

**ECOLE NATIONALE VETERINAIRE
DE TOULOUSE**

ANNEE 2001

**Immunohistochimie des tumeurs mésoenchymateuses
cutanées à cellules fusiformes du chat (Complexe du
Fibrosarcome Félin): études préliminaires de marqueurs de
différenciation.**

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

Aurélia HERBET
née le 31 décembre 1971 à Clichy La Garenne (Haut de Seine)

REMERCIEMENTS

A M. le Professeur Delverdier, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, qui m'a proposé ce travail, pour son aide durant mes années d'études et pour l'intérêt qu'il a su faire naître en moi pour la pathologie,

A M. le Professeur Cabanié, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, qui m'a fait connaître le milieu de la toxicologie et de l'évaluation du médicament,

Au Laboratoire d'Anatomie pathologique du Sud-Ouest (Drs Poujade et Degorces), qui m'a aimablement donné accès à son matériel biologique,

A mes parents et grands-parents pour leur confiance et leur soutien,

A Mike pour son amour et sa patience,

A Marie Amardheil pour son amitié et son initiation à l'immunohistochimie,

A mes amis.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	9
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE CFF	13
1. ETIOLOGIE	15
1.1. Les fibrosarcomes viro-induits:	15
1.2. Les sarcomes solitaires:	15
2. EPIDEMIOLOGIE	18
2.1. Fréquence globale de chaque type tumoral:	18
2.2. Influence de l'âge:	18
2.3. Influence du sexe:	19
2.4. Influence de la race:	19
3. ASPECTS CLINIQUES	20
3.1. Caractéristiques macroscopiques:	20
3.2. Localisation:	20
3.3. Evolution:	21
4. HISTOLOGIE	22
5. PREVENTION	23
6. TRAITEMENT	25
7. PRONOSTIC	26
MISE AU POINT D'UN PANEL DE MARQUEURS DE DIFFERENCIATION SUR COUPES EN PARAFFINE POUR L'IMMUNOPHENOTYPAGE DES TUMEURS DU CFF	29
1. MATERIELS ET METHODES	31
1.1. Animaux et nature des prélèvements:	31
1.2. Anticorps:	34
1.3. Traitement des prélèvements:	35
1.3.1. <i>Fixation, inclusion en paraffine et coupe:</i>	35
1.3.2. <i>Coloration à l'Hémalun-Eosine:</i>	35
1.3.3. <i>Etude immunohistochimique:</i>	35
1.3.3.1. Etapes précédant la technique immunohistochimique:	35
1.3.3.2. Réaction immunohistochimique:	37
1.3.3.3. Contrôles:	38
1.3.3.4. Lecture et interprétation des lames:	39
2. RESULTATS	41
2.1. Diagnostic histologique:	41
2.1.1. <i>Classification des SCF en histologie conventionnelle:</i>	41
2.1.2. <i>Corrélations épidémiolo-lésionnelles:</i>	42
2.2. Diagnostic immunohistochimique:	42
2.2.1. <i>Immunomarquage des tissus sains:</i>	42
2.2.2. <i>Immunomarquage des SCF:</i>	45
2.3. Confrontation des résultats histologiques et immunohistochimiques:	47
3. DISCUSSION	49
3.1. Limites et reproductibilité de la méthode:	49
3.1.1. <i>Non-représentativité de l'échantillon:</i>	49
3.1.2. <i>Facteurs de variation liés à la technique:</i>	49
3.1.3. <i>Facteurs de variation liés à la lecture:</i>	50

3.2. Epidémiologie-clinique:	51
3.3. Choix des anticorps:	51
3.4. Classification histologique/classification immunohistologique:.....	54
3.5. Perspectives:	55
CONCLUSION	57
REFERENCES	61
ANNEXES	69
-Annexe 1- “Education/communication history and current status”	71
-Annexe 2- Tampon phosphate salin (PBS)/ Tampon citrate	74
-Annexe 3- Résultats de l’immunomarquage des 35 SCF	75
-Annexe 4- L’anticorps anti-actine musculaire spécifique (HHF35)	76
-Annexe 5- L’anticorps anti-antigène myéloïde/histiocyte (MAC387)	77
-Annexe 6- L’anticorps anti-neurone spécifique enolase (NSE).....	78
-Annexe 7- L’anticorps anti-protéine S100 (S100)	79
-Annexe 8- L’anticorps anti-protéine neurofilament (NF)	80
-Annexe 9- L’anticorps anti-protéine gliale fibrillaire acide (GFAP).....	81
-Annexe 10- L’anticorps anti-cellules B-lymphocytaires (CD79a cg).....	82
ILLUSTRATIONS	83

LISTES DES ABREVIATIONS UTILISEES

CFF.....	Complexe du Fibrosarcome Félin
FHM.....	Fibrohistiocyte malin
FN.....	Fasciite nodulaire (Fibromatose)
FS.....	Fibrosarcome
FSNV.....	Fibrosarcome non vaccinal
FSV.....	Fibrosarcome vaccinal
IN.....	Indéterminés
INTERS.....	Interscapulaire
LE.....	Léiomyosarcome
SC.....	Schwannome
SCF.....	Sarcomes cutanés à Cellules Fusiformes
SNC.....	Système nerveux central
SNP.....	Système nerveux périphérique
SNV.....	Sarcome non vaccinal
SV.....	Sarcome vaccinal

INTRODUCTION

Depuis quelques années, il est rapporté une hausse sensible de l'incidence des sarcomes cutanés félines à cellules fusiformes (SCF). Ces SCF représenteraient 12 à 41% des tumeurs cutanées félines^{10,18,19,22,33,56,70,78}. Les tumeurs du "complexe fibrosarcome félin" (CFF) (fibrosarcomes, fasciites nodulaires et fibrohistiocytomes malins) appartenant à ce grand groupe en représentent le premier type tumoral. Mais d'autres tumeurs de nature mésoenchymateuse à cellules fusiformes telles des tumeurs dérivant du tissu nerveux (schwannomes) ou du tissu musculaire (léiomyosarcomes) ou tout simplement les sarcomes indifférenciés sont à prendre en compte car faisant partie du diagnostic différentiel des tumeurs du CFF.

Cependant l'étiologie et les facteurs de prédisposition de ces néoplasies restent mal connus. En plus d'une origine virale (FeSV) probable pour certains fibrosarcomes, des études épidémiologiques ont mis en évidence une corrélation entre la survenue de ces SCF et un taux accru de vaccination^{21,40,66}. La persistance d'un processus réactionnel inflammatoire et immunologique associé à la présence d'adjuvants vaccinaux aux sites d'injection prédisposerait à une exacerbation de la réponse cicatricielle du tissu conjonctif, favorisant ainsi l'apparition d'un processus tumoral³³.

Le développement de ces sarcomes aux sites d'injection vaccinaux est à l'origine d'un sérieux dilemme relationnel auquel se heurte le vétérinaire. En effet les messages alarmistes que passent les médias à ce sujet tendent à réduire le pourcentage de vaccinations félines, exposant ainsi nos compagnons à de sérieux problèmes infectieux⁶⁶.

Bien que ces SCF présentent des similitudes sur le plan clinique, ils constituent un groupe très hétérogène en ce qui concerne leurs constituants. La principale caractéristique microscopique qu'ils partagent est la présence de cellules fusiformes qui attestent de leur origine mésoenchymateuse. Leur pléomorphisme fréquent amène à donner un même diagnostic de SCF mais laisse la dénomination exacte de la tumeur aléatoire. Leur identification difficile au plan histogénétique rend donc le pronostic et l'orientation thérapeutique problématiques⁴⁹. Fort heureusement, les immunomarquages sont susceptibles d'apporter une contribution à ce diagnostic. L'existence d'anticorps destinés à l'identification phénotypique des cellules mésoenchymateuses, développés à l'origine pour l'espèce humaine, permet aujourd'hui d'accéder à de nouveaux critères de classification des tumeurs. Cette classification s'affranchit des morphotypes pour s'attacher à la mise en évidence de caractères cellulaires biochimiques et biologiques.

Après une brève synthèse bibliographique sur le CFF, le but de cette étude sera donc l'évaluation, sur des prélèvements collectés dans des laboratoires d'Anatomie pathologique vétérinaire, d'un

panel restreint d'anticorps spécifiques. Ces anticorps sont dirigés contre des antigènes spécifiques de lignées cellulaires et généralement préservés durant le processus de différenciation tumorale.

Nous espérons ainsi valider l'utilisation de ces marqueurs de différenciation afin de permettre la diffusion d'un outil simple et efficace dans le domaine du diagnostic en Anatomie pathologique vétérinaire et d'offrir au clinicien un pronostic plus précis.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE CFF

1. ETIOLOGIE

Le CFF regroupe un ensemble de tumeurs et pseudo-tumeurs du tissu mésenchymateux, se développant préférentiellement chez le chat au niveau du tissu conjonctif cutané et sous-cutané. Il regroupe des proliférations pour la plupart malignes issues :

- des fibroblastes : avec principalement le fibrosarcome (FS) et la fasciite nodulaire (ou fibromatose) (FN),
- des histiocytes : avec essentiellement le fibrohistiocytome malin (FHM),
- de cellules indifférenciées ou peu différenciées : sarcomes indifférenciés.

Les sarcomes cutanés du CFF peuvent être en général classés sous deux grands groupes selon leur étiologie: les sarcomes viro-induits et les autres qui sont soit d'origine vaccinale soit d'origine non vaccinale et alors d'origine inconnue.

1.1. Les fibrosarcomes viro-induits:

Ces sarcomes sont imputables au virus FeSV: Feline Sarcoma Virus, qui peut être retrouvé dans la tumeur, elle-même, mais aussi dans la moelle osseuse, les nœuds lymphatiques mésentériques, le thymus, la rate et les glandes salivaires des animaux atteints. Dans les cas de fibrosarcomes spontanés, le FeSV est toujours associé au virus leucémogène félin (FeLV). Le FeSV serait un virus recombinant qui se forme quand le virus FeLV s'associe à des proto-oncogènes félines⁷. Ces deux virus sont des oncornavirus (Retroviridae) à ARN monocaténaire.

1.2. Les sarcomes solitaires:

Dans cette catégorie, on distingue ceux qui sont situés aux zones habituelles d'injections vaccinales (sarcomes vaccinaux (SV)) et ceux situés sur des sites distincts (sarcomes non vaccinaux (SNV)). Dans ces deux catégories, on retrouve tous les types histologiques du CFF, c'est à dire le FS, le plus fréquent, le FHM, la FN et autres sarcomes indifférenciés.

Alors que l'origine des SNV demeure encore inconnue, de nombreux facteurs ont été incriminés dans le développement des SV et parmi ceux-ci, la présence d'adjuvants vaccinaux, la taille de l'aiguille, l'utilisation de seringues usagées, la température du vaccin, l'agitation ou non de la seringue ou même la présence d'air injecté au moment de l'injection. La présence de particules d'aluminium (hydroxyde d'aluminium ou phosphate d'aluminium) dans les adjuvants vaccinaux a d'abord été reliée à l'apparition des SV. En plus d'un effet tumorigène, l'aluminium induirait des réactions inflammatoires chroniques et la formation de granulomes aux sites d'injection

susceptibles d'induire une prolifération incontrôlée de fibroblastes et de myofibroblastes résidents, chez des chats génétiquement prédisposés³⁵. Cependant des SV ont été observés sur des chats ayant reçu des vaccins à base d'adjuvants ne contenant pas d'aluminium⁴⁸; l'aluminium ne serait peut être alors que le marqueur d'une vaccination antérieure et d'autres composants du vaccin pourraient induire une réaction inflammatoire ou renforcer le processus inflammatoire qui résulterait alors en un néoplasme⁴⁷. Les SV sont d'ailleurs histologiquement similaires aux tumeurs mésoenchymateuses oculaires post-traumatiques du chat, suggérant une pathogénie commune (inflammation et cicatrisation) pour ces deux types tumoraux⁴⁷. Donc le rôle spécifique de l'aluminium, tout comme celui d'autres facteurs susceptibles d'induire un processus néoplasique (agents chimiques ajoutés pour inactiver les virus, contaminants viraux, facteurs de cultures cellulaires (Epidermal growth factor, sérum bovin foetal...)) utilisés lors de la manufacture de ces produits, reste obscur. L'injection elle-même, en effet, cause une réaction inflammatoire dans laquelle des facteurs de croissance similaires à ceux utilisés dans la production du vaccin sont libérés au site de vaccination (PDGF par exemple)^{32,45}. Les facteurs de croissance sont en effet essentiels pour la régulation des événements cellulaires impliqués dans la formation du tissu de granulation et de la cicatrisation et depuis plus de 100 ans, il est reconnu que l'inflammation et/ou le processus de cicatrisation sont des promoteurs du développement tumoral.

De plus, il est reconnu que ce sont surtout les vaccins anti-rabiques et anti-FelV avec adjuvants et sans adjuvants qui sont incriminés dans l'apparition des SV^{13,29,32,46,48}. Les protéines virales contenues dans les vaccins pourraient probablement moduler certains facteurs de croissance et cytokines qui contribueraient au développement tumoral⁴⁸. Bien que les SV ne semblent pas liés de façon certaine au virus de la leucose féline (FeLV) ou au virus de l'immunodéficience féline (FIV), un lien éventuel entre un rétrovirus félin incomplet et les SV ne peut être écarté. De plus, de nombreux oncogènes provoquent le cancer en codant pour des facteurs de croissance et en causant la surexpression de ces derniers ou de leurs récepteurs (v-sis code pour Platelet-derived growth factor (PDGF); v-erb code pour l' Epidermal growth factor receptor (EGFR)). Des études préliminaires impliquant une identification immunohistochimique et la localisation de facteurs de croissance et de leurs récepteurs dans les lésions sarcomateuses vaccinales ont montré que les SV avaient une réaction positive faible à forte pour le PDGF et son récepteur alors que les sarcomes non vaccinaux étaient négatifs³². Curieusement, les lymphocytes dans les SV étaient positifs pour PDGF et les lymphocytes dans les SNV et les nœuds lymphatiques normaux ou les follicules lymphoïdes (plaques de Peyer) étaient négatifs alors que les macrophages étaient positifs. Les cellules néoplasiques proches de ces lymphocytes étaient fortement marquées pour le récepteur du

PDGF. Ces observations laisseraient penser que les lymphocytes des SV sécrètent PDGF pour recruter des macrophages et causer la prolifération mésenchymateuse.

De même, l'expression de c-jun a été examinée. Il s'agit d'un proto-oncogène qui code pour une protéine transcriptionnelle AP-1 qui a un rôle dans la prolifération cellulaire et l'oncogénèse in vitro. Un homologue de c-jun, comme v-jun, a été reconnu être oncogène dans les modèles de sarcomes post-traumatiques aviaires et murins. Les SV semblent fortement positifs pour c-jun alors que les SNV ne le sont pas. Donc, en plus d'une augmentation de la stimulation de facteur de croissance par les lymphocytes, les SV surexprimeraient l'oncogène c-jun³².

