

Année 2005

**LE COMPLEXE FIBROSARCOME FELIN :  
POTENTIEL D'IMPLICATION DES  
INJECTIONS VACCINALES ADJUEES, NON  
ADJUEES.  
ETUDE PRELIMINAIRE DE DEUX VACCINS.**

THESE

Pour le  
DOCTORAT VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

Le 21 avril 2005

Par

**Thomas, Jean-Michel PERROT**

Né le 13 janvier 1979 à PARIS, 15<sup>ème</sup> (Seine)

JURY

Président : M.....

Professeur à la faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Pr. F. CRESPEAU

Professeur UP d'anatomie pathologique à l'ENVA

Assesseur : Dr D. ROSENBERG

Maître de conférences UP de Médecine à l'ENVA

Invité

Docteur vétérinaire P. DEVAUCHELLE

Centre de cancérologie de l'ENVA

# TABLE DES MATIERES

Introduction ..... p.7

## **Première partie : étude bibliographique. Les tumeurs du complexe fibrosarcome félin et leur rapport potentiel à l'injection vaccinale**

**I/ Présentation des tumeurs du complexe fibrosarcome félin**..... p.11

**1/ Présentation clinique des tumeurs du complexe fibrosarcome félin**..... p.11

a / Sites préférentiels des tumeurs du complexe fibrosarcome félin : distinction de deux groupes : ceux aux sites habituels d'injection et ceux aux autres sites ..... p.11

b/ Comportement local et à distance des tumeurs du complexe fibrosarcome félin..... p.11

c/ Age d'apparition des fibrosarcomes aux sites d'injection..... p.12

d/ Taux de récurrence des fibrosarcomes aux sites d'injection ..... p.12

**2/ Présentation histologique des tumeurs du complexe fibrosarcome félin**..... p.13

a/ Différents types histologiques ..... p.13

b/ Description histologique ..... p.13

c/ Critères histologiques permettant de différencier un fibrosarcome présent aux sites habituels d'injection d'un fibrosarcome présent aux autres sites ..... p.17

d/ Aggressivité locale et grading histologique ..... p.18

e/ Marquage immunohistochimique ..... p.19

**3/ Caractères épidémiologiques des tumeurs du complexe fibrosarcome félin** ..... p.20

a/ Prévalence globale ..... p.20

b/ Incidence annuelle ..... p.20

c/ Facteurs de variation ..... p.21

**II/ Historique et arguments en faveur de l'implication de l'injection vaccinale** ..... p.25

**1/ Arguments épidémiologiques en faveur de l'implication de l'injection vaccinale** ..... p.25

<u>a/ Augmentation de l'incidence des fibrosarcomes et des fibrosarcomes aux sites d'injection conjointement à la mise en place de la vaccination antirabique obligatoire</u> .....	p.25
<u>b/ Diminution de l'âge des animaux touchés</u> .....	p.26
<b>2/ Arguments histologiques en faveur de l'implication de l'injection vaccinale</b> .....	p.27
<u>a/ Comparaison des caractéristiques histologiques des réactions sous-cutanées post-vaccinales, des fibrosarcomes aux sites d'injection et de ceux aux autres sites</u> .....	p.27
<u>b/ Découverte d'aluminium dans les foyers inflammatoires péri-tumoraux</u> .....	p.27
<b>3/ Arguments cliniques en faveur de l'implication de l'injection vaccinale</b> .....	p.29
<u>a/ Augmentation du nombre de réactions locales suite aux injections vaccinales</u> .....	p.29
<u>b/ Prévalence des fibrosarcomes aux sites d'injection dans les pays n'utilisant pas ou peu les vaccinations contre la leucose et / ou la rage</u> ....	p.30
<u>c/ Variation de l'intervalle injection vaccinale - apparition de la tumeur pour les fibrosarcomes aux sites d'injection et ceux aux autres sites</u> .....	p.30
<b><u>III/ Différentes hypothèses concernant un lien physiopathogénique entre injection vaccinale et fibrosarcomes aux sites d'injection</u></b> .....	p.31
<b>1/ Rôle de l'inflammation dans l'émergence de tumeurs mésoenchymateuses</b> .....	p.31
<u>a/ Exemple des modèles animaux</u> .....	p.31
<u>b/ Exemple des sarcomes oculaires post-traumatiques</u> .....	p.32
<u>c/ Fibrosarcomes associés à des injections de substances autres que les vaccins</u> .....	p.32
<u>d/ Cas des fibrosarcomes aux sites d'injection vaccinales</u> .....	p.32
<b>2/ L'hypothèse virale</b> .....	p.34
<b>3/ Les prédispositions individuelles</b> .....	p.34
<b>4/ Mécanismes génétique et moléculaire suspectés dans l'apparition des fibrosarcomes aux sites d'injection</b> .....	p.35
<u>a/ Mécanismes génétiques</u> .....	p.35
<u>b/ Mécanismes impliquant les facteurs de croissance</u> .....	p.37
<b><u>IV/ Les adjuvants : présentation, effets secondaires et rôle dans l'oncogénèse des tumeurs du complexe fibrosarcome félin</u></b> .....	p.41
<b>1 / Présentation des différents types de vaccins</b> .....	p.41
<u>a/ Vaccins atténués et vaccins inactivés</u> .....	p.41
<u>b/ Les nouveaux types de vaccins, dits de deuxième génération</u> .....	p.42

