pour la carcinogenèse, 3 familles protéiques en particulier (les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs, les protéines régulant la réparation de l'ADN et l'apoptose). En cas de mutation intéressant ces protéines (c'est-à-dire une anomalie survenue dans la séquence des bases nucléiques, le plus souvent par délétion, insertion ou substitution d'une ou de plusieurs d'entre elles, survenant le plus fréquemment au cours d'une mitose), leur dysfonctionnement (sur- ou sous-expression, par exemple) favorise alors le cancer. La plupart des mutations apparaissent au cours de la vie (somatique), certaines sont transmises lors de la reproduction (mutation germinale).

Le cancer est considéré aujourd'hui comme une maladie d'origine génétique multifactorielle (mutation spontanée ou sous l'action d'agents carcinogènes tels que les rayonnements ionisants ou certains produits chimiques). L'évolution d'un cancer n'est toutefois que très rarement la conséquence d'une simple mutation isolée, il faut une accumulation de mutations dans le temps. Un cancer présente donc en son sein plusieurs lignées cellulaires distinctes génétiquement. Toutes les mutations survenant dans les cellules tumorales ne sont pas équivalentes, certaines dites *driver* sont plus importantes que d'autres dites *passenger* (figure 2).

Le principe du séquençage du génome tumoral est d'identifier les anomalies par comparaison avec le génome normal du patient qui abrite la tumeur, espérant ainsi trouver des mutations "actionnables", c'est-à-dire débouchant sur une possible stratégie thérapeutique. Ce séquençage doit se faire dans l'idéal sur du tissu frais congelé, mais peut être réalisé, moyennant l'acceptation d'une fiabilité un peu moindre, sur du tissu conservé dans le formol [4, 5].

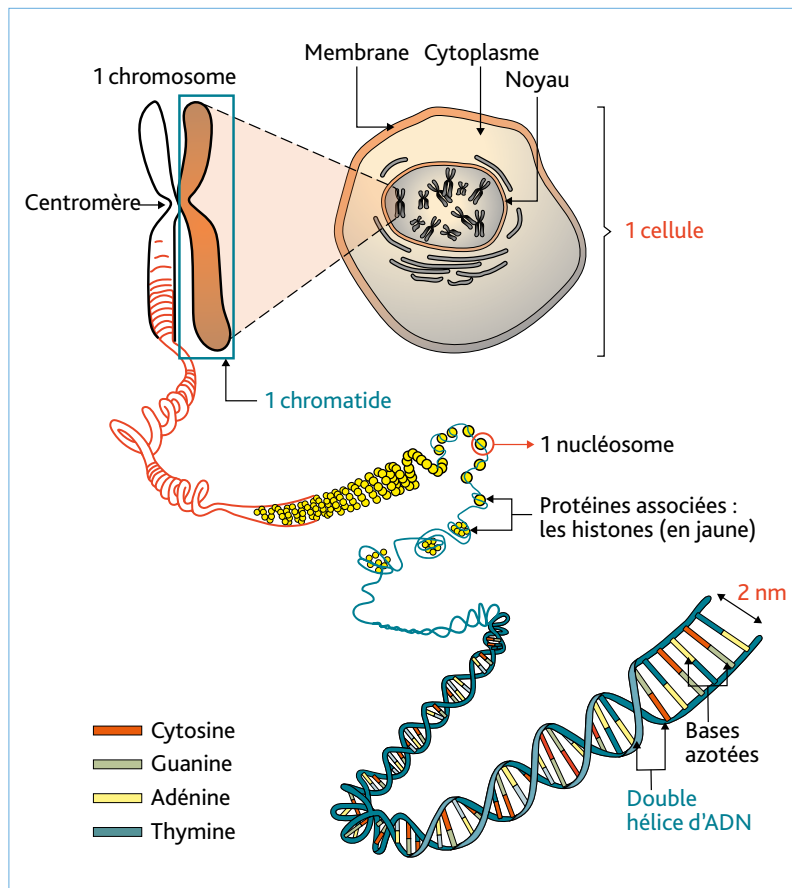


Figure 1. De l'ADN au chromosome.

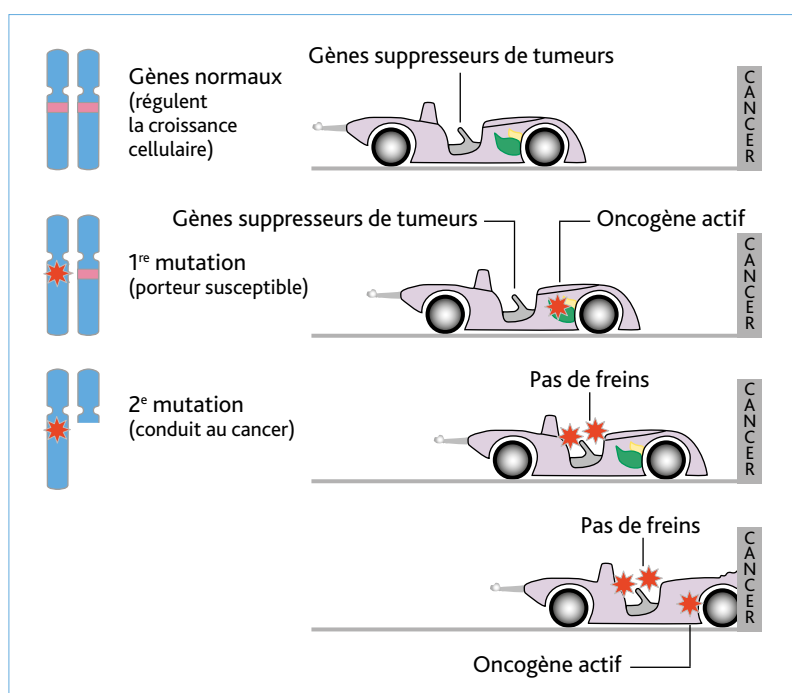


Figure 2. Illustration de l'enchaînement des mutations dans l'oncogenèse.

De la difficulté de la mise en pratique du séquençage d'un point de vue clinique

Il serait illusoire d'espérer séquencer de façon systématique l'intégralité du génome de chaque tumeur de chaque patient. On se contente aujourd'hui de séquencer tout ou partie de l'exome ou du transcriptome (ARN). Étant donné notre connaissance accumulée au cours des dernières décennies sur les différentes mutations les plus significatives en cancérologie humaine, il est aussi possible de se contenter de rechercher la présence de ces mutations sans qu'il soit nécessaire de séquencer tout le génome ou tout l'exome.