A l'heure actuelle, il semblerait que le FeSV n'ait pas de rôle selon les données de deux études épidémiologiques et d'une analyse immunohistochimique et PCR²¹ dans lesquelles le FeLV n'est pas détecté dans les sarcomes vaccinaux. Cependant, des études épidémiologiques ont montré que l'administration de vaccins anti-rabiques est associée à un risque plus faible de formation de SV que ne l'est l'administration de vaccins anti-FeLV. Peut être qu'en plus de la présence d'un processus inflammatoire, une stimulation antigénique spécifique renforce le processus carcinogène. Certaines tumeurs qui se développent aux sites d'infestation parasitaires chez l'Homme et les animaux sont liées à une stimulation antigénique parasite-spécifique associée à un processus inflammatoire^{47,48}. Dans ce cas, on peut penser que des antigènes du FeLV présents dans les vaccins sont capables d'induire des cytokines ou des facteurs de croissance favorables à une croissance tumorale. La pathogénie des SV est donc complexe et bien que des efforts dans la recherche de cause à effet de la réaction inflammatoire soient menés, on ne peut pas écarter non plus une susceptibilité individuelle de chaque chat à produire une transformation maligne.

Il est à remarquer que d'autres tumeurs n'appartenant pas au CFF, mais plus globalement aux sarcomes des tissus mous, sont susceptibles de se développer sur des sites vaccinaux.

2. EPIDEMIOLOGIE

2.1. Fréquence globale de chaque type tumoral:

Selon la majorité des auteurs, les tumeurs les plus fréquentes chez le chat concernent les organes hématolymphopoiétiques avec des valeurs de 22 à 42.8%. Ensuite la peau et le tissu conjonctif sont les organes les plus touchés. Sur l'ensemble des tumeurs de la peau et du tissu sous-cutané, la plupart des études s'accordent sur le fait que quatre types de tumeurs seulement sont quantitativement majoritaires : l'épithélioma basocellulaire, le carcinome épidermoïde, le mastocytome et le fibrosarcome. Ils représentent à eux seuls 60 à 77% des tumeurs cutanées et sous-cutanées.

La fréquence des FS, toutes catégories confondues (cutanés et non cutanés), représenterait 2 à 12% des tumeurs félines avec une moyenne de 4.5%. Elle se situerait dans une fourchette de 10 à 43% des tumeurs de la peau et du tissu conjonctif sous-cutané, avec une moyenne sur l'ensemble des études de 20 à 25%. On estime leur incidence annuelle de 10 à 20 pour 100000 chats.

En ce qui concerne plus particulièrement les FSV, leur prévalence varie de 1/1000 à 1/10000 chats vaccinés^{29,47} et leur fréquence, estimée à 4%, est en pleine expansion depuis la fin des années 80 alors que celle des FSNV reste stationnaire.

Les FS viro-induits (multicentriques) seraient beaucoup plus rares que les formes solitaires (40 fois moins fréquents) et ne représentent ainsi que 2% des FS chez le chat.

Le FHM est une tumeur beaucoup plus rare que la précédente, sa fréquence serait de 2.6 %. Aucun chiffre n'est donné pour la FN et les sarcomes indifférenciés, qui restent rares¹².

2.2. Influence de l'âge:

Excepté les FS viro-induits³¹, que l'on observe chez les jeunes chats, la fréquence des FS augmente nettement après l'âge de 7 ans et la plupart des cas apparaissent entre 8 et 12 ans avec un âge moyen de 11 ans. On ne les rencontre qu'occasionnellement chez les jeunes chats non infectés par le FeSV (6%). Les FSV apparaissent également préférentiellement chez les chats âgés mais les individus seraient sensiblement plus jeunes, c'est à dire qu'ils auraient un âge moyen de 8 ans.

Les FHM apparaissent chez les individus d'âge moyen ou chez les vieux chats, avec une moyenne située à 9 ans. Concernant la FN, on ne connaît pas de prédisposition d'âge. Les autres types tumoraux se trouvent majoritairement chez le chat âgé¹².

2.3. Influence du sexe:

Différentes études ne reconnaissent aucune différence de fréquence entre mâle et femelle, et cela, quel que soit le type histologique ou le groupe étiologique (SV ou SNV) de la tumeur.

2.4. Influence de la race:

Il ne semble exister aucune prédisposition raciale.

3. ASPECTS CLINIQUES

3.1. Caractéristiques macroscopiques:

Les caractéristiques macroscopiques des ces sarcomes sont assez similaires : ils apparaissent généralement sous forme d'un nodule unique, uni à plurilobulaire (exception faite des FS viro-induits qui sont multicentriques), de consistance généralement homogène, de couleur blanc-grisâtre. Ces masses charnues sont molles et élastiques à dures. Leur taille variable peut aller de 1cm à plus de 20 cm et lorsque les tumeurs sont de taille importante, on note des plages brun-rougeâtres, de nature hémorragique, et/ou des plages jaunâtres, de nature nécrotique, et même parfois, une organisation kystique. Du fait du caractère infiltrant, les limites tissu sain-tissu tumoral ne sont pas nettes. Les tumeurs sont souvent mal délimitées mais on peut souvent distinguer la présence d'une pseudo-capsule fibreuse, issue de la stroma-réaction. La croissance invasive de ces sarcomes explique la difficulté de leur résection chirurgicale totale. Les sarcomes vaccinaux seraient plus gros et plus agressifs que les autres³¹.

En ce qui concerne la FN, qui n'est pas un processus néoplasique, mais inflammatoire, c'est le caractère très extensif et infiltrant de sa croissance qui permet de la classer dans les lésions pseudo-tumorales, ainsi que son haut potentiel de récurrence locale.

3.2. Localisation:

Pour les FSNV, rares sont les auteurs qui ne désignent aucun site de prédilection. On retrouve ainsi majoritairement les régions suivantes :

- la tête et plus particulièrement l'oreille,
- le membre, hors du site de vaccination (région fémorale), et particulièrement le doigt,
- le tronc, hors des sites de vaccination (flanc et thorax dorso-latéral exclus).

Pour les FSV, les régions les plus fréquemment impliquées sont les sites d'injection vaccinaux c'est à dire, les régions cervicale dorsale, interscapulaire, dorso-lombaire, fémorale et celles du flanc et du thorax dorso-latéral^{12, 31}.

Les FS viro-induits ne semblent avoir aucun site de prédilection bien que certaines études affirment qu'ils se développeraient majoritairement sur les membres et le tronc.

Les FHM auraient des localisations semblables aux FS et les FN se développeraient principalement sur la tête et plus particulièrement la face.

3.3. Evolution:

L'évolution n'est pas la même suivant le type étiologique du sarcome. En effet, les FS viro-induits ont en général déjà métastasé au moment de leur diagnostic. En ce qui concerne les sarcomes solitaires, la période de latence entre l'injection et l'apparition d'un SV est très variable et pourrait varier de trois mois à trois ans⁴⁵. La vitesse de croissance, elle, est aussi très variable bien que les SV soient caractérisés par une croissance rapide et agressive associée à de l'ulcération et de la nécrose et possèdent en général un caractère plus anaplasique que les SNV^{35,45}.

Ces tumeurs possèdent, toutes, une grande aptitude à récidiver après leur ablation chirurgicale, même très large. Le temps nécessaire à la récurrence est très variable, de 3 semaines à trois ans, mais la plupart du temps dans un intervalle de 1 an suivant l'exérèse. Les SV auraient le taux de récurrence le plus élevé²⁹. La récurrence est généralement locale, c'est à dire qu'elle se produit sur l'emplacement de l'ancienne tumeur ou ses marges. Aucun cas de récurrence à distance n'a été noté lors de la première exérèse, ou alors, elle s'accompagnait de récurrence locale. Les cellules tumorales des tumeurs récurrentes prennent un caractère chaque fois de plus en plus anaplasique, donc très agressif. Il semblerait également qu'au bout de plusieurs récurrences, le délai soit de plus en plus court et que d'autres lieux ou organes soient atteints. Il y a alors métastases. Des excisions répétées et plusieurs récurrences favoriseraient la sélection d'une population agressive de cellules tumorales qui auraient alors une capacité accrue à l'invasion et à métastaser³⁵. Le potentiel métastatique de ces types tumoraux reste en général faible (8 à 9%) excepté celui des SV qui peut atteindre des valeurs aussi élevées que 24 % selon des rapports récents. Les métastases les plus communes se développent dans les poumons mais les nœuds lymphatiques régionaux et la peau sont aussi affectés^{29,35,45}.

Les métastases, lorsqu'elles existent, sont disséminées plus fréquemment par voie hématogène avec envahissement pulmonaire mais la voie lymphatique reste possible, les métastases se localisant, alors, dans les nœuds lymphatiques loco-régionaux.

4. HISTOLOGIE

Il s'agit, en tout premier lieu, de distinguer un processus tumoral d'un processus non tumoral : la différence doit être faite entre la FN, de nature inflammatoire et dont le comportement biologique est analogue au processus pseudo-néoplasique et les sarcomes, en sachant que la première peut être considérée comme un état précancéreux des seconds chez les chats. Le diagnostic histologique de ces sarcomes est ensuite fondamental puisqu'il doit normalement permettre d'établir leur classification à partir de la reconnaissance de la cellule originelle et donc, leur histogénèse associée à un pronostic. Pourtant, il s'avère que la distinction des divers sarcomes est loin d'être aisée, d'autant plus que certains d'entre eux comme le FHM sont sujets à controverse concernant leur histogénèse, et doivent être redéfinis. Le diagnostic différentiel de ces tumeurs demande l'association de nombreux critères histologiques morphologiques et de malignité pour les différencier. Les principales caractéristiques morphologiques de chaque type tumoral sont regroupées dans le Tableau 5. Il faut cependant remarquer que, au sein du groupe des FS, les FS viro-induits apparaissent, général moins bien différenciés que les FS solitaires et contiennent également moins de collagène et de fibres de réticuline. Leur composition cellulaire est souvent très pléomorphes. En ce qui concerne les FSV, ils seraient caractériser par un index mitotique plus élevé et un pléomorphisme cellulaire plus prononcé par rapport aux FSNV. Les aires de nécrose seraient aussi plus fréquentes¹².

5. PREVENTION

La prévention des sarcomes cutanés félines concernent surtout les SV (car celles des FS viro-induits passent par celle de l'infection par le virus FeLV) et les recommandations apparaissent plutôt controversées. Pour ces dernières il s'agit de :

- l'utilisation de vaccins sans adjuvants ou, tout du moins, la non-utilisation d'adjuvants à base d'aluminium,
- le changement régulier de site de vaccination,
- la réduction de l'utilisation de vaccins polyvalents,
- éviter la survaccination.

En effet, si l'inflammation est considérée comme un antécédent nécessaire au déclenchement d'une cascade d'événements qui mènent finalement au développement d'un sarcome, il paraît logique de prendre des mesures pour réduire l'inflammation post-vaccinale. Les adjuvants à base d'aluminium sont, en effet, les plus susceptibles d'induire une réponse inflammatoire. Cependant, des vaccins ne contenant pas d'aluminium ont aussi été reliés à l'apparition de tumeurs et semblent donc aussi peu sécuritaires. Les sites de vaccination ont aussi changé et la VAFSTF* (**V**accine-**A**ssociated **F**eline **S**arcoma **T**ask **F**orce) préconise de ne plus utiliser les sites interscapulaires, qui se révèlent être apparemment les plus réactionnels. Par exemple, le vaccin anti-rabique devrait être administré dans la portion distale du membre postérieur droit, le vaccin contre la leucose féline dans la portion distale du membre postérieur gauche et le reste des vaccins dans la région des épaules²⁹.

Quant aux choix de vaccins monovalents ou polyvalents, la controverse est toujours présente. Certains démontrent une différence significative dans l'utilisation de vaccins polyvalents⁴⁰ alors que d'autres ne trouvent pas d'association entre les sites tumoraux vaccinaux et non vaccinaux en fonction du nombre de vaccinations effectuées simultanément³². Bien que l'ambiguïté persiste, il est préférable d'administrer plusieurs vaccins à des endroits différents et de ne pas utiliser de vaccins polyvalents.

Il semble qu'aussi bien les administrations vaccinales intramusculaires (IM) que sous-cutanées (SC) résultent en une inflammation locale et en l'induction de tumeurs. Les injections SC sont cependant recommandées car elles ont le mérite d'assurer une détection précoce de ces grosseurs, un tel diagnostic précoce amenant un taux de guérison après traitement chirurgical plus haut.

* Association créée en Novembre 1996 par l'AVMA (American Veterinary Medical Association) et l'AAHA (American Animal Hospital Association).

Mais s'il y avait à choisir, la plus importante de ces recommandations serait surtout de ne pas survacciner. Il a été clairement prouvé que le risque de tumeurs vaccinales s'accroît avec le nombre de vaccins administrés⁴⁰. Il est aussi reporté que la durée de l'immunité de beaucoup de vaccins disponibles sur le marché pour les chats est supérieure à 1 an et que des programmes triannuels devraient être institués pour la plupart des vaccins contenant des agents infectieux (excepté pour le vaccin anti-rabique, pour des problèmes d'ordre législatif)⁷¹. De plus, la vaccination devrait être pratiquée de façon raisonnée et par exemple le vaccin contre la leucose féline devrait être limité aux chats susceptibles de sortir dehors seulement.

6. TRAITEMENT

Savoir comment agir avec des grosseurs qui apparaissent après une vaccination est important. Quelques vaccins anti-rabiques et anti-FeLV sont associés à 100% de grosseurs post-vaccinales mais heureusement la plupart d'entre elles disparaissent en 2 à 3 mois. De plus, peu de SV se développent en moins de 3 mois. Il est donc recommandé que toute grosseur détectée trois mois après une vaccination soit biopsiée et si jugée maligne, excisée chirurgicalement.

Quant au choix de la démarche thérapeutique concernant les tumeurs du CFF, il n'est pas simple; car, si la chirurgie, la plus précoce et la plus large possible, reste le traitement cytoréducteur incontournable, elle n'est malheureusement pas suffisante dans la grande majorité des cas pour être curative à elle seule et éviter les récurrences. Les tentatives d'excision de ces tumeurs sont en effet rarement curatives et mènent à des récurrences locales et à une seconde excision chirurgicale plus difficile. Même les chirurgies les plus agressives sont souvent incomplètes et résultent en un taux d'échec de 30 à 70%. Cependant, les chats traités avec des excisions radicales (amputation, hemipelvectomie, scapulectomie partielle et exérèse des processus épineux dorsaux) ont des intervalles de récurrences beaucoup plus longs que les chats subissant une exérèse marginale (<3cm de large autour de la tumeur)³⁵. C'est pour cela qu'il est fortement conseillé de l'associer tout de suite à un traitement adjuvant. Un grand nombre d'agents chimiothérapeutiques (carboplastine, doxorubicine, mitoxanthrone, cyclophosphamide et vincristine) ont été utilisés mais la réponse est le plus souvent partielle²⁹. Actuellement le plus efficace et le moins dangereux serait la curiethérapie interstitielle à l'aide de fils d'Iridium-192; la radiothérapie au cobalt reste de règle comme traitement palliatif pour des tumeurs de gros volume dont la résection complète est impossible.