<b>2/ Présentation d'un exemple de vaccin recombinant : le vaccin utilisé dans notre étude : l'Eurifel<sup>ND</sup> FeLV</b> .....	p.42
<u>a/ Le vecteur canarypoxvirus</u> .....	p.43
<u>b/ Le canarypox-FeLV</u> .....	p.43
<u>c/ Le mode de fonctionnement du canarypox-FeLV</u> .....	p.44
<b>3/ Présentation des adjuvants</b> .....	p.45
<u>a/ Mécanisme d'action</u> .....	p.45
<u>b/ Classification des adjuvants</u> .....	p.47
<b>4/ Effets secondaires et relations avec les fibrosarcomes aux sites d'injection</b> .....	p.49
<u>a/ Effets secondaires des vaccins vivants atténués</u> .....	p.49
<u>b/ Comparaison entre vaccins inactivés adjuvés</u> .....	p.49
<b><u>Conclusion</u></b> .....	p.51

**Deuxième partie : étude expérimentale.  
Etude de la dynamique de la réaction inflammatoire induite chez le chat par l'administration sous-cutanée de vaccins adjuvé et non adjuvé.**

<b><u>Introduction</u></b> .....	p.55
<b><u>I/ Matériels et méthodes</u></b> .....	p.57
1/ Les animaux utilisés .....	p.57
2/ Les vaccins injectés .....	p.57
3/ Les sites d'injection .....	p.57
4/ Les techniques de biopsie .....	p.59
<b><u>II/ Résultats</u></b> .....	p.63
1/ Vaccin 1 .....	p.63
<u>a/ Lésions à J2 et J7</u> .....	p.63
<u>b/ Lésions à J21</u> .....	p.64

<b>2/ Vaccin 2</b> .....	p.65
a/ <u>Lésions à J2 et J7</u> .....	p.65
b/ <u>Lésions à J21</u> .....	p.66
<b><u>III/Discussion</u></b> .....	p.69
<b>1/ Objectifs de l'étude</b> .....	p.69
<b>2/ Précision des données</b> .....	p.69
a/ <u>Suivi chronologique des changements locaux</u> .....	p.69
b/ <u>Limite technique</u> .....	p.69
<b>3/ Intérêts des résultats de l'étude</b> .....	p.69
a/ <u>Présence de lésions identiques entre les deux vaccins</u> .....	p.69
b/ <u>Interprétation des différences identifiées</u> .....	p.69
<b>4/ Perspectives vaccinales découlant des résultats de cette étude</b> .....	p.70
<b>Conclusion</b> .....	p.73
<b><u>Bibliographie</u></b> .....	p.75
<b><u>Annexes</u></b> .....	p.83