L'étape ultime est donc de pouvoir classer un patient dans un sous-groupe "thérapeutique" préalablement identifié par la recherche sans passer par l'étape du séquençage ou juste via l'identification d'une anomalie à rechercher par un test simple et peu coûteux.

Le meilleur exemple en médecine vétérinaire est naturellement l'identification préalable en recherche de la très fréquente mutation de la protéine c-Kit dans le mastocytome canin [6]. Il s'agit d'une mutation d'un récepteur membranaire de la famille des tyrosines kinases qui a pour conséquence une autoactivation de certaines voies métaboliques intracellulaires favorisant la division cellulaire. Or, il existe des molécules intracellulaires qui peuvent bloquer cette autoactivation: les inhibiteurs des voies tyrosine kinases masitinib et tocéranib, d'où leur prescription thérapeutique. Il est donc possible aujourd'hui, selon certaines conditions (hors du propos de cet article), de prescrire ces molécules sans séquencer le génome tumoral individuel de nos patients canins porteurs d'un mastocytome. Le souci est qu'une mutation dans un cancer identifié à l'instant T sur une biopsie ne "fait" pas le cancer. La solution serait trop simple. D'abord, comme indiqué précédemment, le cancer n'est pas homogène tant et si bien qu'une mutation identifiée à un endroit donné peut être absente à un autre. Ensuite, le cancer continue à évoluer avec le temps, en particulier au cours du processus métastatique, et d'autres mutations peuvent survenir. Ainsi, chez le chien, certains mastocytomes porteurs de la mutation c-Kit ne répondent pas au masitinib ou au tocéranib,

ou répondent à l'une de ces molécules et pas à l'autre. À l'inverse, il existe des réponses cliniques à ces médicaments sans mutation identifiable du récepteur c-Kit. En effet, les cancers sont hétérogènes, évoluent et, de plus, ces molécules n'ont pas exactement le même spectre d'activité. Elles peuvent inhiber d'autres voies tyrosine kinases présentes ou non dans la tumeur. Elles ont également d'autres effets, sans rapport avec les récepteurs tyrosine kinases, en particulier immunomodulateurs [7].

La complexité découle donc à la fois de la variabilité génétique du cancer de l'individu traité et du profil d'activité des médicaments, sans compter la variabilité interindividuelle en termes de pharmacocinétique, de comorbidités, de synergie ou d'antagonisme éventuel avec de possibles thérapeutiques concomitantes.

Au-delà du génome

Enfin, il faut préciser que l'évolution du cancer et les conséquences des mutations en son sein dépendent de très nombreux autres facteurs. En effet, il est aisé de comprendre qu'une mutation aura pour conséquence la fabrication d'une protéine dysfonctionnelle facilitant la carcinogenèse, mais une protéine peut dysfonctionner sans qu'il y ait nécessairement mutation du génome. Il peut y avoir des anomalies transcriptionnelles.

De ce point de vue, l'épigénome, à savoir les caractéristiques individuelles phénotypiques et non génétiques de nos cellules (une cellule musculaire ne fonctionne pas comme une cellule hépatique bien qu'elles soient toutes les 2 constituées du même génome), permet d'appréhender la complexité de la situation.

L'épigénome est constitué des protéines histones autour desquelles s'enroule l'hélice d'ADN. On parle de nucléosome pour les unités de base associant ces 2 composants. Tout ce petit monde s'enroule et forme la chromatine, donc les chromosomes. Une histone un tout petit peu "anormale" ne permettra pas à l'ARN messager de correctement dupliquer l'ADN et sera à l'origine d'une ou de plusieurs anomalies protéiques, pouvant jouer un rôle dans la carcinogenèse. Au travers de ces anomalies du code épigénétique

individuel, il est possible d'appréhender les raisons pour lesquelles un individu atteint du même cancer que son voisin, traité par le même protocole, aura un destin différent (influence de l'environnement, du sport, de l'obésité, etc.) (figure 3).

La recherche récente nous a également informés que, au-delà du génome et de l'épigénome, il pouvait y avoir des anomalies à tous les stades de fabrication d'une protéine, y compris à hauteur des ARN eux-mêmes (transcriptome), mais aussi au sein des cellules du microenvironnement tumoral, sans parler du rôle émergent des milliards de bactéries que nous abritons tous, humains et animaux, dans nos corps, à savoir le microbiote et pas seulement le microbiote intestinal.

Cette infinie complexité est aujourd'hui abordée via des études sur des séries de patients chez lesquels sont séquencées toutes les protéines du cancer et de son environnement (on parle de multi-omique et non plus seulement de génomique), et chez qui, via l'immunohistochimie, on tente d'identifier par ailleurs la localisation cellulaire et anatomique de l'ensemble de ces protéines. Ces données sont alors transmises à des logiciels d'intelligence artificielle en *deep learning*, afin de tenter d'identifier des sous-groupes de patients partageant des caractéristiques à la fois diagnostiques et pronostiques [8].

Au-delà d'une "individualisation thérapeutique", ce travail, après identification de caractéristiques faciles à rechercher et discriminantes, permettra certainement de classifier beaucoup plus finement les patients entre eux avec pour but ultime l'amélioration du pronostic.

Quelques bases théoriques sur les biopsies liquides

L'idée est de rechercher dans des liquides, et tout particulièrement le sang, les produits du métabolisme du cancer. En effet, notre métabolisme physiologique passe par l'élimination régulière de "déchets" dans le sang circulant. Le cancer, comme tous nos tissus, produit donc des déchets "métaboliques" éliminés, par exemple, dans le sang circulant. On y retrouve, pêle-mêle, les nucléosomes, des cellules tumorales dites circulantes, de l'ADN ou de l'ARN tumoral, des exosomes (vésicules éliminées par les cellules

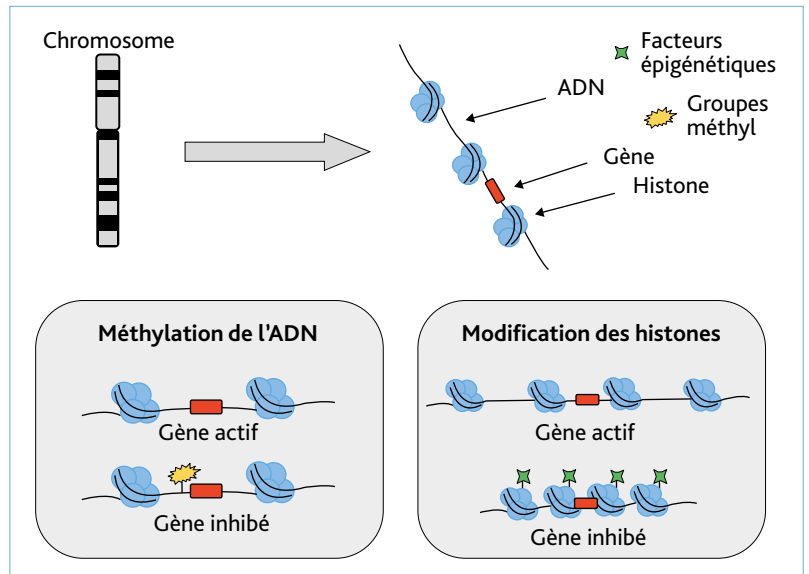


Figure 3. Illustration du rôle fonctionnel des histones dans la transcription de l'ADN.