Enfin, d'autres méthodes, comme l'immunothérapie, l'hyperthermie et surtout, actuellement, l'injection locale intralésionnelle de composés cytotoxiques/antimitotiques, demandent de plus amples investigations concernant leur mode d'action et leur réelle efficacité chez le chat.

7. PRONOSTIC

Sur le plan histopathologique, le pronostic prend en compte :

- la nature histologique de la tumeur: elle renseigne sur l'aptitude à récidiver et/ou à métastaser; par exemple, la FN ne métastase jamais mais récidive presque toujours; d'autre part le potentiel métastatique d'un FS est inversement proportionnel à son degré de différenciation.
- les paramètres caractéristiques de la malignité tumorale (index mitotique élevé (nombre de mitoses pour 10 champs à l'objectif 40), mitoses atypiques, atypies nucléaires et nucléolaires nombreuses, forte densité cellulaire, anisocytose, nécrose tumorale importante). Ainsi l'importance du pléomorphisme cellulaire et un degré d'anaplasie élevé altèrent le pronostic.

Pour les FS, Bostock et Dye utilisent, pour leur grading, la localisation anatomique et l'index mitotique :

- pour une tumeur localisée sur les flancs ou les oreilles, le temps de survie sans récidive est de 3 ans et plus.
- pour les autres localisations (membres, tête et dos), ils définissent deux grades selon l'index mitotique :
 - Grade I: IM de 0 à 5. Le temps de survie est de 128 semaines, le taux de récidive de 63%.
 - Grade II: IM de 6 et plus. Le temps moyen de survie est de 16 semaines, le taux de récidive de 75%.

Sinon, en l'absence de tout traitement, la survie moyenne d'un chat atteint de FS est située sur une échelle de 4 mois à 2 ans¹².

Conclusion partielle: Le CFF occupe une place importante parmi les tumeurs félines de la peau et du tissu conjonctif sous-cutané et le représentant majoritaire de ce groupe est le FS. Tous sexes, tous âges et toutes races de chat sont atteints. Ces sarcomes peuvent présenter de nombreuses variations histologiques et rendent ainsi leur diagnostic délicat. Leur forte agressivité locale et leur haut potentiel de récurrence rendent leur traitement difficile. Il en découle un coût parfois très élevé des traitements engagés par les propriétaires félines. Ainsi l'éthique de la profession vétérinaire et la façon dont le problème est traité sont l'intérêt de beaucoup, y compris des médias (Annexe 1).

Ayant instituée la vaccination contre la rage, maladie létale pour le chat et l'être humain, on se retrouve devant le besoin d'indemniser les propriétaires dont les dépenses associées aux traitements des SV deviennent insurmontables. Peut-être est-il temps pour la profession vétérinaire de considérer la mise en place d'une action similaire à celle établie en 1986 pour les êtres humains atteints par des vaccins mandatés comme la diphtérie/pertussis/tétanos et rougeole/oreillons/rubéole.

De plus, un contrôle législatif plus soutenu serait requis pour l'étiquetage des vaccins vétérinaires associés à ces sarcomes. Car actuellement, un vaccin rabique dont la durée de l'immunité est de 3 ans, est étiqueté pour 1 an, et aujourd'hui encore, une revaccination annuelle pour le FeLV est recommandée sans aucune évidence de la durée de l'immunité. Bien que, actuellement, on se concentre sur l'effet négatif de la vaccination, il faut tout de même signaler que les avantages de la vaccination sont de loin plus importants pour nos patients félines devant le faible risque de développer un sarcome au site d'injection.

Cependant les SV devraient probablement être renommés «sarcome de sites d'injection» car ces tumeurs auraient aussi été reliées à l'administration de vaccins autres que anti-rabiques et anti-FeLV⁴⁸ mais aussi à celle de produits autres que des vaccins (dexaméthasone et amoxicilline)⁴⁵.

Dans l'attente de telles mesures et dans le but d'obtenir de meilleurs pronostics, une distinction précise entre ces différents SCF, à la fois très polymorphes et très proches les uns des autres d'un point de vue histopathologique, s'impose.

**MISE AU POINT D'UN PANEL DE MARQUEURS DE
DIFFERENCIATION SUR COUPES EN PARAFFINE
POUR L'IMMUNOPHENOTYPAGE DES TUMEURS DU
CFF**

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et nature des prélèvements:

Trente-cinq sarcomes à cellules fusiformes (SCF) félines ont été sélectionnés à partir de prélèvements provenant de deux laboratoires d'Anatomie pathologique vétérinaire : le LAPVSO* et le service d'Anatomie pathologique de l'ENVT** et ont été numérotés de 1 à 35. Ils correspondent aux plus récents diagnostics de SCF établis dans chacun des laboratoires. Les échantillons proviennent de chats européens âgés de 4 à 17 ans. L'incidence maximale des tumeurs, dans le lot expérimental, concerne des animaux entre 7 et 15 ans (Tableau 1). Vingt et un des trente cinq chats étaient des femelles (dont huit ovariectomisées) et sur les quatorze mâles, dix sont castrés (Tableau 2). La localisation anatomique des tumeurs retenues est variable. La région interscapulaire est, dans notre lot, la plus concernée (15 cas) et la tête (4 cas), le flanc (4 cas), le thorax (5 cas), les membres (6 cas) et la queue (1 cas) sont des régions moins représentées (Tableau 3).

Des prélèvements, de peau saine (2 biopsies cutanées), d'encéphale sain (1 prélèvement), et de nœuds lymphatiques réactionnels (deux prélèvements) ont aussi été sélectionnés pour caractériser et contrôler la spécificité des anticorps utilisés.

* LAPVSO : Laboratoire d'Anatomie pathologique Vétérinaire du Sud-Ouest, 129 route de Blagnac, 31201 Toulouse Cedex 2.

** ENVT: Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Département d'Anatomie pathologique, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex.

-Tableau 1- Effectif et répartition des 35 tumeurs selon l'âge

Age	Effectif	FS	SC	FHM	LE	FN	IN
3 ans	1	1					
5 ans	1	1					
6 ans	1					1	
7 ans	3	2					1
8 ans	2	1			1		
9 ans	3	3					
10 ans	6	1	2		1		2
11 ans	3	1	1	1			
12 ans	1	1					
13 ans	4	3					1
14 ans	2	1				1	
15 ans	4	2	1	1			
16 ans	1					1	
17 ans	2		1				1
indéterminés	1					1	
Total	35	17	5	2	2	4	5

FS: Fibrosarcome

SC: Schwannome

FHM : Fibrohistiocytome malin

LE : Léiomyosarcome

FN : Fasciite nodulaire

IN : Indéterminés

-Tableau 2- Effectif selon le sexe et la castration

Sexe	Castration	Effectif	Effectif total
Mâle	Castré	10	14
	Non castré	4	
Femelle	Castrée	9	21
	Non castrée	12	

-Tableau 3 - Effectif selon la topographie clinique

Localisation Tumeur	Tête*	Membres	Inters.	Thorax**	Flanc***	Queue
SC	2	3		1		
FN			3		1	
FS	1		9	3	2	1
FHM			1	1		
LE			2			
IN	1	3			1	
Total: 35	4	6	15	5	4	1

Inters. : Interscapulaire

*Tête : oreille, menton, bouche,

**Thorax : thorax, creux axillaire,

***Flanc : flanc, aine.

-Tableau 4 - Source, type et dilution des anticorps utilisés dans l'analyse immunohistochimique des SCF félins

Anticorps / Isotype IgG1 kappa	Type	Dilution	Code	Clone	Source	Code dans le texte
Neurone spécifique enolase	Monoclonal souris	1:50	M 0873	BBS/NC/VI-H14	DAKO, France	NSE
Actine musculaire (α et γ)	Monoclonal souris	1:25	M 0635	HHF35	DAKO, France	HHF35
Antigène Myéloïde/histiocyte	Monoclonal souris	1:100	M 0747	MAC 387	DAKO, France	MAC 387
Antigène des cellules B	Monoclonal souris	1:50	M 7051	HM 57	DAKO, France	CD79 $\alpha\gamma$
Protéine S100	Polyclonal lapin	1:200	Z 0311		DAKO, France	S100
Protéine Neurofilament	Monoclonal souris	1:100	M 0762	2F11	DAKO, France	NF
Protéine fibrillaire acide gliale	Monoclonal souris	1:25	M 0761	6F2	DAKO, France	GFAP

1.2. Anticorps:

Les anticorps, destinés à marquer spécifiquement des lignées cellulaires, ont été sélectionnés à partir des données bibliographiques^{17,33,51,63,64,69,72,77} et selon leur aptitude à reconnaître des épitopes sur des prélèvements de tissus humains et animaux (chat).

Différents anticorps ont ainsi été retenus :

- un anticorps monoclonal dirigé contre une actine (HHF35), comme marqueur des cellules musculaires lisses,
- un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène spécifique de la lignée myéloïde/histiocyte (MAC387) comme marqueur de la lignée myélo-monocytaire,
- un anticorps monoclonal dirigé contre la neurone-spécifique enolase (NSE) et un anticorps monoclonal dirigé contre les neurofilaments (NF) phosphorylés de faible poids moléculaire comme marqueurs du type neuronal,
- un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine S100 (S100) comme marqueur des cellules issues du feuillet embryonnaire neural,
- un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine fibrillaire gliale acide (GFAP) comme marqueur des cellules astrogliales,
- un anticorps monoclonal dirigé contre le CD79 α c γ (marqueur de la lignée B-lymphocytaire) a également été utilisé pour caractériser la spécificité des marquages obtenus.

Le Tableau 4 indique les espèces sur lesquelles ces anticorps ont été produits, ainsi que leur provenance, leur isotype (anticorps monoclonaux) et les dilutions auxquelles ils ont été testés. Les Annexes 4 à 10 détaillent les caractéristiques de marquage de chaque anticorps. L'ensemble des anticorps choisis est réputé pour être dirigé contre des antigènes résistant bien à la fixation au formol.

1.3. Traitement des prélèvements:

1.3.1. Fixation, inclusion en paraffine et coupe:

Les prélèvements ont été fixés dans du formol à 10%, tamponné à la neutralité, pendant 24 heures ou plus et inclus en paraffine.

Des coupes sériées de 2 micromètres d'épaisseur de chaque tumeur sont réalisées à l'aide d'un microtome et après récupération en milieu liquide (bain-marie à 40°C) étalées sur des lames silanées, traitées électrostatiquement (Superfrost Plus, CML, Nemours, France), puis séchées à l'étuve à 56°C pendant 12 heures.

1.3.2. Coloration à l'Hémalun-Eosine:

Pour chaque prélèvement, une des coupes a été colorée à l'Hémalun-Eosine afin d'établir le type histologique exact de la tumeur sur les critères histologiques standards.

Les lames sont préalablement déparaffinées dans du toluène (1 bain de 5 minutes), puis réhydratées dans des bains successifs d'éthanol de concentration décroissante (1 bain de 5 minutes dans de l'éthanol absolu puis 1 bain de 5 minutes dans de l'éthanol à 95°), avant d'être passées 5 minutes à l'eau courante. Elles sont ensuite plongées 12 secondes dans une solution d'Eosine-Erythrosine (Merck, France) aqueuse à 1%, rincées et placées 20 secondes dans une solution d'Hémalun de Mayer (Merck, France).

Puis les lames sont rincées à l'eau courante pendant 5 minutes, déshydratées par des bains successifs d'éthanol de concentration croissante, puis placées dans du toluène. Des lamelles sont placées sur les lames dans un baume synthétique (Micromount mounting medium ; Labonord, France).

1.3.3. Etude immunohistochimique:

1.3.3.1. Étapes précédant la technique immunohistochimique:

- Déparaffinage : les lames sont déparaffinées dans quatre bains successifs de toluène (4 fois 5 minutes) puis réhydratées dans deux bains successifs d'acétone (2 fois 5 minutes) et dans de l'eau courante.
- Essais préliminaires : dans le but d'obtenir le meilleur marquage compatible avec une détérioration minimale des tissus, les procédures immunohistochimiques ont été établies

après des essais préliminaires. Nous avons fait varier plusieurs paramètres (puissance du four à micro-ondes, temps de passage au four à micro-ondes, quantité de tampon à utiliser, épaisseur des coupes, dilution optimale de chaque anticorps) en marquant des tissus normaux et néoplasiques de chat. La technique décrite ici est celle grâce à laquelle nous avons obtenu le meilleur marquage. Les variations concernant ces divers paramètres sont décrites dans la partie «Discussion».

- Démasquage antigénique : afin de restaurer l'antigénicité de certains des épitopes, nous avons utilisé des techniques de démasquage antigénique classiques :
 - o Trypsinisation : une protéolyse ménagée est réalisée, pour les sections tissulaires destinées au marquage de la protéine S100 et de l'antigène MAC387. Les lames sont plongées dans une solution de PBS (Tampon phosphate salin, PBS 1X ; 1/10^{ème}) (Annexe 2) contenant 0.1% de trypsine 200 U/g (réf. 1.08367.1000 Merck ; France) pendant 30 minutes à 37°C.
 - o Utilisation du four à micro-ondes : les sections tissulaires destinées au marquage par les anticorps dirigés contre les antigènes NSE, NF, GFAP, CD79 $\alpha\gamma$ ont été chauffées, placées dans deux bacs en plastique remplis de 250 ml de tampon citrate 10mM à pH 6 (Annexe 2). Le four à micro-ondes est utilisé à une puissance de 700W pendant 20 minutes. Un premier passage de 10 minutes est effectué et le liquide de ces bacs s'évaporant, 50 ml de tampon par bac sont ajoutés pour effectuer un second passage de 5 minutes ; une dernière addition de 25 ml de tampon par bac est réalisée avant l'ultime passage de 5 minutes. Puis les lames sont refroidies pendant 30 minutes à température ambiante.
- Cerclage des coupes au stylo DakoPen (Dako SA, Trappes, France).

1.3.3.2. Réaction immunohistochimique:

L'immunomarquage est réalisé par une technique streptavidine-biotine peroxydase standard.