### **Abréviations employées :**

- $\alpha$ -SMA cytoplasmique : actine musculaire  $\alpha$ -smooth cytoplasmique
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ARN : acide ribonucléique
- CFF : complexe fibrosarcome félin
- EGF : epidermal growth factor
- FeFV : spumavirus félin
- FeLV : virus leucogène félin
- FGF : fibroblast growth factor
- FeSV : virus sarcomateux félin
- FHM : fibrohistiocytome malin
- FIV : virus de l'immunodéficience féline
- FS : fibrosarcome
- FSNSI : fibrosarcome présent à un autre site qu'aux sites habituels d'injection
- FSSI : fibrosarcome présent aux sites habituels d'injection
- gp : glycoprotéine
- IM : intra-musculaire
- Jx : x jours après l'injection
- LTc : lymphocytes T cytotoxiques
- LTR : séquence long term repeat
- OR : odds ratio
- PDGF : platelet-derived growth factor
- PCR : polymerase chain reaction
- SC : sous-cutané
- SMC : sarcomes multicentriques
- TGF- $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$
- V-src : virus du sarcome de Rous du poulet

## **Tableaux :**

<u>Tableau 1</u> : Evolution des pourcentages des FS diagnostiqués à des sites d'injection et à d'autres sites.....	p.25
<u>Tableau 2</u> : Rapport FS / nombre total de biopsies et ratio FSSI et FSNSI entre 1989 et 1994 .....	p.26

## **Figures :**

<u>Figure 1</u> : FSSI ulcéré du dos et des lombes.....	p.11
<u>Figure 2</u> : FS de l'extrémité distale d'un membre .....	p.12
<u>Figure 3</u> : Aspect microscopique d'une section d'un FS à un site de vaccination.....	p.14
<u>Figure 4</u> : Aspect microscopique d'un FS <i>sst</i> .....	p.15
<u>Figure 5</u> : Aspect microscopique d'un FHM classique .....	p.15
<u>Figure 6</u> : Aspect microscopique de la variété à cellules géantes d'un FHM.....	p.16
<u>Figure 7</u> : Aspect microscopique à faible grossissement d'une fibromatose.....	p.17
<u>Figure 8</u> : Fibrosarcome à un site d'injection.....	p.19
<u>Figure 9</u> : Aspect en microscopie électronique d'un macrophage situé en périphérie d'un FS situé à un site d'injection.....	p.28
<u>Figure 10</u> : Représentation des spectres aux rayons X du dépôt granuleux trouvé dans le cytoplasme des macrophages et du cytoplasme adjacent.....	p.29
<u>Figure 11</u> : Canarypoxvirus .....	p.43
<u>Figure 12</u> : Schéma du cycle du canarypoxvirus dans des cellules permissive et non permissive.....	p.45
<u>Figure 13</u> : Représentation schématique des 3 sites d'injection .....	p.58
<u>Figure 14</u> : Animal anesthésié, rasé et préparé pour les injections.....	p.59
<u>Figure 15</u> : Réalisation de la biopsie.....	p.60
<u>Figure 16</u> : Visualisation de la biopsie .....	p.61
<u>Figure 17</u> : Cytostéatonecrose.....	p.67
<u>Figure 18</u> : Lymphangite et dilacération tissulaire .....	p.67
<u>Figure 19</u> : Infiltration de la zone lésée par des lipophages.....	p.67
<u>Figure 20</u> : Mobilisation de grandes cellules basophiles indifférenciées à partir des espaces péricapillaires interadipocytaires.....	p.67
<u>Figure 21</u> : Lyse du tissu adipeux sans cytostéatonecrose et fragmentation des fibres de collagène.....	p.67
<u>Figure 22</u> : Dépôts fibrillaires basophiles .....	p.67
<u>Figure 23</u> : Infiltration lymphoïde témoignant de la réaction aux composants immunogènes du vaccin .....	p.67
<u>Figure 24</u> : Macrophages ponctués basophiles .....	p.68
<u>Figure 25</u> : Composition de la coque réactionnelle .....	p.68
<u>Figure 26</u> : Coque réactionnelle histocytofibroblastique .....	p.68
<u>Figure 27</u> : Absence de granulomes lipophagiques. Coque réactionnelle qualitativement décrite pour le vaccin adjuvé mais généralement de taille plus réduite dans le cas du vaccin non adjuvé .....	p.68
<u>Figure 28</u> : Coque parfois strictement lymphoïde sans réaction macrophagique et histiofibroblastique nettes.....	p.68