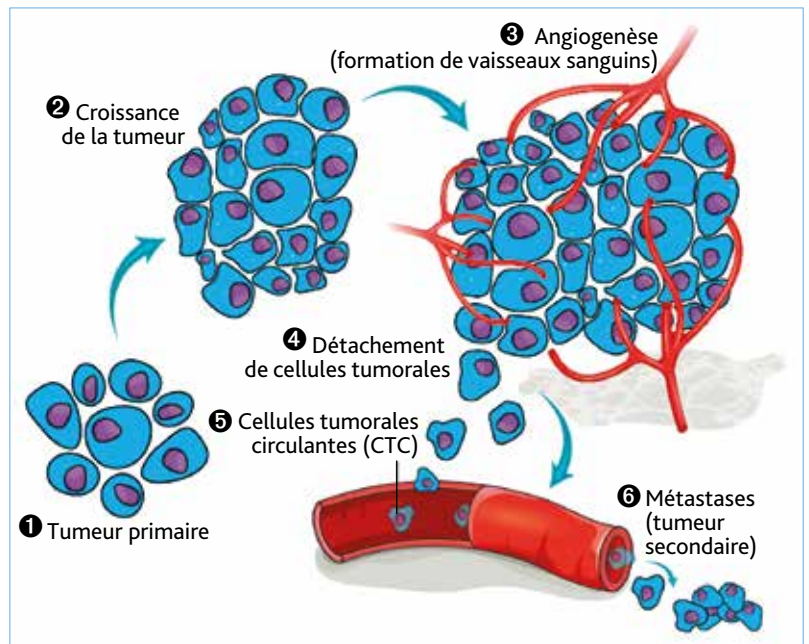


Figure 4. Cellules tumorales circulantes et processus métastatique.

pouvant elles-mêmes contenir ADN, ARN, etc.) (figures 4 et 5, p. 50) [9].

Il faut donc avant tout valider la corrélation entre la présence de ces produits métaboliques et le cancer du patient. Il faut ensuite identifier les meilleurs cibles à mesurer et valider leur intérêt diagnostique (précoce ou non) ou thérapeutique éventuel. L'idée est de pouvoir identifier un type tumoral sans passer par une biopsie, d'anticiper

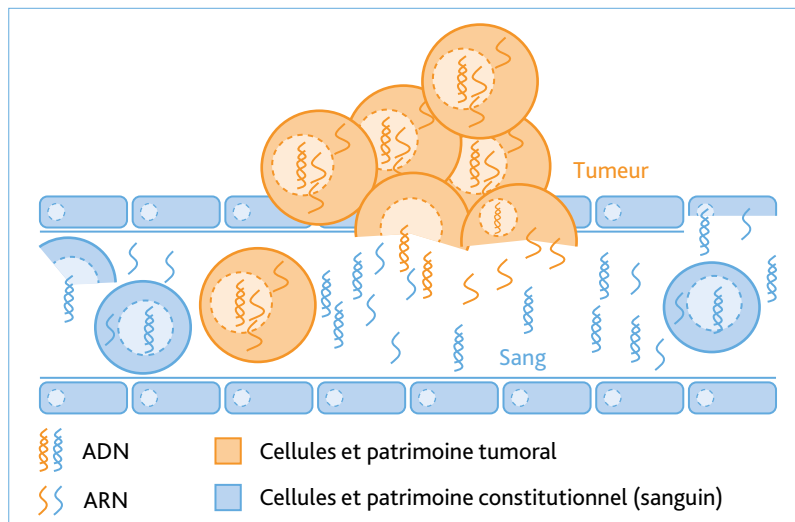


Figure 5. Illustration des composants recherchés en biopsie liquide.

le diagnostic facilement (dépistage), d'obtenir des éléments pronostiques quantitatifs, de permettre par la suite le suivi thérapeutique, la mise en maladie résiduelle, l'anticipation d'une éventuelle récurrence, etc. (figure 6).

Il est également possible de séquencer le génome du cancer puisqu'on peut recueillir son ADN ou son ARN. La biopsie liquide permet de plus, d'un point de vue théorique, une meilleure approche de l'hétérogénéité génétique tumorale étant donné que tous les clones tumoraux s'y retrouvent [9].

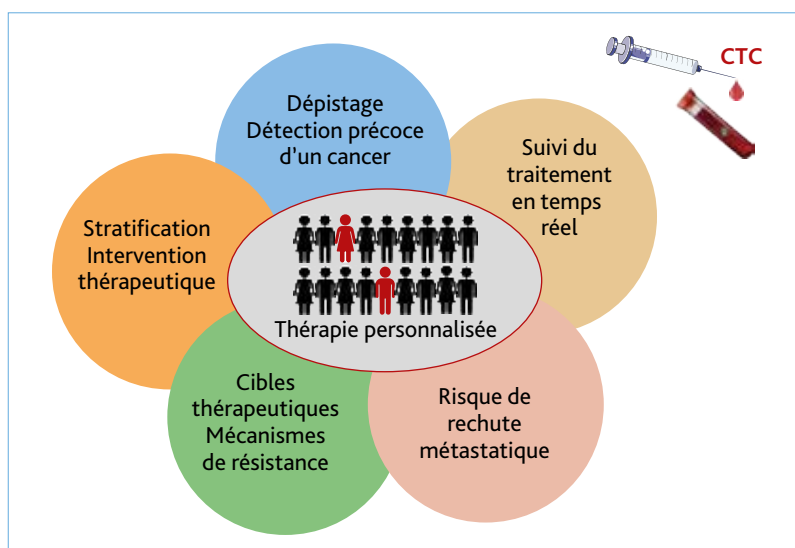


Figure 6. Place de la biopsie liquide dans les stratégies diagnostique et thérapeutique en oncologie.