- Inhibition de la peroxydase endogène: l'activité peroxydase endogène est inhibée par incubation des coupes dans une solution de méthanol à 1% de peroxyde d'hydrogène (30 Volumes) pendant 30 minutes. Ce mélange a été préparé au moment de l'utilisation.
- Equilibration de l'osmolarité dans du Tampon Phosphate Salin (PBS) dilué au 1/10^{ème} avec 0.2 gramme de lait écrémé en poudre à dilution instantanée avec deux gouttes de Tween 20 par litre (réf. P7949, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France).
- Blocage de la fixation non spécifique des anticorps: sérum normal de chèvre dilué au 1/5^{ème} dans du PBS dilué au 1/10^{ème} pendant 20 minutes.
- Anticorps primaires: les anticorps primaires sont appliqués aux dilutions indiquées dans le Tableau 4, pendant 1 heure. Il faut compter environ 300 microlitres d'anticorps dilué par coupe ; ensuite on effectue quatre rinçages de 5 minutes avec du PBS.
- Anticorps secondaire de chèvre anti-souris/anti-lapin biotynilé (réf.KO492, Dako, France) dilué au 1/100^{ème} dans du PBS à 1% de SAB (Sérum Albumine Bovine, A-3299, Sigma-Aldrich, France), il est appliqué pendant 30 minutes. Puis on rince trois fois 5 minutes dans du PBS.
- Application du complexe streptavidine-biotine-peroxydase (réf.KO492 ; Dako, France) dilué au 1/100^{ème} dans du PBS albuminé pendant 30 minutes. Puis on rince trois fois 5 minutes dans du PBS.
- Révélation de l'activité peroxydase par application du chromogène 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride pendant 15 à 20 minutes (réf.M-4293, Sigma-Aldrich, France). Puis on rince à l'eau courante. Ce chromogène est oxydé par la peroxydase et donne un précipité brun insoluble dans l'eau et les solvants organiques.

- Contrecoloration avec l'Hématoxiline de Harris (1.09253.0500, Merck, France), pendant 15 secondes. Les noyaux bleussent à l'eau courante pendant 5 minutes, puis déshydratation.
- Montage avec lamelles dans un baume synthétique (Micromount mounting medium ; Labonord, France).

Toutes les incubations sont effectuées à température ambiante.

1.3.3.3. Contrôles:

➤ Contrôles positifs:

Les contrôles positifs pour l'anticorps anti-HHF35 sont effectués sur des biopsies cutanées de chats (muscles arrecteurs du poil, cellules myoépithéliales des glandes sudoripares apocrines, péricytes). Pour les anticorps anti-MAC387 et anti-CD79 $\alpha\gamma$, sont utilisées des coupes de nœuds lymphatiques réactionnels (histiocytes activés). Pour les anticorps anti-NSE, S100, GFAP, NF, il s'agit de sections de peau (nerfs cutanés) et d'encéphale de chat.

➤ Contrôles négatifs:

Dans le but de démontrer si le marquage positif observé est spécifique, différents contrôles sont réalisés pour chaque prélèvement :

- l'un en omettant l'anticorps primaire,
- l'autre en remplaçant l'anticorps primaire par :
 - pour les anticorps monoclonaux, un anticorps monoclonal de même isotype (Ig G1 Kappa) mais dirigé contre un antigène théoriquement non présent dans les tissus tumoraux étudiés (CD79 $\alpha\gamma$),
 - pour l'anticorps polyclonal (S100), du sérum normal de lapin.

1.3.3.4. Lecture et interprétation des lames:

La lecture des échantillons colorés à l'Hémalun-Eosine, en vue de la classification histologique, a été effectuée par deux pathologistes.

Les 35 tumeurs sélectionnées ont été classées sur les critères morphologiques classiquement utilisés dans la littérature^{23,25,28,33,42,53,54,59,60,61,63,65}. Ces critères histologiques, pour chaque groupe tumoral, sont présentés dans un tableau (Tableau 5). De même, nous nous sommes restreints aux critères histologiques les plus communément décrits. Nous n'avons pas pris en compte les «variants» (sous-types) de chaque type tumoral.

Les critères histologiques généraux de malignité ont été appliqués aux 35 tumeurs de cette étude (croissance infiltrante, densité cellulaire souvent importante, anisocaryose, anisocytose, index mitotique souvent augmenté et figures mitotiques atypiques, nombre augmenté de polycaryons, remaniements nécrotico-hémorragiques).

A partir des lames traitées par immunohistochimie ont été notés :

- l'existence et la spécificité du marquage ainsi que l'intensité du dépôt chromogénique (absent, faible ou marqué) : les cellules tumorales considérées positives sont celles qui montrent un marquage cytoplasmique discrètement granuleux brun foncé,
- la distribution cellulaire du marquage (cytoplasmique et/ou nucléaire),
- la proportion de cellules tumorales marquées (estimation semi-quantitative) :
 - Marquage + =<10% cellules positives
 - Marquage ++ =>10% mais <50% cellules positives
 - Marquage +++ =>50% cellules positives mais < 90% cellules positives
 - Marquage ++++=>90% cellules positives.
- l'homogénéité ou l'hétérogénéité de distribution du marquage au sein de la tumeur.

-Tableau 5 - Critères histologiques pour la classification des sarcomes à cellules fusiformes du chat

TYPE HISTOLOGIQUE	DESCRIPTION
Tous sarcomes cutanés du chat ^{27,58}	<ul style="list-style-type: none"> - Faisceaux de cellules fusiformes associées à un nombre variable de cellules polygonales pléomorphiques ou histiocytoïdes avec des atypies légères à marquées (anisocytose, anisocaryose et index mitotique élevé).
Fibrosarcome ²⁰	<ul style="list-style-type: none"> - Longs faisceaux de cellules fusiformes enchevêtrés, - Organisation " en chevron " ou en " arête de poisson ", très caractéristique, rare, - Stroma collagénique, quantité variable, - Cellules géantes multinucléées , en nombre variable, - Foyers hémorragiques, nécrotiques, oedémateux, myxomateux et cartilagineux ou foyers de métaplasie osseuse, non systématiques.
Fibrohistiocytome malin ^{3,4,20,23,24,53}	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules polygonales mononucléaires pléomorphiques à cytoplasme acidophile et d'aspect spumeux de taille variable et au noyau d'allure vésiculeuse (cellules histiocyte-like), - Cellules fusiformes pléomorphiques, à cytoplasme acidophile et rubanné, et au noyau volumineux et nucléé (cellules fibroblaste-like), - Organisation storiforme (" en vannerie "), - Stroma collagénique, en quantité variable, - Cellules histiocytoïdes atypiques, - Cellules géantes multinucléées, non systématisées.
Schwannome ²⁰	<ul style="list-style-type: none"> - Organisation en faisceaux ondulés, en palissade ou sous forme de " whorls " ou de manchons de cellules tumorales périvasculaires, - Alternance de zones Antoni A (dense, cellules fusiformes) et de zones Antoni B (lâche, cellules polygonales), - Noyaux ondulés.
Léiomyosarcome ⁴³	<ul style="list-style-type: none"> - Longues cellules fusiformes, - Stroma collagène absent, - Noyaux aux bords emoussés, allongés en " forme de cigare ".
Fasciite nodulaire (Réaction fibroblastique proliférative) ^{20,28,47}	<ul style="list-style-type: none"> - Faisceaux courts de grands fibroblastes polymorphes, fusiformes ou plutôt larges et rebondis, - Formation de figures concentriques autour des vaisseaux, - Activité mitotique fréquente mais sans atypie, - Infiltrats inflammatoires multifocaux à cellules mononucléées (lymphocytes, plasmocytes et macrophages), - Cellules géantes non systématisées, - Sclérohyalinose centrotumorale non systématisée.

2. RESULTATS

2.1. Diagnostic histologique:

2.1.1. Classification des SCF en histologie conventionnelle:

Tous nos prélèvements présentent les caractéristiques classiques des SCF cutanés félines : un agencement de faisceaux de cellules fusiformes, entrecroisés, associés à des quantités variables de stroma collagène.

- 17 des prélèvements de notre échantillon présentaient une architecture en faisceaux entrecoupés sous diverses incidences, associés à la présence d'un nombre très variable de cellules multinucléées. Ces critères structuraux et la morphologie des noyaux de nombreuses cellules tumorales («en navette»), nous ont fait classer ces prélèvements en Fibrosarcomes,
- 5 des prélèvements présentaient une architecture alternant des territoires de type Antoni A et Antoni B, avec une distribution parfois périvasculaire, palissadique ou en «whorls». Ces tumeurs ont été classées en Schwannomes,
- 2 des prélèvements ont été classés en Fibrohistiocytomes malins sur des critères architecturaux mais surtout sur l'identification d'une forte population d'allure histiocytoïde,
- 2 des prélèvements ont été classés comme Léiomyosarcomes, sur la base de l'absence de stroma collagénique dans le tissu tumoral et surtout sur la base de la morphologie nucléaire des cellules fusiformes (noyaux «en cigare»),
- 4 des prélèvements présentaient des caractères de Fasciite nodulaire. C'est à dire une architecture en faisceaux, souvent angiocentriques, avec des cellules de type fibroblastique immatures mais sans atypie nucléaire nette,
- enfin 5 prélèvements n'ont pu être classés de façon univoque par les critères histologiques classiques.

Tous ces SCF, excepté les fibromatoses, étaient histologiquement malins et présentaient une croissance généralement infiltrante, une densité cellulaire moyenne à élevée, des atypies cytonucléaires nettes et un index mitotique moyen à élevé (de 2 à plus de 10 mitoses pour 10 champs à l'objectif 40).

2.1.2. Corrélations épidémiolo-gionnelles:

Une corrélation entre un type tumoral, le fibrosarcome, et la localisation anatomique lésionnelle, interscapulaire, a été mise en évidence. Les autres critères épidémiolo-gionnels (sexe, âge) ne semblent pas associés à un type tumoral particulier.

2.2. Diagnostic immunohistochimique:

Aucun marquage n'a été décelé sur les sections tissulaires servant de contrôle négatif, si ce n'est l'existence d'un léger bruit de fond sur les sections tissulaires marquées par l'anticorps polyclonal S100.

2.2.1. Immunomarquage des tissus sains:

◆ Anticorps anti-actine musculaire spécifique (HHF35)⁵⁵ (Annexe 4):

Le marquage est cytoplasmique, intense, diffus et homogène. Sur les sections de peau saine, il intéresse les cellules musculaires striées du plan musculaire superficiel sous-cutané, les cellules musculaires lisses des muscles arrecteurs pileux, les cellules musculaires lisses vasculaires, les péricytes des artérioles, veinules et capillaires et les cellules myoépithéliales des glandes sudoripares apocrines. Les cellules vasculaires endothéliales et les fibrocytes de la matrice dermique sont négatifs.

◆ Anticorps anti-antigène myéloïde / histiocyte (MAC387)^{11,16,66} (Annexe 5):

Le marquage est cytoplasmique, d'intensité modérée, diffus et intéresse une sous-population de cellules macrophagiques des sinus cortico-médullaires des coupes de nœuds lymphatiques réactionnels. Les quelques polynucléaires neutrophiles présents sont également positifs.

◆ Anticorps anti-neurone-spécifique enolase (NSE)^{9,54} (Annexe 6):

Le marquage est cytoplasmique, intense, diffus et homogène. Sur les coupes de peau, il intéresse les cellules de Schwann des nerfs cutanés, les cellules myoépithéliales des glandes sudoripares apocrines et les cellules musculaires lisses des parois vasculaires cutanées.

Les cellules nerveuses (corps neuronaux et axones), les astrocytes, oligodendrocytes, cellules épendymaires de l'encéphale sont également marquées.

◆ Anticorps polyclonal anti-protéine S100 (S100)^{20,24,41,54,58} (Annexe 7):

Le marquage est cytoplasmique et nucléaire, d'intensité modérée, diffus et homogène et il intéresse les cellules de Schwann (prélèvement cutané), les cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes), les neurones et les épendymocytes de l'encéphale.

Un marquage des mélanocytes, des cellules de Langerhans, des cellules myoépithéliales des glandes sudorales apocrines (peau) et des cellules folliculaires dendritiques et interdigitées (nœuds lymphatiques) est noté.

◆ Anticorps monoclonal anti-protéine neurofilament (NF)⁴¹⁻⁵⁰ (Annexe 8):

Le marquage est cytoplasmique, d'intensité modérée, diffus et homogène. Il intéresse les axones des nerfs cutanés, les péricaryons et axones de l'encéphale et les cellules de Schwann du système nerveux périphérique (SNP). Tous les corps neuronaux ne sont pas marqués avec la même intensité.

◆ Anticorps monoclonal anti-protéine gliale fibrillaire acide (GFAP)^{41,50, 62} (Annexe 9) :

Le marquage est cytoplasmique, d'intensité modérée, diffus et homogène. Il intéresse les astrocytes, certaines cellules épendymaires de l'encéphale et les cellules de Schwann du SNP. Aucune positivité n'est observée pour les neurones et les oligodendrocytes.

◆ Anticorps monoclonal anti-lignée B-lymphocytaire (CD79 $\alpha\gamma$)⁶⁹ (Annexe 10) :

Le marquage est cytoplasmique, d'intensité modérée, diffus et homogène. Il intéresse les cellules de la lignée B lymphocytaires.

-Tableau 6 - Résultats des immunomarquages par type tumoral

Type Tumoral	Total	Sous-total	NSE	HHF35	S100	GFAP	NF	MAC387	Total	Diagnostic immunologique
Fibrosarcomes	17	2	+	+	-	-	-	-	2	Léiomyosarcomes Schwannomes Fibrosarcomes
		3	+	-	+	-	-	-	3	
		12	+	-	-	-	-	-	12	
Schwannomes	5	4	+	-	+	-	-	-	4	Schwannomes Schwannome
		1	+	-	+	+	-	-	1	
Léiomyosarcomes	2	1	+	+	-	-	-	-	1	Léiomyosarcome FHM
		1	+	-	-	-	-	+	1	
Fibromatose	4	4	+	-	-	-	-	-	4	Fibromatoses
FHM	2	2	+	-	-	-	-	+	2	FHM
Indéterminés	5	4	+	-	+	-	-	-	4	Schwannomes Fibrosarcome
		1	+	-	-	-	-	-	1	

◆ Sur les 5 diagnostics histologiques de schwannomes malins:

4/5 sont S100 +, GFAP - ;

1/5 est S100 +, GFAP + ;

Donc le diagnostic immunohistochimique confirme le diagnostic histologique de nos 5 schwannomes.

◆ Sur les 17 diagnostics histologiques de fibrosarcomes :

2/17 sont HHF35 +,

3/17 sont S100 +,

12/17 sont HHF35- et S100 -.

Donc sur 17 fibrosarcomes, deux sont reclassés dans le groupe des léiomyosarcomes et trois, dans le groupe des schwannomes malins.

◆ Sur les 2 diagnostics histologiques de léiomyosarcomes :

1 est MAC387 +, HHF35 -,

1 est HHF35 +.

Donc sur 2 léiomyosarcomes, un apparaît être un fibrohistiocyte malin.

◆ Sur 5 diagnostics de sarcomes indéterminés :

4/5 sont S100 +,

1/5 est négatif pour tout (sauf pour NSE).

Donc, sur 5 tumeurs indéterminées, quatre sont classées dans le groupe des schwannomes malins et un, dans le groupe des fibrosarcomes.