# Introduction

Les tumeurs du complexe fibrosarcome félin (CFF) sont des tumeurs touchant les fibroblastes du tissu sous-cutané du chat. Elles font partie des « sarcomes des tissus mous » (16). Elles regroupent les sarcomes multicentriques (SMC) et les sarcomes solitaires. Les SMC sont liés au FeSV, virus oncogène nécessitant le FeLV pour se répliquer. Ils sont multiples et les nodules se développent à distance les uns des autres (20). En revanche, les sarcomes solitaires sont classiquement constitués d'un seul ou de plusieurs nodules adjacents. Parmi eux, on distingue les fibrosarcomes présents aux sites habituels d'injection (FSSI) et les fibrosarcomes aux autres sites (FSNSI) (20). La multiplication des premiers, au début des années 1990, a conduit à envisager l'implication éventuelle des injections vaccinales dans la genèse des FSSI (37).

Ce travail, qui se compose de deux grandes parties, est centré sur cette éventuelle implication.

La première partie dresse un bilan des différentes publications qui, depuis l'émergence de cette hypothèse, se sont intéressées au sujet. Après une présentation des tumeurs du CFF et de leurs caractéristiques, les arguments et les mécanismes susceptibles de relier les FSSI aux injections vaccinales sont présentés. La dernière partie s'intéresse aux adjuvants vaccinaux et à leur participation éventuelle dans l'oncogenèse des tumeurs du CFF.

La deuxième partie, expérimentale, est centrée sur la dynamique de la réaction inflammatoire locale consécutive à des injections vaccinales de nature différente. Les rôles de l'adjuvant et des cellules recrutées dans les réactions post-injections sont étudiés.



**Etude bibliographique :  
les tumeurs du complexe  
fibrosarcome félin et leur  
rapport potentiel à l'injection  
vaccinale**



## I/ Présentation des tumeurs du complexe fibrosarcome félin

La présentation s'organise en trois chapitres : clinique, histologique puis épidémiologique.

### **1/Présentation clinique des tumeurs du complexe fibrosarcome félin**

#### a / Sites préférentiels des tumeurs du complexe fibrosarcome félin : distinction de deux groupes : ceux aux sites habituels d'injection et ceux aux autres sites

Les sites les plus affectés par les FSSI sont les extrémités proximales des membres, la portion dorsale du cou et les régions interscapulaire et lombaire dorsale (37) (voir figure 1). Ces sites correspondent à ceux couramment utilisés pour les injections vaccinales et thérapeutiques (37). Même si ces sites diffèrent légèrement suivant les auteurs, ce critère permet, dans toutes les études, de différencier les FSSI des FSNSI. A partir des différentes études épidémiologiques, ILGART et MAGNOL (42) ont réalisé un bilan des sites les plus affectés : la zone interscapulaire et la portion dorsale du cou (40 % à 49,5 % des cas), les flancs et le thorax (25 à 29 %) et le dos et les lombes (13 à 14 % des cas).

**Figure 1 : FSSI ulcéré du dos et des lombes.**  
D'après (15)



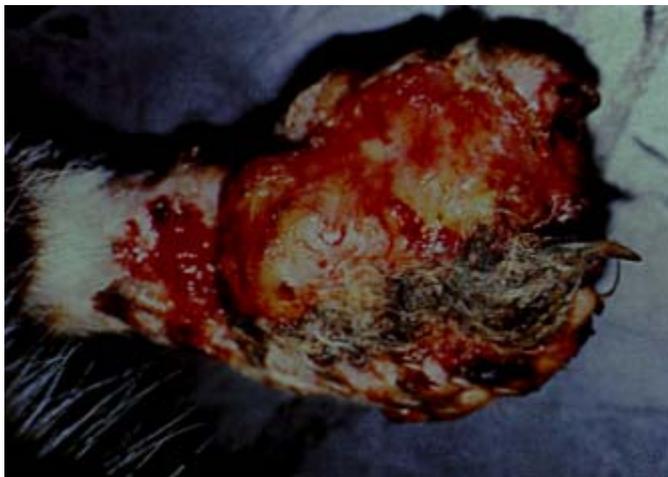
#### b/ Comportement local et à distance des tumeurs du complexe fibrosarcome félin

Les FSSI sont plus larges que les FSNSI (33, 41, 88). Une étude de HENDRICK *et al.* (41), portant sur 239 fibrosarcomes (FS), montre que 48 % des FSSI avaient

un diamètre supérieur à 4 cm, alors que seulement 25 % des FSNSI étaient supérieurs à cette limite.