Le terme de biopsie liquide en cancérologie apparaît surtout dans la seconde moitié des années 2000 avec une explosion des occurrences PubMed®. Des équipes françaises ont tout particulièrement participé à cet essor, notamment à Montpellier, par leur recherche sur les cellules tumorales circulantes, avec validation, par exemple, de leur intérêt dans la prise en charge des cancers du sein métastasés en 2020 [10].

Le séquençage tumoral en médecine vétérinaire

Les races canines découlent d'une sélection phénotypique par l'Homme à l'origine de la persistance chez ces dernières d'anomalies génétiques présentes chez les individus souches. Certaines races ont ainsi une prédisposition statistique à certains cancers, car elles sont porteuses de mutations somatiques favorisant.

Une équipe française a pu ainsi proposer un test génétique destiné aux Bouviers Bernois payant un lourd tribut au sarcome histiocytaire, afin de tenter de classer les reproducteurs en termes de risque [11].

Des mutations, connues chez l'Homme pour certains cancers, ont également pu être identifiées chez le chien, comme celle du gène BRAF, pouvant être recherchée en routine dans les urines chez les patients suspects de carcinome vésical à cellules transitionnelles ou de carcinome prostatique [12].

Trois sociétés proposent aujourd'hui 3 solutions différentes faisant appel au séquençage tumoral canin :

- la société FidoCure propose depuis 2019 de rechercher à partir de tissu formolé 55 mutations *driver* préalablement identifiées chez l'Homme, au sein de l'exome et du transcriptome ;
- la société Vidium propose depuis 2020 une approche similaire sur du tissu tumoral frais congelé ;
- la société PetDX propose depuis 2021 de séquencer l'ADN tumoral circulant à partir d'une prise de sang (cf. chapitre suivant).

À ce jour, FidoCure a séquencé 2700 tumeurs. Cette solution simple (séquençage à partir de lames paraffinées non colorées fournies par le laboratoire ayant réalisé l'histologie de la pièce

d'exérèse tumorale) permet d'identifier ou non la présence d'une ou de plusieurs mutations "actionnables" au sein du cancer du patient et de proposer parallèlement les options thérapeutiques qui en découlent, essentiellement des thérapies ciblées.

Cette stratégie repose sur la démonstration préalable que le profil mutagène des tumeurs canines est proche de celui de l'Homme, ce qui autorise à tenter d'identifier chez le chien les mêmes mutations que celles les plus fréquemment retrouvées chez l'Homme (figure 7) [13]. L'idée est d'accumuler des données clinicogénomiques, afin de mieux stratifier les patients en termes de stratégie thérapeutique. FidoCure a pu ainsi présenter des données en faveur d'un intérêt pronostique potentiel après thérapie ciblée consécutive au séquençage sur les mélanomes de la cavité buccale, les hémangiosarcomes, les carcinomes pulmonaires, etc. (figures 8, 9 et 10, p. 52) [14, 15].

Ces données restent préliminaires et reposent sur l'utilisation thérapeutique de molécules de thérapie ciblée dont les données pharmacocinétiques sont encore approximatives. Il s'agit toutefois d'une approche très intéressante, certes en grande partie empirique, mais qui permettra certainement de changer le paradigme de prise en charge de certains de nos patients. Cette approche empirique est parfaitement adaptée à la cancérologie vétérinaire qui ne peut pas bénéficier des études pharmacocinétiques médicamenteuses poussées réalisées en médecine humaine. Ainsi, l'utilisation quotidienne actuelle des différentes molécules de chimiothérapie en cancérologie vétérinaire a suivi peu ou prou le même chemin par le passé. Des solutions thérapeutiques anticancéreuses présentes sur le marché vétérinaire l'ont été après des études menées sur quelques dizaines de patients seulement. Par ailleurs, les essais d'utilisation des molécules anticancéreuses en médecine humaine prennent à l'heure actuelle des raccourcis identiques pour le plus grand bénéfice des patients.

J'ai ainsi personnellement séquencé les tumeurs de 35 patients avec identification de mutations "actionnables" chez 25 d'entre eux et mise en place d'une thérapie adaptée en conséquence sur 12 patients, soit

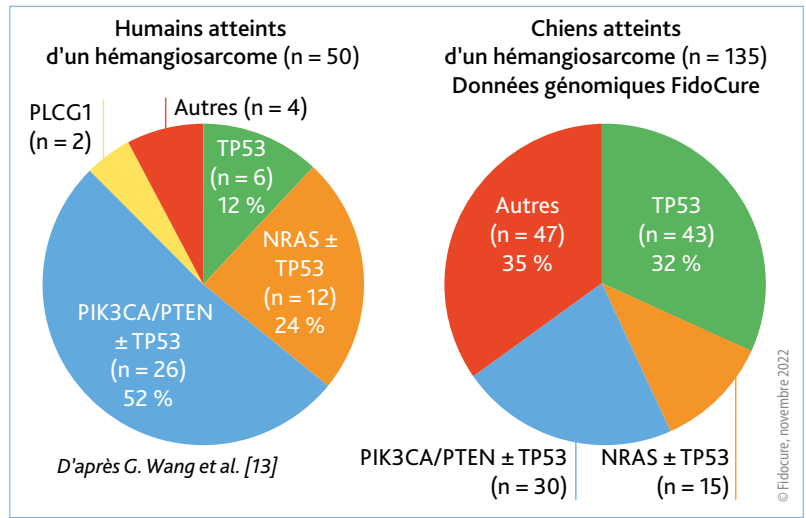


Figure 7. Comparaison des profils mutagènes des hémangiosarcomes humains et canins.

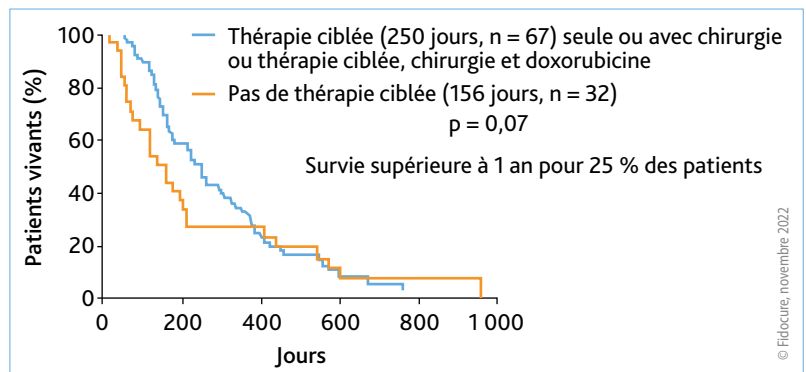


Figure 8. Héangiosarcome splénique : avantage significatif de l'utilisation d'une thérapie ciblée adjuvante postopératoire après séquençage versus chirurgie ou chirurgie + chimiothérapie.