◆ Les deux diagnostics histologiques de FHM, sont confirmés par un marquage MAC387 +.

◆ Les lésions de fibromatose sont restées négatives pour tous les marqueurs (sauf NSE).

2.2.2. Immunomarquage des SCF:

Les résultats individuels sont présentés dans l'Annexe 3 et les résultats de l'immunomarquage par type tumoral sont présentés dans le Tableau 6.

L'intensité du marquage a été suffisante pour ne pas poser de problèmes d'interprétation pour les coupes histologiques observées. Toutefois deux cas, (cas 19 (9723-98) ; cas 33 (6761-98)), avec un marquage d'intensité insuffisante, respectivement pour l'immunoréactivité aux protéines GFAP et S100 n'ont pas été retenus comme étant positifs.

- ◆ L'anticorps anti-HHF35 a marqué les cellules tumorales de 3 des 35 tumeurs.

Il s'agit d'un des léiomyosarcomes (diagnostiqué histologiquement) et de deux fibrosarcomes. Le marquage se caractérise par un dépôt diffus et cytoplasmique (Photo 5). La proportion de cellules tumorales positives varie de 50% (léiomyosarcome) à plus de 90% (2 fibrosarcomes). Aucune distribution préférentielle du marquage au sein de ces néoplasmes n'est notée. L'un des léiomyosarcomes est demeuré négatif. Les autres fibrosarcomes, FHM, fibromatoses et schwannomes n'ont pas réagi.

De plus, sur 21 des 35 tumeurs, on observe un marquage en situation périvasculaire périphérique représentant entre 10 et 30 % de la surface tumorale (Photos 1 et 2). Ce marquage concerne des cellules, non tumorales, fusiformes, disposées en courts faisceaux ne présentant pas d'atypie cytonucléaire.

- ◆ Un marquage par l'anticorps anti-MAC387 est observé sur 3 des 35 SCF. Il s'agit des deux FHM et d'un léiomyosarcome. Les cellules positives représentent moins de 10 % des cellules tumorales. Le marquage est multifocal et intéresse des cellules isolées disposées «au hasard» dans la masse tumorale. Le dépôt est fort, granuleux. Les cellules tumorales marquées sont fusiformes ou histiocytoïdes (Photos 6, 7, 8).

Les autres prélèvements n'ont pas réagi. Seules les cellules de la lignée myélo-monocytaire (macrophages et polynucléaires neutrophiles) des stroma-réactions inflammatoires tumorales sont positives.

**-Tableau 7 - Résultats du reclassement des tumeurs avant et après le marquage
immunohistochimique**

	Schwannome	Fibrosarcome	Fibromatose	Léiomyosarc.	FHM	Indéterminés
Histologie	5	17	4	2	2	5
Immunohistochimie	12	13	4	3	3	0

◆ Pour tous les SCF étudiés, le marquage par l'anticorps anti-NSE est intense, diffus et cytoplasmique. Il intéresse moins de 10% à plus de 90% des cellules tumorales et aucune localisation préférentielle du marquage n'est décelée.

◆ L'anticorps anti-S100, a marqué 12 des 35 SCF. Il s'agit des 5 schwannomes, de 3 fibrosarcomes et de 4 tumeurs indéterminées. Le marquage est diffus, intense et cytoplasmique (Photos 3 et 4). La proportion de cellules tumorales positives varie de moins de 10% à plus de 90%. Aucune localisation préférentielle de marquage n'est observée.

Une des 5 tumeurs coexprime la protéine S100 et GFAP.

◆ L'anticorps anti-NF n'a marqué aucun des 35 SCF.

◆ L'anticorps anti-GFAP a marqué un des 5 schwannomes. Le marquage est cytoplasmique, diffus et représente un peu plus de 50% de la surface tumorale. Aucune localisation préférentielle de ce marquage n'est notée.

2.3. Confrontation des résultats histologiques et immunohistochimiques:

Le Tableau 7 confronte la classification histologique et immunohistochimique.

Le marquage immunohistochimique a permis de déterminer que 13/35 des SCF sont des fibrosarcomes avérés (contre 17 en histologie conventionnelle), 12/35 des SCF sont des schwannomes (contre 5 selon les critères histologiques standards), 3/35 des SCF sont des léiomyosarcomes (contre 2 en histologie conventionnelle), 3/35 des SCF sont des FHM (contre 2 en histologie conventionnelle), 4/35 SCF sont des fibromatoses.

Deux fibrosarcomes identifiés en histologie conventionnelle (cas 12, cas 13) ont été reclassés dans le groupe des léiomyosarcomes et trois fibrosarcomes (cas 14, cas 15, cas 16) dans le groupe des schwannomes malins.

L'immunohistochimie a confirmé le diagnostic histologique des cinq schwannomes.

L'un des léiomyosarcomes (cas 27) a été reclassé en FHM.

Les deux diagnostics histologiques de FHM, ainsi que les diagnostics de fibromatoses ont été confirmés par immunohistochimie.

Les SCF indéterminés, ont été identifiés comme 4 schwannomes malins et 1 fibrosarcome.

Il semble possible de mettre en corrélation chacun des types tumoraux avec une formule immunohistochimique:

Type tumoral	HHF35	S100	MAC387
Fibrosarcome/Fibromatose	-	-	-
Schwannomes	-	+	-
Léiomyosarcomes	+	-	-
FHM	-	-	+

3. DISCUSSION

3.1. Limites et reproductibilité de la méthode:

3.1.1. Non-représentativité de l'échantillon:

L'objectif de notre étude étant l'évaluation de l'expression de quelques marqueurs de différenciation et non la quantification précise de leur expression dans les SCF, le nombre de prélèvements sélectionnés a été volontairement restreint.

3.1.2. Facteurs de variation liés à la technique:

La détection des marqueurs antigéniques de l'étude a été effectuée, sauf pour la protéine S100, à l'aide d'anticorps monoclonaux, facilement disponibles commercialement. On dispose donc de quantités illimitées d'anticorps pour une réactivité donnée ce qui permet la standardisation des techniques immunohistochimiques entre les différents laboratoires qui voudraient les reproduire.

Comme nous l'avons précédemment évoqué dans la partie «Matériel et Méthodes», nous avons fait varier certains paramètres afin d'obtenir une technique aussi standardisée que possible.

Les paramètres en question sont :

- la puissance du four à micro-ondes,
- le temps de passage au four à micro-ondes,
- la quantité de tampon utilisée,
- l'épaisseur des coupes,
- la dilution des anticorps.

Nous voulions obtenir, lors d'essais préliminaires, un marquage correct des cellules positives, avec un minimum de bruit de fond, et une destruction minimale des tissus par le four à micro-ondes :

- la puissance du four à micro-ondes a été fixée à 700 watts car un chauffage à 900 watts provoquait des altérations tissulaires trop importantes,
- le temps de passage idéal s'est avéré être de 20 minutes : une cuisson de 25 minutes induisait des détériorations tissulaires incompatibles avec une lecture correcte des lames,

- il est absolument indispensable, durant le temps de cuisson, de veiller à l'immersion totale des tissus dans la solution tampon, une évaporation trop forte et une exposition directe aux effets du four à micro-ondes provoquant des altérations tissulaires majeures. Nous avons donc choisi une cuisson fractionnée permettant l'ajout de tampon entre deux cycles de chauffage,
- l'épaisseur des coupes est de 2 micromètres. En effet, les lames de 4 micromètres ne permettaient pas une meilleure conservation des tissus lors de la cuisson, et la superposition cellulaire rendait la lecture moins fine,
- les anticorps ont été testés en série sur des tissus normaux et néoplasiques de chat pour deux dilutions d'anticorps différentes correspondant aux deux dilutions d'utilisation indiquées par le fournisseur (Dako, France) et variant de 1/25 à 1/400 selon l'anticorps. Celle donnant le meilleur marquage en intensité et en répartition, avec un bruit de fond minimal, a été conservée et inscrite dans le tableau récapitulant les dilutions choisies pour chaque anticorps (Tableau 4).

L'étape essentielle de la réaction immunohistochimique sur les prélèvements fixés dans le formol consiste à démasquer les épitopes par l'utilisation du four à micro-ondes. En effet, tous les prélèvements n'ont pas subi le même temps de fixation et la fixation dans du formol excédant 24 heures a des effets délétères sur l'antigénicité tissulaire (formations de liaisons entre les groupements aminés des protéines des tissus et de l'aldéhyde pendant la fixation, qui induit la formation de ponts méthylène entre les sites réactifs d'une même protéine et entre différentes protéines ; les agrégats de protéines, ainsi constitués, peuvent entraîner une modification des structures tertiaire et quaternaire de ces protéines, et ainsi limiter l'accessibilité des épitopes antigéniques, ce qui perturbe par la suite la reconnaissance anticorps-antigènes). Certaines études⁷⁴ ont démontré la capacité du four à micro-ondes à restaurer l'immunogénicité de tissus fixés pendant au moins une semaine dans le formol et inclus en paraffine. Ainsi les temps de fixation, souvent variables dans les conditions courantes de diagnostic, n'influenceraient pas la détection des épitopes de différenciation¹⁰.

3.1.3. Facteurs de variation liés à la lecture:

Nous avons réalisé une étude semi-quantitative du pourcentage de cellules tumorales marquées. Mais en renouvelant les lectures, il est possible d'obtenir une certaine répétabilité des résultats.

Une analyse quantitative stricte aurait nécessité le recours à un procédé automatique d'analyse d'images.

3.2. Epidémiologie-clinique:

La région interscapulaire apparaît être un site privilégié pour l'apparition de SCF dans notre étude. Cela est en accord avec les observations de certaines études^{6,37}, pour qui les zones les plus touchées sont par ordre décroissant de fréquence, la région interscapulaire, les flancs et le dos. D'autres indiquent une localisation préférentielle aux membres et à la tête⁹. De même, il ne semble exister aucune prédilection de race ou de sexe, ce qui est en accord avec les données bibliographiques⁵⁶.

3.3. Choix des anticorps:

Nous avons exclu de notre panel d'anticorps les anticorps anti-protéines filaments intermédiaires, couramment utilisés (cytokératine, vimentine, desmine)^{5,17,33,43,51,52,57,63,75}. En effet, les kératines sont spécifiques des cellules épithéliales et toute tumeur suspectée être un carcinome anaplasique a été exclue.

De même, l'ensemble des tumeurs félines non épithéliales⁵¹ (excepté les lymphomes) est positif à la vimentine ; nous l'avons donc exclu de notre panel d'anticorps.

L'expression de la desmine est considérée comme le marqueur le plus sensible de la différenciation musculaire striée. Mais l'expression de cette molécule semble moindre dans les tumeurs des muscles lisses. Un autre marqueur de la différenciation musculaire, spécifique de l'actine musculaire lisse (HHF35) a donc été retenu⁵⁵.

◆ NSE:

La Neurone-Spécifique Enolase (isoforme $\gamma\gamma$) fait partie de la famille des enolases qui sont des homo ou des hétérodimères de trois sous-unités : α (46kDa), β (44kDa) et γ (44kDa). La sous-unité α est exprimée dans la plupart des tissus, alors que la sous-unité β est confinée aux cellules musculaires. La sous-unité γ est, elle, de manière sélective, exprimée par les cellules du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP). L'anticorps anti-NSE a marqué les cellules attendues sur les coupes d'encéphale et de peau et l'ensemble des SCF a été marqué spécifiquement par cet anticorps. Un tel marquage peut être attribué à une néo-expression de telles enolases par les cellules mésenchymateuses dédifférenciées ou non différenciées. Cette

observation est en accord avec celles réalisées chez l'Homme^{14,76}. L'anticorps anti-NSE semble donc inutile pour la classification des SCF du chat.

◆ NF:

Les neurofilaments constituent une famille d'hétéropolymères comprenant trois sous-unités protéiques : NF-H (200kDa), NF-M (160kDa) et NF-L (70KDa). Toutes peuvent être phosphorylées ou déphosphorylées. L'anticorps, utilisé dans cette étude, réagit avec la forme phosphorylée de 70 kDa et marque les neurones, les processus neuronaux et les nerfs périphériques. L'expression des protéines NF est limitée aux SNC et SNP. Dans les hémisphères et le cervelet, on note un marquage fort des axones ; un marquage hétérogène des corps neuronaux (certains étant faiblement marqués comme les cellules de Purkinje) est noté. Cela s'explique probablement par la présence de NF non phosphorylés, en grande quantité, dans ces corps cellulaires. Dans le SNP, les fibres nerveuses sont fortement marquées (marquage axonal).

L'ensemble des SCF étudiés est demeuré négatif. Cet anticorps apparaît être un marqueur strict et très spécifique des neurones et de leurs axones.

◆ S100:

Il s'agit d'une protéine acide se liant au Calcium. Dans le SNC, les cellules gliales (oligodendrocytes et astrocytes), quelques neurones, et les épendymocytes sont marqués et dans le SNP, les cellules de Schwann sont positives.

Un SCF présentant un nodule de métaplasie cartilagineuse centro-tumoral était S100 positif (cellules fusiformes tumorales et chondrocytes). Il a été classé dans le groupe des schwannomes malins. Il semble, en effet, que davantage de schwannomes malins que de fibrosarcomes présentent une métaplasie cartilagineuse²³ et l'immunoréactivité des chondrocytes à la protéine S100^{2,38,39} a déjà été établie.

Pour un SCF, une coexpression de la protéine S100 et de GFAP a été mise en évidence. Ce phénomène est probablement le fait d'une néo-synthèse de protéines durant le processus de dédifférenciation ou d'une absence de différenciation. Toutefois cette coexpression reste marginale dans notre effectif. Chez l'Homme, une étude⁴¹ indique que les schwannomes malins positifs à la GFAP se développeraient en situation plus profonde que ceux négatifs à la GFAP. Notre cas de schwannome positif à la GFAP provient d'un site de prélèvement auriculaire.

Selon les données bibliographiques, la protéine S100 a été identifiée dans une variété de tumeurs neurogéniques et non neurogéniques mais ne peut pas être détectée dans un grand nombre de

néoplasmes comme certains sarcomes (rhabdomyosarcomes, léiomyosarcomes, fibrosarcomes)³⁸. L'expression de la S100 semble donc bien conservée lors du processus tumoral précédant l'émergence des schwannomes et par conséquent, sur ces bases, la protéine S100 apparaît être un marqueur utile pour la différenciation phénotypique des SCF félins.

◆ MAC387:

L'antigène L1 (calprotectine), sous unité de la membrane lysosomiale, est un complexe protéique de 36,5 kDa^{8,11,16} identifié il y a plus de 10 ans comme un antigène cytoplasmique et membranaire (produit de sécrétion) des cellules de la lignée myélo-monocytaire (polynucléaires neutrophiles et monocytes). On le rencontre surtout dans les cellules histiocytaires activées, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Il aurait une action antimicrobienne et antiproliférative dans les lésions tumorales.