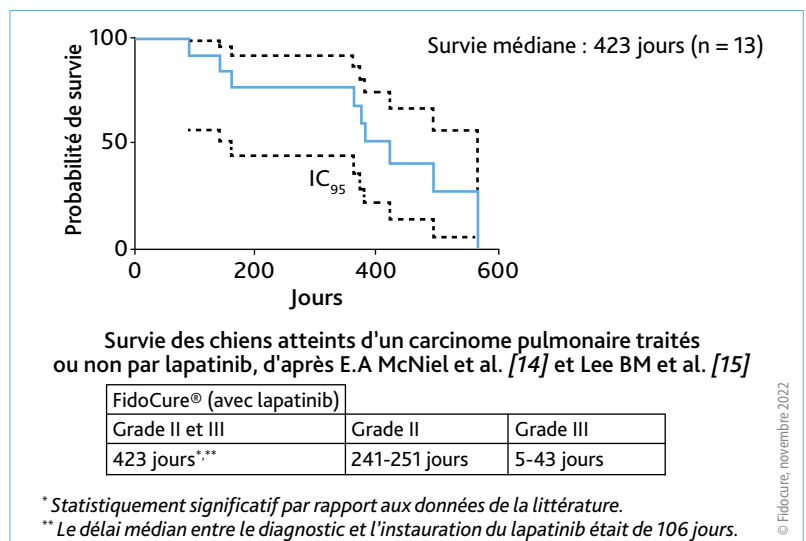


Figure 9. Carcinome pulmonaire : amélioration de la survie médiane des patients porteurs de la mutation HER2 de grade II ou III traités ou non par lapatinib.

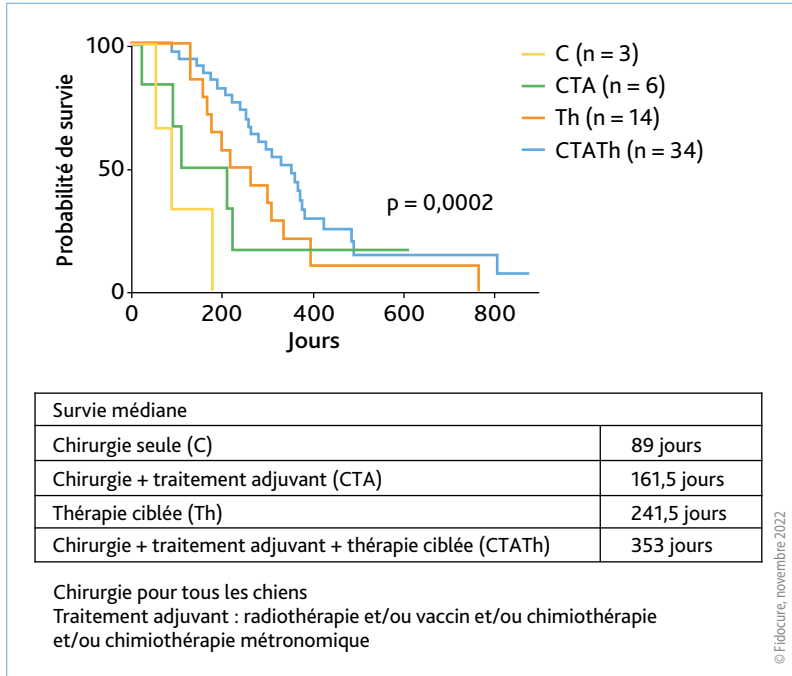


Figure 10. Mélanome malin de la cavité buccale : amélioration de la survie médiane avec la thérapie ciblée post-séquençage adjuvante après prise en charge thérapeutique classique.

environ un tiers. Les types tumoraux sont trop variés et l'échantillon trop restreint pour en tirer des conclusions générales. Toutefois, il faut noter la présence de mutations "actionnables" sur 100 % des carcinomes séquencés (6/6), 50 % des sarcomes des tissus mous séquencés (4/8), 75 % des lymphomes T séquencés (3/4) et 60 % des hémangiosarcomes spléniques séquencés (3/5). Ces mutations identifiées et la

thérapeutique qui en découle permettront-elles à terme une prise en charge optimisée de ces patients au pronostic très défavorable ? Il est encore trop tôt pour l'affirmer, mais tout porte à le croire et à l'espérer.

Les biopsies liquides en médecine vétérinaire

Deux sociétés proposent 2 solutions différentes qui font appel aux biopsies dites liquides :

- la société PetDX, séquençant l'ADN tumoral circulant à partir d'une prise de sang, a récemment publié l'étude CANDiD (à laquelle ont participé l'auteur et son équipe) menée sur 1100 chiens avec identification du type tumoral dans 55 % des cas et une spécificité de 85 % sur les lymphomes, hémangiosarcomes, ostéosarcomes [16] ;
- la société Volition propose un dosage des nucléosomes en biopsie liquide à partir d'une prise de sang. Les nucléosomes sont en effet présents en quantité significative en cas de cancer, mais aussi de sepsis ou de trauma. L'avantage de cette solution est, d'une part, l'absence de séquençage avec réalisation d'un simple test ELISA et, d'autre part, la possibilité d'accumuler des données quantitatives pronostiques. Une étude menée sur 528 chiens atteints d'un cancer et 134 chiens sains, récemment publiée, a validé l'identification de 48,7 % des cancers avec une spécificité de 97,0 % sur les lymphomes, hémangiosarcomes, mélanomes et sarcomes histiocytaires (figures 11-13) [17].