Son expression diminuerait avec la maturation des macrophages⁶⁷, suggérant que son expression s'effectue à un stade précoce de la différenciation macrophagique.

L1 est un épitope résistant au formol. Il peut être considéré comme un marqueur utile des macrophages immatures ou de cellules tumorales de la lignée monocyttaire/histiocytaire peu différenciées¹¹. Il serait, de plus, un marqueur plus fiable que les lysozymes (α -antitrypsine et α -antichymotrypsine), si ce n'est que ces derniers seraient plus exprimés dans les cellules épithélioïdes et les cellules géantes. Ces enzymes, qui sont fréquemment utilisés dans les études immunohistochimiques, souffrent, en effet, d'un manque de spécificité en marquant une grande variété de tissus et de tumeurs (carcinomes), chez l'Homme^{37,44,63,71,75}. De même, les anticorps anti-CD68 (EMB11)^{1,15} utilisés chez l'Homme, donnent de très bons résultats sur les macrophages tissulaires mais ne semblent pas réactifs chez le chat¹.

Le MAC387 marque, focalement, aussi bien des cellules d'aspect fusiforme ou histiocytoïde⁷¹. Les macrophages/histiocytes activés et polynucléaires neutrophiles de la stroma-réaction sont également fortement marqués mais n'interfèrent pas avec l'interprétation des résultats car ils restent morphologiquement facilement reconnaissables.

Dans notre étude, le faible nombre de cellules tumorales marquées peut s'expliquer par la non-expression de MAC387 après dédifférenciation tumorale avancée ou après une différenciation peu avancée de ces cellules. Cela conforterait l'hypothèse selon laquelle les FHM proviennent de cellules mésenchymateuses totipotentes, certaines exprimant une différenciation histiocytaire focale^{33,63}.

En utilisant MAC387, le nombre de cellules tumorales d'origine histiocytaire est donc probablement sous-estimé mais le MAC387, par sa grande spécificité, reste un outil diagnostique utile dans l'identification des FHM.

◆ HHF35:

Les actines sont des éléments ubiquitaires du cytosquelette de la plupart des cellules. Ces dernières peuvent être biochimiquement et immunologiquement divisées en trois sous-groupes: les α -actines sont présentes dans les tissus musculaires et les β et γ -actines sont présentes dans les cellules non musculaires, mais un petit sous-groupe de γ -actines serait présent dans les cellules musculaires. HHF35 reconnaît les isomères d'actines α et γ muscle-spécifiques mais ne réagit pas avec les actines non-musculaires.

On note l'existence, dans la plupart des tumeurs (21/35), de cellules HHF35 positives s'agencant en faisceaux courts de largeur variable autour de nombreux petits vaisseaux sanguins et enserrant les nodules tumoraux. Ces cellules ne montrent pas d'atypie cytonucléaire nette et ne possèdent pas toutes les caractéristiques des cellules musculaires lisses. Elles ne correspondent également pas à des fibres musculaires striées emprisonnées dans le tissu tumoral. Elles représenteraient un intermédiaire entre fibroblastes et cellules musculaires lisses, ce qui les apparenterait aux myofibroblastes. Ces cellules myofibroblastiques pourraient dériver des cellules mésenchymateuses périvasculaires³⁶.

Pour certains, ces myofibroblastes sont communément rencontrés dans les lésions pseudo-tumorales et certains sarcomes des tissus mous de bas grade de malignité. Leur présence serait, pour certains, un facteur de bon pronostic^{30,68}. Pour d'autres, ces myofibroblastes seraient un stade transitionnel de fibroblastes et même de macrophages au cours du processus de cicatrisation. Ils sont, d'ailleurs, également présents dans les sarcomes qui se développent à la suite de traumatismes oculaires chez le chat, à où persiste une inflammation chronique. Ce seraient donc ces myofibroblastes, avec des fibroblastes et d'autres cellules mésenchymateuses primitives, qui subiraient une transformation néoplasique suite à la persistance de l'inflammation chronique³³.

3.4. Classification histologique/classification immunohistologique:

Deux fibrosarcomes identifiés à l'histologie conventionnelle (cas 12, cas 13) ont été reclassés dans le groupe des léiomyosarcomes et trois fibrosarcomes (cas 14, cas 15, cas 16) dans le groupe des schwannomes malins. Ces cinq SCF avaient des critères architecturaux et cytologiques de malignité nets (densité cellulaire très élevée, index mitotique élevé : 5 à plus de 8 mitoses sur 10

champs à l'objectif 40) et l'absence de certains critères histologiques nous a probablement conduit à classer ces tumeurs dans le mauvais groupe.

Les SCF indéterminés, ont été identifiés comme 4 schwannomes malins et 1 fibrosarcome ce qui augmente nettement l'effectif relatif des schwannomes. En revanche, les FHM et les léiomyosarcomes restent très minoritaires. Il faut, toutefois, garder à l'esprit que l'effectif limité de notre échantillon ne nous permet pas de conclure quant à l'incidence de chaque type tumoral dans la pathologie spontanée.

Quant aux fibrosarcomes et fibromatoses, les critères histologiques demeurent nécessaires pour assurer leur distinction.

3.5. Perspectives:

Après classification histologique et immunohistochimique des SCF (fibrosarcome, fibrohistiocyte malin, schwannome malin, léiomyosarcome et fibromatose), il serait intéressant et envisageable :

- d'apprécier l'évolution clinique à long terme (sur une période d'au moins deux ans) de chaque groupe tumoral,
- de rechercher une corrélation entre l'évolution clinique des différents types tumoraux et l'expression des marqueurs de prolifération ou de protéines régulatrices de l'apoptose. En effet, les marqueurs de prolifération s'avèrent être des outils dynamiques et performants pour l'appréciation de la malignité tumorale. Ils prennent en compte toutes les phases du cycle cellulaire alors que le dénombrement des mitoses, habituellement utilisé dans les gradings histologiques, n'implique que les cellules en phase M.

CONCLUSION

Si le versant bénignité/malignité est, en général, judicieusement choisi par les pathologistes, il n'en va pas de même pour l'appréciation de l'histogénèse trop souvent fantaisiste des SCF félins. Ainsi Tetu⁷⁴ rapporte qu'un panel de pathologistes trouve un consensus dans 89% des cas pour qualifier la néoplasie de bénigne ou maligne alors que l'accord n'est que de 65% pour établir le diagnostic histologique précis.

Ainsi, sur la foi d'un résultat histologique, le praticien risque fort d'être démenti par le cours des  v nements. Ce climat d'insécurité a d'ailleurs conduit certains pathologistes opportunistes à jouer la carte de la malignité systématique, praticien et client étant plus satisfaits par un «cancer» qui guérit que par une tumeur «bénigne» qui devient incontr lable⁴⁹. Ainsi l'utilité de l'immunohistochimie apparaît évidente.

Nos résultats sur 35 SCF permettent de préconiser l'utilisation de différents anticorps pour la classification précise des sarcomes à cellules fusiformes du chat. Un éventail réduit de marqueurs rend cet outil théoriquement accessible au diagnostic de routine. Cependant la valeur exacte de cet outil ne pourra être appréciée que par une étude prospective ou rétrospective sur un effectif plus important.

REFERENCES

1. **Ackermann B, Debey B.M, Stabel J.H, Gold J.H, Register K.B, and Meehan J.T:** Distribution of anti-CD68 (EBM11) immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin embedded bovine tissues, *Vet.Pathol*; 1994, 31: 340-348.
2. **Albers T.M.J, Alroy L.A, Garrod D, Brown G and Pennick D** Histochemical and ultrastructural characterization of primary cardiac chondrosarcoma, *Vet.Pathol*; 1997, 34:150-151.
3. **Alexander J.W, Riis R.C and al.:** Extraskelatal giant cell tumor in a cat, *Vet.Med.Small Anim.Clin*; 1975, 70: 1161-1166.
4. **Allen S and Duncan J.R:** Malignant fibrous histiocytoma in a cat, *J.Amer.Vet.Med.Assn*; 1988, 192: 90-91.
5. **Andreasen C.B, Mahaffey E.A, and Duncan J.R:** Intermediate filament staining in the cytologic and histologic diagnosis of canine skin and soft tissue tumors, *Vet.Pathol*; 1988, 25: 343-349.
6. **Barrere C :** L'histopronostic en oncologie vétérinaire, Thèse de Médecine vétérinaire : Lyon, 1994.
7. **Bergman Philip J:** Vaccine-associated feline Sarcoma symposium: Etiology of feline vaccine-associated sarcomas: history and update, *J.Amer.Vet.Med.Assn*; 1998, 213: 1424-1425.
8. **Berke K, Halstensen T.S, Jahnsen F, Pulford K, and Brandtzaeg P.** Distribution of macrophages and granulocytes expressing L1 protein (calprotectin) in human Peyer's patches compared with normal ileal lamina propria and mesenteric lymph nodes, *Gut*; 1993, 34: 1357-1363.
9. **Bonnin J.M and Rubinstein L.J:** Immunohistochemistry of central nervous system tumors. Its contributions to neurosurgical diagnosis, *J.Neurosurg*; 1984, 60: 1121-1133.
10. **Bostock D.E and Dye M.T:** Prognosis after surgical excision of fibrosarcomas in cats, *J.Amer.Vet.Med.Assn*; 1979, 175: 727-728.
11. **Brandtzaeg P and al:** Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. Comparison with other leucocyte markers by paired immunofluorescence and immunoenzyme staining, *Am.J.Clin.Pathol*; 1987, 87: 700-707.
12. **Brevet F:** Epidémiologie et étiologie des fibrosarcomes et lésions apparentées du tissu conjonctif cutané et sous-cutané du chat: Etudes de l'influence des injections vaccinales, Thèse de médecine vétérinaire: Lyon, 1998.
13. **Burton G and Mason K.V:** Do postvaccinal sarcomas occur in Australian cats? *Aust.Vet.J*; 1997, 75: 102-106.
14. **Cras P, Martin J.J, and Gheuens J:** Gamma-enolase and glial fibrillary acidic protein in nervous system tumors. An immunohistochemical study using specific monoclonal antibodies, *Acta Neuropathol*; 1988, 75: 377-384.
15. **Costa M, McGlothlen L, Pierce M, Munn R, and Voght PJ:** Angiomatoid features in fibrohistiocytic sarcomas. Immunohistochemical, ultrastructural, and clinical distinction from vascular neoplasms, *Arch.Pathol.Lab.Med*; 1995, 119: 1065-1071.
16. **Dale I, Brandtzaeg P, Fagerrhol M.K, and Scott H:** Distribution of a new myelomonocytic antigen (L1) in human peripheral blood leukocytes. Immunofluorescence and immunoperoxydase staining features in comparison with lysozyme and lactoferin, *Am.J.Clin.Pathol*; 1985, 84: 24-34.
17. **Desnoyers M.M, Haines D.M, and Searcy G.P:** Immunohistochemical detection of intermediate filament proteins in formalin fixed normal and neoplastic canine tissues, *Can.J.Vet.Res*; 1990, 54: 360-365.
18. **Devauchelle P, Delisle F, et Doliger S :** Les fibrosarcomes dits " postvaccinaux " chez le chat : mise au point, *Le Point Vétérinaire*; 1997, 28(186) : 8-9.

19. **Doliger S et Devauchelle P**: Données actuelles sur les tumeurs du " complexe fibrosarcome félin ", *Le Point Vétérinaire*; 1998, 29(192) : 27-36.
20. **Dyck R.H, Van Eldik L.J, and Cynader M.S**: Immunohistochemical localization of the S100 beta protein in postnatal cat visual cortex: spatial and temporal patterns of expression in cortical and subcortical glia, *Brain.Res.Dev*; 1993, 72: 181-192.
21. **Ellis J.A, Jackson M.L, Bartsch R.C and al.**: Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats: *J.Amer.Vet.Med.Assn*; 1996, 209: 767-771.
22. **Engle G.C and Brodey R.S**: A retrospective study of 395 feline neoplasms, *J.Amer.Anim.Hosp.Assn*; 1969, 5: 21-31.
23. **Enzinger F.M and Weiss S.E**: Soft tissue tumors: Second edition, St Louis: CV Mosby, 1988, 781-815.
24. **Ferrer L, Rabanal R.M, Fondevila D, and Prats N**: Immunohistochemical demonstration of intermediate filament proteins, S100 protein and CEA in apocrine sweat glands and apocrine gland derived lesions of the dog, *Zentralbl Veterinarmed A*; 1990, 37: 569-576.
25. **Ford G.H, Empson J.R and al.**: Giant cell tumor of soft parts, *Vet.Pathol*; 1975, 12: 428-433.
26. **Garma-Avina**: Malignant fibrous histiocytoma of the giant cell type in a cat, *J.Comp.Path*; 1987, 97: 551-557.
27. **Gleiser C.A, Raulston G.L, Jardine J.H and Gray K.N**: Malignant fibrous histiocytoma in dogs and cats, *Vet.Pathol*; 1979, 16: 199-208.
28. **Gross T.T, Ihrke P.J, and Walder E.J**: Veterinary dermatopathology. A macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease, St Louis: Mosby yearbook, MO, 1992, 413-415.
29. **Guillermo Couto C and Macy D.W**: Vaccine-associated feline Sarcoma symposium: Review of treatment options for vaccine-associated feline sarcoma, *J.Amer.Vet.Med.Assn*; 1998, 213: 1426-1427.
30. **Hayden D.W, Ghobrial H.K, Johnson K.H, and Buoen L.C**: Feline mammary sarcoma composed of cells resembling myofibroblasts, *Vet.Pathol*; 1986, 23:118-124.
31. **Hendrick M.J**: Vaccine-associated feline Sarcoma symposium: Historical review and current knowledge of risk factors involved in feline vaccine-associated sarcomas, *J.Amer.Vet.Med.Assn*; 1998, 213: 1422-1423.
32. **Hendrick M.J**: Vaccine-associated feline Sarcoma symposium: Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis, *J.Amer.Vet.Med.Assn*; 1998, 213: 1425-1426.
33. **Hendrick M.J and Brooks J.J**: Postvaccinal sarcomas in the cat: Histology and Immunohistochemistry, *Vet.Pathol*; 1994, 31: 126-129.
34. **Hendricks M.J and Dunagan B.S**: Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988-1989), *J.Amer.Vet.Med.Assn*; 1991, 198: 304-305.
35. **Hershey A.E, Sorenmon K.U, Hendricks M.J, Shofer F.S and Vail D.M**: Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996), *J.Amer.Vet.Med.Assn*; 2000, 216: 58-61.
36. **Iwasaki H, Teruto I, Tsutomu I, and Masahiro K**: Intermediate filaments of myofibroblasts: immunohistochemical and immunocytochemical analysis, *Pathol.Res.Pract*; 1987, 182: 248-254.
37. **Ilgart E**: Contribution à l'étude du complexe fibrosarcome félin chez le chat : apport de l'histologie et de l'analyse factorielle des correspondances ; Thèse de Médecine Vétérinaire : Lyon, 1991.

38. **Kahn H.J, Marks A, Thom H, and Baumal R** Role of antibody to S100 Protein in diagnostic pathology, *Am.J.Clin.Pathol*; 1983, 79: 341-347.
39. **Karabela-Bouropoulo V, Markaki S, and Milas C** S100 protein and neuron-specific enolase immunoreactivity of normal, hyperplastic and neoplastic chondrocytes in relation to the composition of the extracellular matrix, *Pathol.Res.Pract*; 1988, 183: 761-66.
40. **Kass P.H, Barnes G, William J.R and al.**: Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats, *J.Amer.Vet.Med.Assn*; 1993, 203: 396-405.
41. **Kawahara E, Oda Y, Ooi A, Katsuda S, Nakanishi I, and Umeda S**: Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in peripheral nerve sheath tumors. A comparative study of immunoreactivity of GFAP, vimentin, S100 protein, and neurofilament in 38 schwannomas and 18 neurofibrosarcomas, *Am.J.Surg.Pathol*; 1988, 12: 115-120.
42. **Kerlin R.L and Hendrick M.J**: Malignant fibrous histiocytoma and malignant histiocytosis in the dog: convergent or divergent phenotypic differentiation, *Vet.Pathol*; 1996, 33: 713-716.
43. **LaRock R.G and Ginn P.E**: Immunohistochemical staining characteristics of canine gastrointestinal stromal tumors, *Vet.Pathol*; 1997, 34: 303-311.
44. **Leader M, Patel J and al.**: Anti alpha -1-antichymotrypsine staining of 194 sarcomas, 38 carcinomas, and 17 malignant melanomas, *Am.J.Surg.Pathol*; 1987,11: 133-139.
45. **Leveque N.W**: Update on vaccine-associated sarcoma, *J.Amer.Vet.Med.Assn*; 1998, 212: 1350.
46. **Leveque N.W**: Symposium devoted to vaccine-associated feline sarcomas, *J.Amer.Vet.Med.Assn*; 1998, 213: 785.
47. **Macy D.W and Hendricks M.J**: The potential role inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats, *Veterinary clinics of North America: Small animal practice*; 1996, 26: 103-109.
48. **Macy D.W**: The potential role and mechanism of FeIV vaccine-associated neoplasms, *Seminars in veterinary medicine and surgery (Small animal)*; 1995, 10: 234-237.
49. **Magnol J.P, Fournel C et al.** : Une nouvelle approche, diagnostique et pronostique des tumeurs des tissus mous du chien et du chat, *Le Point Vétérinaire*; 1991, 22(134) : 43-51.
50. **Martin De Las Mulas J, Espinosa De Los Monteros A, Carrasco L, Sierra M.A, and Vos J.H** : Immunohistochemical distribution of Vimentin, Desmin, Glial Fibrillary Acidic Protein and Neurofilament Proteins in Feline Tissues , *J.Vet.Med.A* ; 1994, 41: 1-15.
51. **Martin De Las Mulas J, Espinosa De Los Monteros A, Carrasco B, Van Niel M, and Fernandez A** : Immunohistochemical distribution pattern of intermediate filament proteins in 50 Feline neoplasms, *Vet.Pathol*; 1995, 32: 692-701.
52. **Martin De Las Mulas J, Vos J.H, and Van Niel M** : Desmin and Vimentin immunocharacterization of feline muscle tumors, *Vet.Pathol*; 1992, 29: 260-262.
53. **Martorell M, Calabuig C, Peydro-Olaya A, and Llombart-Bosch A**: Fibroblast and Myofibroblast participation in malignant fibrous histiocytoma of bone, *Path.Res.Pract*; 1989, 184: 582-590.
54. **Matsunou H, Shimoda T, Kakimoto S, Yamashita H, Ishikawa E, and Mukai M**: Histopathologic and immunohistochemical study of malignant tumors of peripheral nerve sheaths (malignant schwannoma), *Cancer*; 1985, 56: 2269-2279.
55. **Miettinen Markku**: Antibody specific to muscle actins in the diagnosis and classification of soft tissue tumors, *Am.J.Pathol*; 1988, 130: 205-215.
56. **Miller M.A, Nelson S.L and al.**: Cutaneous neoplasia in 340 cats, *Vet.Pathol*; 1991, 28: 389-395.

57. **Moore S, Madewell B.R and Lund J.K:** Immunohistochemical evaluation of intermediate filament expression in canine and feline neoplasms, *Am.J.Vet.Res*; 1989, 50: 88-92.
58. **Mori M, Ninomiya T, Okada Y, and Ttsukitani K:** Myoepithelial adenomas of salivary gland origin: Immunohistochemical evaluation of filaments proteins, S100 alpha and beta, Glial fibrillary acidic proteins, Neurone-specific enolase, and Lactoferrin, *Path.Res.Pract*; 1989, 184: 168-178.
59. **Motozawa A, Yamazaki H and al.:** Aggressive fibromatosis in a cat, *J.Vet.Med.Sci*; 1992, 54: 329-333.
60. **Moulton J.E:** Tumors in domestic animals, Third edition, Berkeley, University of California, 1990.
61. **Nielsen S.W:** Classification of tumors in dogs and cats; *J.Amer.Anim.Hosp.Assn*; 1983, 19: 13-52.
62. **Omi K, Kitano Y, Agawa H and Kadota Y:** An immunohistochemical study of peripheral neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, anaplastic ganglioma, schwannoma and neurofibroma in cattle, *J.Comp.Path*; 1994, 111: 1-14.
63. **Pace L.W, Kreeger J.M, Miller M.A, Turk J.R, and Fischer J.R:** Immunohistochemical staining of feline malignant fibrous histiocytoomas, *Vet.Pathol*; 1994, 31:168-172.
64. **Perez J, Bautista M.J, Rollon E and al.:** Immunohistochemical characterization of hemangiopericytomas and other spindle cell tumors in the dog, *Vet.Pathol*; 1996, 33: 391-397.
65. **Renlund R.C and Pritzker K.P.H:** Malignant Fibrous Histiocytoma involving the digit of a cat, *Vet.Pathol*; 1984, 21: 442-444.
66. **Richards J.R:** Vaccine-associated feline Sarcoma symposium: Education communication: history and current status, *J.Amer.Vet.Med.Assn*; 1998, 213: 1429-1430.
67. **Rugtveit J, Scott H, Halstensen TS, Norstein J, and Brandtzaeg P:** Expression of the L1 antigen (calprotectin) by tissue macrophages reflects recent recruitment from peripheral blood rather than upregulation of local synthesis: implications for rejection diagnosis in formalin-fixed kidney specimens, *J.Pathol*; 1996, 180: 194-199.
68. **Sappino A.P, Schürch W, and Gabbiani G:** Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as markers of phenotypic modulations, *Lab.Invest*; 1990, 63: 144-161.
69. **Schulden U, Walter J.H, Gutberlet K, and Rudolph R:** Immunohistochemical identification of B lymphocytes in canine lymph nodes embedded in paraffin wax by using an antibody to CD79a antigen, *Eur.J.Vet.Path*; 1998, 4: 81-83.
70. **Scott W:** Feline dermatology 1900 to 1978: a monograph, *J.Amer.Anim.Hosp.Assn*; 1980, 16: 331-459.
71. **Scott W, Binder M.D and al.:** A histiocyte-specific marker in the diagnosis of malignant fibrous histiocytoma. Use of monoclonal antibody KP-1, *Am.J.Clin.Pathol*; 1992, 97: 759-763.
72. **Sheppard M.N, Kurian S.S, Henzen-Logmans S.C, Michetti F, Cocchia D, Cole P, Rush R.A, Marangos P.J, Bloom S.R, and Polak J.M:** Neurone-specific enolase and S100: new markers for delineating the innervation of the respiratory tract in man and other mammals, *Thorax*; 1983, 38: 333-340.
73. **Shi and Iman:** Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies, *J.Histochem.Cytochem*; 1995, 43: 193-201.

74. **Tetu B, Hunt A, Mac Caughey W.T.E, et Lagace R** : Evaluation des divergences d'opinion sur le diagnostic histopathologique des tumeurs des tissus mous, *Ann.Pathol*; 1984, 4 : 267-271.
75. **Thoolen R.J.M.M, Vos J.H, Van Der Linde-Spipman J.S and al.**: Malignant fibrous histiocytomas in dogs and cats: an immunohistochemical study, *Res.Vet.Sci*; 1992, 53: 198-204.
76. **Vinores S.A, Bonnin J.M, Rubinstein L.J, and Marangos P.J**: Immunohistochemical demonstration of neuron-specific enolase in neoplasms of the CNS and others tissues, *Arch.Pathol.Lab.Med*; 1984, 108: 536-40.
77. **Vos J.H, Van den Ingh W, Misdorp W, Molenbeek R.F, Van Mil F.N, Rutterman G.R, Ivanyi D, and Ramaekers F.C.S**: Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and alpha -smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine, *Vet.Quart*; 1993, 15: 89-95.
78. **Whitehead J.E**: Neoplasia in the cat, *Vet.Med.Small.Anim.Clin*; 1967, 62: 357-358.

ANNEXES

-Annexe 1- ‘Education/communication history and current status’

James R. Richards, DVM

The major impetus for intense investigation of feline vaccine-associated sarcomas continues to be the concern expressed by practicing veterinarians. Regardless of what else may be said, the issue of sarcoma development at vaccine sites represents one of the most serious public relations dilemmas facing veterinarians today. Following is an excerpt from a letter, sent to all major news magazines in May 1997 by a discouraged and angry cat owner whose pet died as a result of a vaccine-associated sarcoma:

(Vaccine-associated) fibrosarcoma is a dirty little secret that veterinarians have been keeping from pet owners.... Your veterinarian may be withholding information from you that could result in the maiming and death of your pet...I was never informed by anyone that these vaccinations could result in malignant tumors. The failure to disclose this vital information is a serious breach of ethics; this is animal cruelty, and it is unethical and immoral. In my opinion, greed is driving the veterinary community (vaccine manufacturers and veterinarians) who are fully aware of the agony they are causing but find vaccination too lucrative to speak out.

From a letter sent to the AVMA, again in May 1997:

Your professional organization (the AVMA) has been irresponsible in informing the public of potential risks associated with vaccinations. Those of your membership who downplay and/or do not clarify the risk of vaccination to cat owners have no business continuing practice. I am not saying that by understanding the odds I would not have chosen to vaccinate. I am saying that the withholding of information is unethical at best, and most likely prosecutable....Who do you want to tell the rest of the cat-owning population? Me or you? Since my cat's diagnosis I have told every person I have encountered about the slight but real danger of vaccine-induced sarcoma. Somehow it didn't seem as hard to tell others as it did to tell my 12 year-old son that I screwed up by taking his cat for her vaccinations.... So sorry that some of you might worry about how this will affect your bottom line...

Finally, from a paper with the heading, “My cat was killed last year by vaccinations approved by the AVMA,” being distributed by picketers outside AVMA’s 1997 annual convention:

What the AVMA is allowing is an outrage—and it should be against the law. At the very least it’s ethically wrong— these are the people who are supposed to protect our animals. I believe the

AVMA, as well as many veterinarians and vaccine manufacturers know what's going on. They just don't care enough to move quickly on this.

Thankfully, by the time these comments were written, the **Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force (VAFSTF)** was well established and moving quickly to address the issue. The task force saw the importance of responding proactively—presenting accurate and balanced information to a broad audience—as quickly as possible. A feared consequence of reacting after the fact to inaccurate or alarmist material in the media was that clients might avoid vaccinating their cats altogether and inadvertently increase the risk of the pet acquiring a serious infectious disease. Additionally, a timely and forthcoming response was the best way to preempt any public misconception of complacency—or even worse, an attempted cover-up—on the part of the profession.

To the Veterinarian First...

Although information about vaccine-associated sarcomas had been in veterinary medical literature for the past several years, it was feared that a public “media blitz” might blindside a small number of veterinarians, so raising veterinary awareness of the issue was an initial priority, as was providing materials that would facilitate responding to client concerns. Information about the formation of the VAFSTF and initial vaccination guidelines were published in various professional journals and veterinary news magazines (e.g., *Journal of the AVMA*, *American Animal Hospital Association Trends*, *DVM Magazine*). Activities of the task force (e.g., grant announcements and recipients, information about financial supporters, and other pertinent information) continue to be published regularly as needed. The task force also established a web page¹(<http://www.avma.org/vafstf/default.htm>) that contains similar information.

A brochure, “Vaccines and Sarcomas: A Concern for Cat Owners,” was developed by the task force and is distributed through the AVMA, AAHA, and the Cornell Feline Health Center. To further widen distribution, permission to reprint information from the brochure in its entirety has been freely granted to veterinarians for inclusion in individual practice newsletters. The brochures also are available to humane societies and similar organizations. A companion brochure, “Feline Vaccines: Benefits and Risks,” can be obtained from the Cornell Feline Health Center.

¹ JAVMA, Vol 213, No. 10, November 15, 1998

Vaccine-Associated Feline Sarcoma Symposium 1429

...And Then the Cat Owner

Even though the ideal way for a cat owner to receive information about vaccine-associated sarcoma is from his or her veterinarian, the high profile of the issue necessitated a public response. Once news releases were published in veterinary journals and client education brochures were made available to veterinarians, information was distributed widely to cat owners through a variety of means. Interviews for television broadcasts (e.g., CNN Science and Technology Week, Fox PetNews), radio, newspaper (e.g., the *Washington Post*), news magazines (e.g., *US News and World Report*) and lay cat publications (e.g., *CatWatch* and *Cats Magazine*) were granted. Requests for information and interviews were all directed to a single person (the chairperson of the education/communication subgroup) to ensure an accurate response.

So Is It Working?

Although the problem of vaccine-associated sarcomas has yet to be solved, the response of the veterinary profession to the condition has been laudable. The proactive, profession-wide effort to inform veterinarians and cat owners has increased veterinary awareness of the issue and minimized the appearance of alarmist messages in the media, which are essential to ensuring that cats continue to receive vaccinations appropriately.

-Annexe 2- Tampon phosphate salin (PBS)/ Tampon citrate

Tampon salin (PBS) :

Pour un litre :

K ₂ HPO ₄ anhydre	15.154g
KH ₂ PO ₄ anhydre	7.769g
NaCl	87.660g

Pour l'utilisation, diluer au 1/10, on obtient un tampon d'environ 0.16 M à pH 7.4-7.6 dans lequel on ajoute 0.1 à 0.2 g/1000 ml de lait écrémé instantané ou de l'albumine bovine fraction 30 S à 0.1% (SAB).

Tampon citrate 10mM, pH 6 :

Solution A : Acide citrique 0.1 M.

Acide citrique monohydraté :	21.01g
H ₂ O distillée qsp :	1000ml.

Solution B : Citrate de sodium 0.1 M.