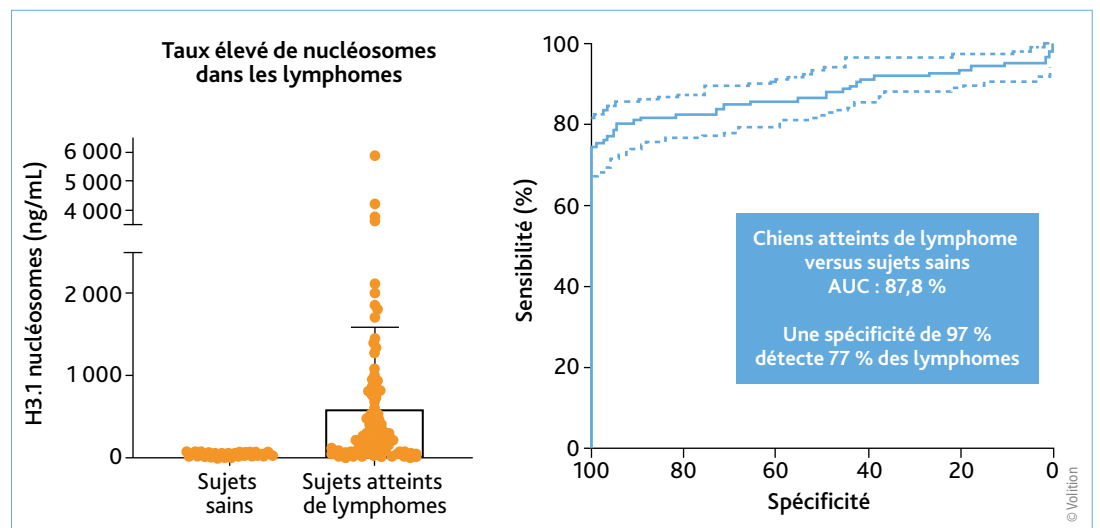


Figure 11. Comparaison du taux de nucléosomes entre chiens sains et chiens atteints d'un lymphome.

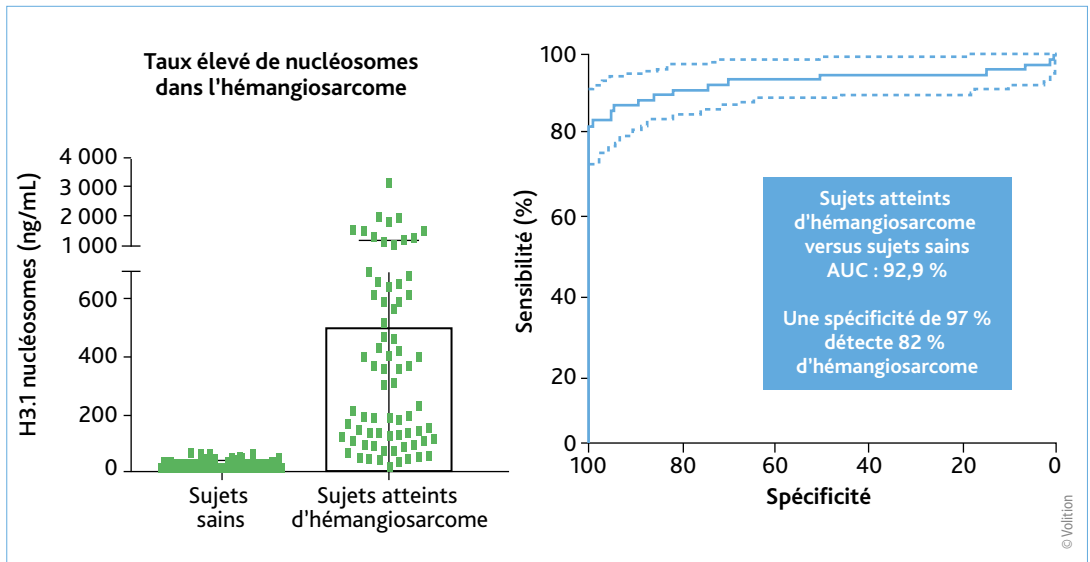


Figure 12. Comparaison du taux de nucléosomes entre chiens sains et chiens atteints d'hémangiosarcome.

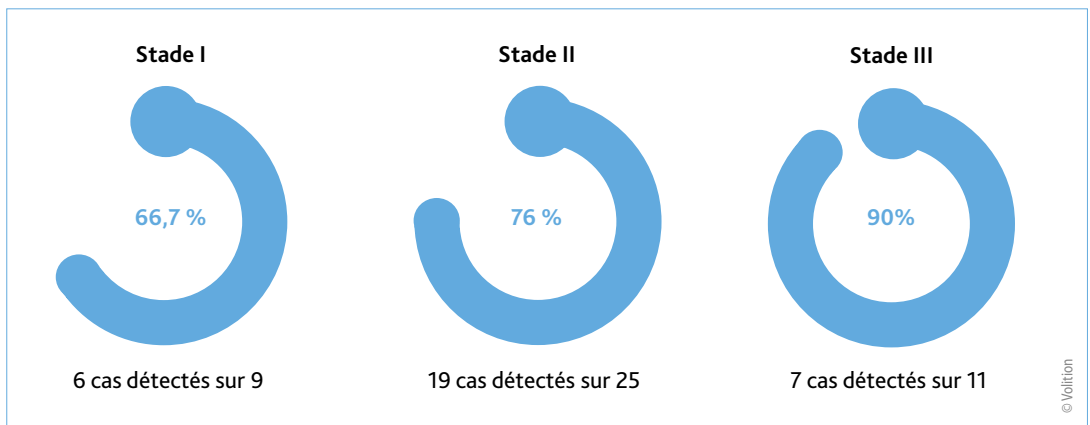


Figure 13. Pourcentage de chiens atteints d'hémangiosarcome détecté via le dosage des nucléosomes en fonction du stade clinique.

Ce dosage des nucléosomes dans vos cliniques, qui devrait être disponible au second semestre 2023, ouvre donc en cancérologie vétérinaire de nombreuses perspectives en termes de dépistage ou de diagnostic anticipé de certains cancers, et de suivi thérapeutique de nos patients traités.

Il est vraisemblable que cet examen, comme le séquençage évoqué préalablement, modifiera dans un avenir proche notre quotidien d'oncologues. Il s'agit toutefois d'un outil supplémentaire qui ne remplacera pas les autres examens complémentaires évoqués dans ce dossier, mais qui s'y ajoutera.

En l'absence de toute autre validation significative à ce jour, hormis les informations délivrées ci-dessus, un immense travail reste à faire pour que nous, oncologues vétérinaires, puissions fournir aux vétérinaires généralistes une méthodologie, validée scientifiquement, collégialement, pour tel ou tel cancer (et pas nécessairement pour tous les cancers) et, selon les cancers, soit pour le dépistage, soit pour l'aide au diagnostic, soit pour le suivi thérapeutique.

Conclusion

La recherche en cancérologie humaine connaît aujourd'hui une accélération sans précédent

dans le domaine du séquençage et des biopsies liquides qui, couplés aux techniques de la médecine de précision (par exemple, thérapie ciblée et anticorps monoclonaux), aux molécules d'immunothérapie récemment à disposition (par exemple, les inhibiteurs de points de contrôle) et à l'utilisation de logiciels d'intelligence artificielle, permet d'espérer à terme une prise en charge encore plus efficace des cancers les plus agressifs.

La situation en cancérologie vétérinaire est différente. Si nous ne pouvons pas bénéficier des investissements destinés à la recherche en médecine humaine, nous pouvons tenter de comprendre les progrès actuels afin d'identifier et de développer des solutions pratiques et simples adaptées à nos patients et au modèle économique qui est le nôtre. De ce point de vue, les solutions proposées par FidoCure et Volition sont assez paradigmatiques de cette approche et semblent déjà pouvoir modifier à court terme notre quotidien d'oncologues vétérinaires.

Même si le bout du chemin paraît très éloigné, la recherche et les efforts interdisciplinaires immenses récemment entrepris ont d'ores et déjà eu le mérite d'identifier ce chemin. ●

Olivier Keravel déclare ne pas avoir de liens d'intérêts en relation avec cet article.

POINTS CLÉS

- Le séquençage des tumeurs et les biopsies liquides permettent d'espérer une prise en charge personnalisée de nos patients dans l'avenir.
- Ces nouveaux outils modifieront vraisemblablement à court terme notre quotidien d'oncologues.
- Ils devraient permettre une prise en charge encore plus efficace des cancers les plus agressifs.

Références bibliographiques

1. Lee S, Kasif S. The complete genome sequence of a dog: a perspective. *Bioessays* 2006;28(6):569-73.
2. Slatko BE et al. Overview of next-generation sequencing technologies. *Curr Protoc Mol Biol* 2018;122(1):e59.
3. Costa FF. Non-coding RNAs: meet thy masters. *Bioessays* 2010;32(7):599-608.
4. Espinal AC et al. A methodological study of genome-wide DNA methylation analyses using matched archival formalin-fixed paraffin embedded and fresh frozen breast tumors. *Oncotarget* 2017;8(9):14821-9.
5. Hedegaard J et al. Next-generation sequencing of RNA and DNA isolated from paired fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples of human cancer and normal tissue. *PLoS One* 2014;9(5):e98187.
6. Webster JD et al. Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer* 2006;6:85.
7. Komi DEA, Redegeld FA. Role of mast cells in shaping the tumor microenvironment. *Clin Rev Allergy Immunol* 2020;58(3):313-25.
8. Chen RJ et al. Pan-cancer integrative histology-genomic analysis via multimodal deep learning. *Cancer Cell* 2022;40(8):865-878.e6.
9. Chibuk J et al. Horizons in veterinary precision oncology: fundamentals of cancer genomics and applications of liquid biopsy for the detection, characterization, and management of cancer in dogs. *Frontiers Vet Sci* 2021;8:664718.
10. Cayrefourcq L, Alix-Panabières C. Clinical relevance of liquid biopsy in breast cancer: update in 2020. *Expert Rev Mol Diagn* 2020;20(9):913-9.
11. Prouteau A et al. Interest of circulating tumor DNA as a biomarker for canine cancers: illustration in histiocytic sarcoma, oral malignant melanoma and multicentric lymphoma. *Biorxiv* 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.10.189118>
12. Mafalda Rasteiro A et al. Molecular markers in urinary bladder cancer: applications for diagnosis, prognosis and therapy. *Vet Sci* 2022;9(3):107.
13. Wang G et al. Molecular subtypes in canine hemangiosarcoma reveal similarities with human angiosarcoma. *PLoS One* 2020;15(3):e0229728.
14. McNiel EA et al. Evaluation of prognostic factors for dogs with primary lung tumors: 67 cases (1985-1992). *J Am Vet Med Assoc* 1997;211(11):1422-7.
15. Lee BM et al. Retrospective evaluation of a modified human lung cancer stage classification in dogs with surgically excised primary pulmonary carcinomas. *Vet Comp Oncol* 2020;18(4):590-8.
16. Flory A et al. Clinical validation of a next-generation sequencing based multi-cancer early detection "liquid biopsy" blood test in over 1,000 dogs using an independent testing set: the CANcer Detection in Dogs (CANDiD) study. *PLoS One* 2022;17(4):e0266623.
17. Wilson-Robles HM et al. Evaluation of plasma nucleosome concentrations in dogs with a variety of common cancers and in healthy dogs. *BMC Vet Res* 2022;18(1):329.



ANALYSES GÉNOMIQUES EN CANCÉROLOGIE HUMAINE

Karen Leroy
(Hôpital européen Georges-Pompidou ;
Université Paris Cité).

Au cours des 15 dernières années, nous avons assisté à une véritable révolution dans le domaine des analyses génomiques en cancérologie humaine. Les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs étaient connus depuis les années 1970-1980 et les translocations pathognomoniques de certains cancers, notamment de lymphomes et de sarcomes, étaient recherchées par des techniques de cytogénétique classique ou moléculaire depuis les années 1990. La découverte de l'efficacité clinique d'une petite molécule, l'imatinib, bloquant l'activité oncogénique de la protéine de fusion BCR-ABL à l'origine des leucémies myéloïdes chroniques, a ouvert la voie à la médecine dite "personnalisée" ou "de précision".

Au cours des années 2000-2010, on s'est rendu compte que certaines mutations étaient associées à la sensibilité ou à la résistance à des thérapies dites "ciblées" dans les tumeurs solides: mutations des gènes KRAS et NRAS associées à une résistance aux anticorps anti-EGFR dans les cancers colorectaux; mutations du gène EGFR des cancers bronchiques non à petites cellules, associées à une sensibilité aux inhibiteurs d'EGFR; mutation BRAFV600E des mélanomes pouvant être ciblée par des petites molécules inhibant spécifiquement la kinase mutée. Il a vite été montré que les traitements ciblant les altérations génétiques associées à une forte "dépendance" oncogénique font mieux en termes de survie sans progression, de survie globale et de toxicité que les traitements conventionnels de chimiothérapie.