Citrate de sodium :	29.41g
H ₂ O distillée qsp :	1000ml.

Tampon pH>6 :

Solution A :	18 ml.
Solution B :	100ml.
H ₂ O distillée qsp :	1000ml.

-Annexe 3- Résultats de l'immunomarquage des 35 SCF

Cas	Diagnostic Histologique	Expression tumorale des antigènes							Diagnostic I.
		NSE	MAC387	HHF35	CD79	S100	NF	GFAP	
1	Schwannome 11259-99	4+	-	Rp	-	3+	-	3+	Schwannome
2	Schwannome 7369-98 1° 2°	4+	-	Rp	-	2+	-	-	Schwannome
3	Schwannome 4811-99	4+	-	Rp	-	2+	-	-	Schwannome
4	Schwannome 757-98	3+	-	Rp	-	2+	-	-	Schwannome
5	Schwannome 10652-98	2+	-	-	-	1+	-	-	Schwannome
6	Fibrosarcome 2980-98	4+	-	Rp	-	-	-	-	Fibrosarcome
7	Fibrosarcome 10628-98	4+	-	Rp	-	-	-	-	Fibrosarcome
8	Fibrosarcome 10450-98	3+	-	-	-	-	-	-	Fibrosarcome
9	Fibrosarcome 3863-97	2+	-	Rp	-	-	-	-	Fibrosarcome
10	Fibrosarcome 4975-97	4+	-	Rp	-	-	-	-	Fibrosarcome
11	Fibrosarcome 10163-98	1+	-	-	-	-	-	-	Fibrosarcome
12	Fibrosarcome 10317-98	4+	-	4+	-	-	-	-	Leiomyosarc.
13	Fibrosarcome 10206-98	4+	-	4+	-	-	-	-	Leiomyosarc.
14	Fibrosarcome 7875-98	4+	-	Rp	-	4+	-	-	Schwannome
15	Fibrosarcome 8115-98 1°2°	4+	-	-	-	4+	-	-	Schwannome
16	Fibrosarcome 3540-98	4+	-	Rp	-	3+	-	-	Schwannome
17	Fibrosarcome 4099-99	4+	-	Rp	-	-	-	-	Fibrosarcome
18	Fibrosarcome 4511-97	4+	-	Rp	-	-	-	-	Fibrosarcome
19	Fibrosarcome 9723-98 1°2°	4+	-	Rp	-	-	-	-	Fibrosarcome
20	Fibrosarcome 10063-98	4+	-	-	-	-	-	-	Fibrosarcome
21	Fibrosarcome 5525-98	3+	-	-	-	-	-	-	Fibrosarcome
22	Fibrosarcome 7954-98	2+	-	-	-	-	-	-	Fibrosarcome
23	Fibromatose 3969-97	2+	-	Rp	-	-	-	-	Fibromatose
24	Fibromatose 1189-98	?	-	-	-	-	-	-	Fibromatose
25	Fibromatose 9082-98	1+	-	Rp	-	-	-	-	Fibromatose
26	Fibromatose 1659-98	1+	-	-	-	-	-	-	Fibromatose
27	Leiomyosarcome 3626-98	4+	-	3+	-	-	-	-	Leiomyosarc.
28	Leiomyosarcome 3717-98	3+	1+	Rp	-	-	-	-	FHM
29	FHM 3698-98	4+	1+	Rp	-	-	-	-	FHM
30	FHM 99P154	3+	1+	Rp	-	-	-	-	FHM
31	Indeterminée 8030-97 1°2°	4+	-	Rp	-	2+	-	-	Schwannome
32	Indeterminée 1122-98	2+	-	-	-	3+	-	-	Schwannome
33	Indeterminée 6761-98	4+	-	Rp	-	3+	-	-	Schwannome
34	Indeterminée 10484-98	4+	-	-	-	-	-	-	Fibrosarcome
35	Indeterminée 4548-97	3+	-	Rp	-	2+	-	-	Schwannome
Pourcentage		100%	8,5%	11,5%	0%	37%	0%	6%	

-1+ : <10% cellules positives

-2+ : >10% mais <50% cellules positives

RP : réaction périvasculaire

- 3+ : >50% cellules positives mais < 90% cellules positives

- 4+ : >90% cellules positives.

Diagnostic I : Diagnostic immunohistochimique

-Annexe 4- L'anticorps anti-actine musculaire spécifique (HHF35)

Anticorps	Caractéristiques du marquage	Cellules musculaires	Cellules myoépithéliales	Péricytes	Neurones	Axones	Astrocytes	Oligodendrocytes	Cellules épendymaires	Cellules de Schwann	Cellules myélo-monocytaires	
HHF35	Présence / Absence	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	
	Localisation	Cytoplasmique										
	Intensité	+++	+++	+++								
	Bruit de fond	Non	Non	Non								
Marquage non spécifique	Cet anticorps réagit avec des cellules identifiées comme des fibroblastes qui constituent la stroma de certaines tumeurs (tissu fibreux hyperplasique)											

Les actines sont des constituants des microfilaments, éléments ubiquitaires du cytosquelette de la plupart des cellules. Les actines peuvent être biochimiquement et immunologiquement divisées en trois principaux sous-groupes : alpha actines qui sont présentes dans les tissus musculaires et les bêta et gamma actines, présentes dans les cellules non musculaires; on peut trouver un petit sous-groupe de gamma actines dans les cellules musculaires.

Ici HHF35 reconnaît les isomères d'actines alpha et gamma muscle-spécifiques mais ne réagit pas avec les actines non-musculaires. HHF35 marque les cellules musculaires lisses et squelettiques tout comme les cellules myoépithéliales, les péricytes des petits vaisseaux. Les cellules vasculaires endothéliales et les fibroblastes sont négatifs pour HHF35.

-Annexe 5- L'anticorps anti-antigène myéloïde/histiocyte (MAC387)

Anticorps	Caractéristiques du marquage	Cellules musculaires	Cellules myoépithéliales	Péricytes	Neurones	Axones	Astrocytes	Oligodendrocytes	Cellules épendymaires	Cellules de Schwann	Cellules myélo-monocytaires
	Présence / Absence	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
	Localisation	Cytoplasmique/membrane cytoplasmique									
MAC387	Intensité										+++
	Bruit de fond										Non
	Marquage non spécifique										

L'antigène L1 (calprotectine) est un complexe protéique majeur du cytosol de nombreuses cellules myélo-monocytaires (monocytes et polynucléaires neutrophiles en particulier).

On le trouve surtout dans les cellules histiocytaires activées. Il aurait une action antimicrobienne et antiproliférative dans les lésions tumorales. Cependant l'antigène L1 verrait sa concentration diminuer avec la maturation des macrophages⁵⁴, suggérant que son expression s'effectue à un stade précoce de la différenciation macrophagique.

Parce que L1 est un épitope résistant au formol, il peut être considéré comme un marqueur utile des macrophages immatures ou de cellules tumorales de la lignée monocyttaire/histiocytaire peu différenciées.

-Annexe 6- L'anticorps anti-neurone spécifique enolase (NSE)

Anticorps	Caractéristiques du marquage	Cellules musculaires	Cellules myoépithéliales	Péricytes	Neurones	Axones	Astrocytes	Oligodendrocytes	Cellules épendymaires	Cellules de Schwann	Cellules myélo-monocytaires	
NSE	Présence / Absence	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	
	Localisation	Cytoplasmique/membrane cytoplasmique										
	Intensité	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Bruit de fond	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Marquage non spécifique												

Les enolases sont des homo ou des hétérodimères de trois sous-unités: α (46kDa), β (44kDa), et γ (44kDa). La sous-unité α est exprimée dans la plupart des tissus alors que la sous-unité β est confinée aux cellules musculaires. La sous-unité γ est exprimée dans les cellules d'origine nerveuse du système nerveux central et périphérique. L'isoforme $\gamma\gamma$ est utilisée dans cette étude.

-Annexe 7- L' anticorps anti-protéine S100 (S100)

Anticorps	Caractéristiques du marquage	Cellules musculaires	Cellules myoépithéliales	Péricytes	Neurones	Axones	Astrocytes	Oligodendrocytes	Cellules épendymaires	Cellules de Schwann	Cellules myélo-monocytaires
	Présence / Absence	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
	Localisation	Cytoplasmique et nucléaire									
S100	Intensité				+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	Bruit de fond				Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	
	Marquage non spécifique	Les chondrocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans, les cellules folliculaires dentritiques et interdigitées des noeuds lymphatiques, les cellules des glandes sudorales apocrines et les cellules myoépithéliales.									

Il s'agit d'une protéine acide se liant au Calcium appelée S100 à cause de sa solubilité à 100% dans du sulfate d'ammonium. On note un marquage positif des cellules gliales (oligodendrocytes et astrocytes), quelques neurones, épendymocytes du système nerveux central et les cellules de Schwann du système nerveux périphérique.

-Annexe 8- L'anticorps anti-protéine neurofilament (NF)

Anticorps	Caractéristiques du marquage	Cellules musculaires	Cellules myoépithéliales	Péricytes	Neurones	Axones	Astrocytes	Oligodendrocytes	Cellules épendymaires	Cellules de Schwann	Cellules myélo-monozytaires	
NF	Présence / Absence	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	
	Localisation	Cytoplasmique										
	Intensité				+++	+++						
	Bruit de fond				Non	Non						
Marquage non spécifique												

Les neurofilaments constituent une famille d'hétéropolymères formés de trois sous-unités protéiques NF-H (200kDa), NF-M (160kDa) et NF-L (70kDa). Toutes contiennent du phosphate, qui est en grande quantité dans NF-H et NF-M et en plus faible quantité dans NF-L. L'anticorps utilisé réagit avec la forme phosphorylée de 70 kDa. L'anticorps marque les neurones, les processus neuronaux et les nerfs périphériques.

-Annexe 9- L'anticorps anti-protéine gliale fibrillaire acide (GFAP)

Anticorps	Caractéristiques du marquage	Cellules musculaires	Cellules myoépithéliales	Péricytes	Neurones	Axones	Astrocytes	Oligodendrocytes	Cellules épendymaires	Cellules de Schwann	Cellules myélo-monocytaires
	Présence / Absence	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Non
	Localisation	Cytoplasmique									
GFAP	Intensité						+++		+++	+++	
	Bruit de fond						Non		Non	Non	
	Marquage non spécifique	Cellules myoépithéliales des canaux sudoripares apocrines.									

L'anticorps est dirigé contre la protéine filament intermédiaire de 52kDa, la protéine acide fibrillaire gliale, du cerveau et de la moelle épinière. Il marque les astrocytes et certaines cellules épendymaires du système nerveux central, mais ne marque pas les oligodendrocytes et les neurones. Dans le SNP, les cellules de Schwann sont marquées.

-Annexe 10- L'anticorps anti-cellules B-lymphocytaires (CD79a cg)

Anticorps	Caractéristiques du marquage	Cellules musculaires	Cellules myoépithéliales	Péricytes	Neurones	Axones	Astrocytes	Oligodendrocytes	Cellules épendymaires	Cellules de Schwann	Cellules myélo-monocytaires
	Présence / Absence	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
	Localisation	Cytoplasmique/membrane cytoplasmique									
CD79a cg	Intensité										+++
	Bruit de fond										Non
	Marquage non spécifique										

Le polypeptide mb-1 forme avec le polypeptide B29, un hétérodimère associé aux immunoglobulines membranaires des cellules B-lymphocytaires. Ces composants constituent un complexe récepteur de l'antigène des cellules B. Quand l'antigène est lié à ce complexe, un signal de transduction est émis à l'intérieur de la cellule associé à la phosphorylation de plusieurs composants. Le dimère mb-1/B29 peut être considéré pour les cellules B-lymphocytaires comme l'équivalent du CD3 des cellules lymphocytaires T. Il apparaît à des stades précoces de la différenciation B-lymphocytaire et la chaîne mb-1, qui constitue l'anticorps, est toujours présente aux stades plasmocytaires.

ILLUSTRATIONS

Photo 1 - Cas 7875-98, Schwannome malin. Grossissement x 40. Marquage cytoplasmique des cellules myofibroblastiques de la stroma réaction périphérique par l'anticorps monoclonal HHF35. Méthode Streptavidine-Biotine peroxydase standard ; révélation au diaminobenzidine tétrahydrochloride (précipité brun); contrecoloration à l'Hématoxiline de Mayer.

Photo 2 - Cas 3540-98, Schwannome malin. Grossissement x 400. Marquage cytoplasmique des cellules myofibroblastiques de la stroma réaction périphérique par l'anticorps monoclonal HHF35. Absence d'atypie cytonucléaire. Méthode Streptavidine-Biotine peroxydase standard ; révélation au diaminobenzidine tétrahydrochloride (précipité brun); contrecoloration à l'Hématoxiline de Mayer.

Photo 3 - Cas 11259-98, Schwannome malin. Grossissement x 1000. Marquage cytoplasmique et nucléaire des cellules tumorales par l'anticorps polyclonal S100. Méthode Streptavidine-Biotine peroxydase standard ;révélation au diaminobenzidine tétrahydrochloride (précipité brun); contrecoloration à l'Hémathoxiline de Mayer.

Photo 4 - Cas 7369-98, Schwannome malin. Grossissement x 1000. Marquage cytoplasmique et nucléaire des cellules tumorales par l'anticorps polyclonal S100. Méthode Streptavidine-Biotine peroxydase standard ; révélation au diaminobenzidine tétrahydrochloride (précipité brun); contrecoloration à l'Hémathoxiline de Mayer.

Photo 5 - Cas 3698-98, Léiomyosarcome. Grossissement x 1000. Marquage cytoplasmique des cellules tumorales par l'anticorps monoclonal HHF35. Présence d'atypies cytonucléaires. Méthode Streptavidine-Biotine peroxydase standard ; révélation au diaminobenzidine tétrahydrochloride ; contrecoloration à l'Hématoxiline de Mayer.

Photo 6 - Cas 3698-98, FHM. Grossissement x 1000. Marquage cytoplasmique des cellules tumorales d'origine histiocytaire par l'anticorps monoclonal MAC387. Méthode Streptavidine-Biotine peroxydase standard ; révélation au diaminobenzidine tétrahydrochloride (précipité brun); contrecoloration à l'Hématoxiline de Mayer.

Photo 7 - Cas 99P154, FHM. Grossissement x 1000. Marquage des cellules tumorales d'origine histiocytaire par l'anticorps monoclonal MAC387. Méthode Streptavidine-Biotine peroxydase standard ; révélation au diaminobenzidine tétrahydrochloride (précipité brun); contrecoloration à l'Hématoxiline de Mayer.

Photo 8 - Cas 99P154, FHM. Grossissement x 1000. Marquage des cellules tumorales d'origine histiocytaire par l'anticorps monoclonal MAC387. Méthode Streptavidine-Biotine peroxydase standard ; révélation au diaminobenzidine tétrahydrochloride (précipité brun); contrecoloration à l'Hématoxiline de Mayer.