Parallèlement à la découverte de ces altérations spécifiques et au développement clinique de molécules thérapeutiques, les techniques d'étude du génome humain ont connu des avancées spectaculaires:

- développement de techniques de PCR (*polymerase chain reaction*) en temps réel permettant de quantifier des cibles moléculaires définies (mutations, réarrangements géniques) de manière rapide, spécifique et très sensible;
- développement de techniques de séquençage à très haut débit, souvent appelé "séquençage de nouvelle génération", permettant d'élargir très largement le nombre de gènes séquencés pour aller jusqu'au génome entier, augmenter la sensibilité de détection des mutations jusqu'à des fractions de plus en plus petites (actuellement inférieures à 1 % en routine), augmenter la rapidité d'obtention des résultats tout en diminuant drastiquement les coûts de la base séquencée;
- développement des outils d'analyse des ARN permettant d'avoir une vision globale des transcrits produits dans un tissu.

En même temps que se mettaient en place des tests génétiques de routine, il y a eu de grands projets de recherche "multiomique" collaboratifs nationaux et internationaux analysant de manière globale le génome, le transcriptome, la méthylation de l'ADN dans de nombreux types de cancers différents: les projets ICGC (International Cancer Genome Consortium), TCGA (Tumor Cancer Genome Atlas) et le projet CIT (Carte d'identité

des tumeurs) en France, par exemple. Ces études ont permis de mieux comprendre l'hétérogénéité tumorale, de classer les tumeurs en sous-groupes basés sur un rationnel biologique, d'identifier des mécanismes de carcinogenèse et de nouvelles cibles thérapeutiques, et les informations acquises au travers de ces projets ont été déposées sur des portails en accès libre au service de la communauté médicale et scientifique. Les outils "derniers cris", qui restent encore du domaine de la recherche, sont des analyses de l'épigénome à l'échelle du génome entier (identification des séquences régulatrices), les analyses de transcriptome à l'échelle de la cellule unique ou associées à une cartographie tissulaire précise, le séquençage de très longs segments d'ADN.

Aujourd'hui, il est devenu "normal" de rechercher des altérations génétiques spécifiques (mutations, amplifications, réarrangements) au diagnostic de certains cancers, de les rechercher dans le tissu fixé correspondant à la biopsie ou la pièce opératoire, le sang ou d'autres liquides biologiques; il est devenu "normal" d'analyser des signatures transcriptomiques (expression de certains ARN) associées au pronostic du cancer du sein pour décider, dans certaines situations cliniques bien définies, de l'utilité d'un traitement adjuvant; il est devenu "normal" de proposer à certains patients un séquençage d'un grand panel de gènes associé au séquençage des ARN tumoraux pour identifier une cible thérapeutique, inclure le patient dans un essai clinique, et discuter des résultats lors d'une réunion de concertation pluridisciplinaire dite "moléculaire".

La France a mis en place dans les dernières années un plan "France Médecine Génomique 2025" qui s'appuie sur 2 grandes plateformes de séquençage nationales (AURAGEN et SeqIOA). Ces plateformes réalisent des analyses pangénomiques (séquençage du génome complet, séquençage de l'exome et du transcriptome) pour des patients atteints de maladies rares, de cancers rares ou en échec de traitement, afin de permettre à ces outils de génomique "dernière génération" de prendre leur place dans l'approche clinique. Les développements récents des techniques d'analyse génomique se concentrent sur la détection de fractions infimes d'ADN tumoral circulant pour le dépistage présymptomatique des cancers et le suivi de la maladie résiduelle afin d'adapter les traitements adjuvants dans les stades localisés.

L'intelligence artificielle est utilisée pour gérer les données gigantesques issues de ces analyses omiques, identifier des "signatures" d'intérêt pronostique ou prédictif de réponse aux traitements, savoir reconnaître un déficit de recombinaison homologue à la lecture d'un profil de séquençage génomique large par exemple. Une des applications intéressantes de l'intelligence artificielle consiste à définir la probabilité d'une mutation en fonction de l'aspect histologique d'une lésion. Et ce n'est qu'un début, car le champ d'exploration est immense. Les analyses génomiques, mais aussi protéomiques (non abordées ici) ont pris toute leur place en cancérologie humaine, tant dans le domaine du soin que de la recherche au cours des 15 dernières années. Il n'y a pas à douter qu'elles seront très vite incontournables en cancérologie vétérinaire, avec un transfert rapide des données de la recherche vers le diagnostic et la thérapeutique.

CANCÉROLOGIE

Que retenir de la place des examens complémentaires en cancérologie ?

Olivier Keravel

Eiffelvet, Paris.



Référence de l'article :
Méd Chir Anim – Anim Cie
2023;6:56.

Nous espérons que ce dossier aura pu vous aider à clarifier l'état actuel des connaissances sur les examens complémentaires en cancérologie, un domaine en perpétuelle évolution, tout particulièrement au cours de la décennie écoulée.

Savoir par où commencer sans faire d'erreur stratégique est donc primordial. Vient ensuite la collecte d'informations via le bilan d'extension, au scanner le plus souvent. Au cours de ce bilan, les ganglions doivent être explorés, même si à ce jour la recherche du ganglion sentinelle en médecine vétérinaire n'a pas encore prouvé son impact clinique et semble donc difficile à recommander en routine. Au contraire, il existe plusieurs marqueurs intéressants et validés par la littérature que nous vous avons détaillés. La collaboration étroite avec le pathologiste prend ensuite toute sa place et demande de la part du clinicien une connaissance (que nous avons tenté de vous synthétiser) a minima des possibilités offertes au quotidien en cytologie, histologie, immunohistochimie, etc. Enfin, au travers du séquençage et des biopsies liquides nous percevons le futur de la cancérologie vétérinaire.

Quoi qu'il en soit, il faut absolument retenir l'importance de la prise en charge précoce et adaptée en cancérologie, grâce à des examens complémentaires spécifiques, seule solution pour espérer un contrôle qualitatif et durable une fois les thérapies mises en place.

Le corollaire est la reconnaissance du rôle pivot du vétérinaire généraliste et l'absolue nécessité de maintenir le lien entre généralistes et spécialistes pour le bien de nos patients et de leurs propriétaires, nos clients. Ces examens complémentaires correctement mis en place permettront à l'oncologue d'établir une stratégie thérapeutique "personnalisée" optimale.

Nos futurs dossiers consacrés à la cancérologie s'attacheront à vous faire découvrir ces différentes solutions thérapeutiques. ●

Olivier Keravel déclare ne pas avoir de liens d'intérêts en relation avec cet article.



Prochain **numéro**

Parution **en avril**

Dossier :

Questions/réponses en dermatologie

Coordonné par le Dr Emmanuel Bensignor (Oniris)

Abonnez-vous sur www.edimark.fr ou p. 4