Généralement, les FS sont des tumeurs agressives aux marges peu définies, qui envahissent la membrane basale et les zones entre les plans des fascias (voir figure 2). Parfois, une pseudo-capsule, composée de cellules tumorales compactées, les entoure (1, 38).

**Figure 2 : FS de l'extrémité distale d'un membre.**  
L'aspect très envahissant de ces tumeurs est bien visible ici.  
D'après (15)



La croissance des FS est souvent rapide et semble s'accélérer au fur et à mesure des exérèses successives (19).

Les métastases sont très rares. Quand elles existent, elles sont tardives et de localisation pulmonaire, ganglionnaire, hépatique, cutanée et/ou splénique (7, 19, 77).

#### c/ Age d'apparition des fibrosarcomes aux sites d'injection

Concernant l'âge, une différence nette existe entre les FSSI et les FSNSI. Pour les premiers, on observe une distribution bimodale avec un premier pic vers 6-7 ans et un deuxième vers 10-11 ans (19). Quant aux seconds, un seul pic est noté, avec une moyenne, selon les publications, se situant aux alentours de 11 ans (17, 20).

#### d/ Taux de récurrence des fibrosarcomes aux sites d'injection

L'agressivité locale des FSSI conditionne le taux de récurrence. Ce critère est le facteur pronostic le plus significatif (19, 25, 33, 72). Dans une étude (33) réalisée sur 69 FSSI, un taux de récurrence à 6 mois de 62 % a été mis en évidence. D'autres

données annoncent, pour les FSSI, un taux de récurrence de 86 % à 6 mois, associé à 22 % de récurrences multiples (de 2 à 4 fois) contre 14 % de récurrence à 8 mois pour les FSNSI (88).

## **2/ Présentation histologique des tumeurs du complexe fibrosarcome félin**

### a/ Différents types histologiques

Les différents types histologiques rassemblés sous le terme de FSSI sont nombreux. Les fibrosarcomes *sensu stricto* (FS *sst*) sont le type histologique le plus fréquemment rencontré, mais on peut aussi rencontrer des fibrohistiocytes malins, des sarcomes indifférenciés, des rhabdomyosarcomes, des ostéosarcomes extrasquelettiques, des chondrosarcomes et des fibromatoses (19, 25, 78). Un cas de liposarcome a même été décrit (26).

Une étude portant sur 46 cas donne les proportions suivantes : 23 FS *sst* (50%), 13 fibrohistiocytes malins (28%), 7 ostéosarcomes (16%), 2 rhabdomyosarcomes (4%) et 1 chondrosarcome (2%) (38).

Il est également possible de rencontrer des tumeurs polymorphes. Par exemple, MACY et BERGMAN (60) décrivent un cas où, dans une même tumeur, ont été identifiés des foyers de fibrosarcome, de chondrosarcome et de rhabdomyosarcome.

### b/ Description histologique

Même si les tumeurs du complexe fibrosarcome félin se ressemblent macroscopiquement, leur seule caractéristique histologique commune est la présence de cellules fusiformes néoplasiques (19).

De façon générale, les cellules rencontrées dans les fibrosarcomes *sensu stricto* sont des cellules fusiformes arrangées en longs faisceaux et des cellules géantes à noyaux multiples. Elles sont associées à un nombre variable de cellules à forme géométrique différente, dont l'atypie est moyenne à marquée (5, 38). Par contre, les fibrohistiocytes malins ont pour particularité de posséder aussi des cellules histiocytoïdes et un arrangement désordonné de cellules atypiques (5, 38). La plupart des tumeurs peuvent se classer dans l'un ou l'autre de ces schémas. Cependant la découverte de foyers néoplasiques osseux, cartilagineux ou musculaires conduit à classer ces tumeurs en ostéosarcomes, chondrosarcomes ou rhabdomyosarcomes (5, 38).

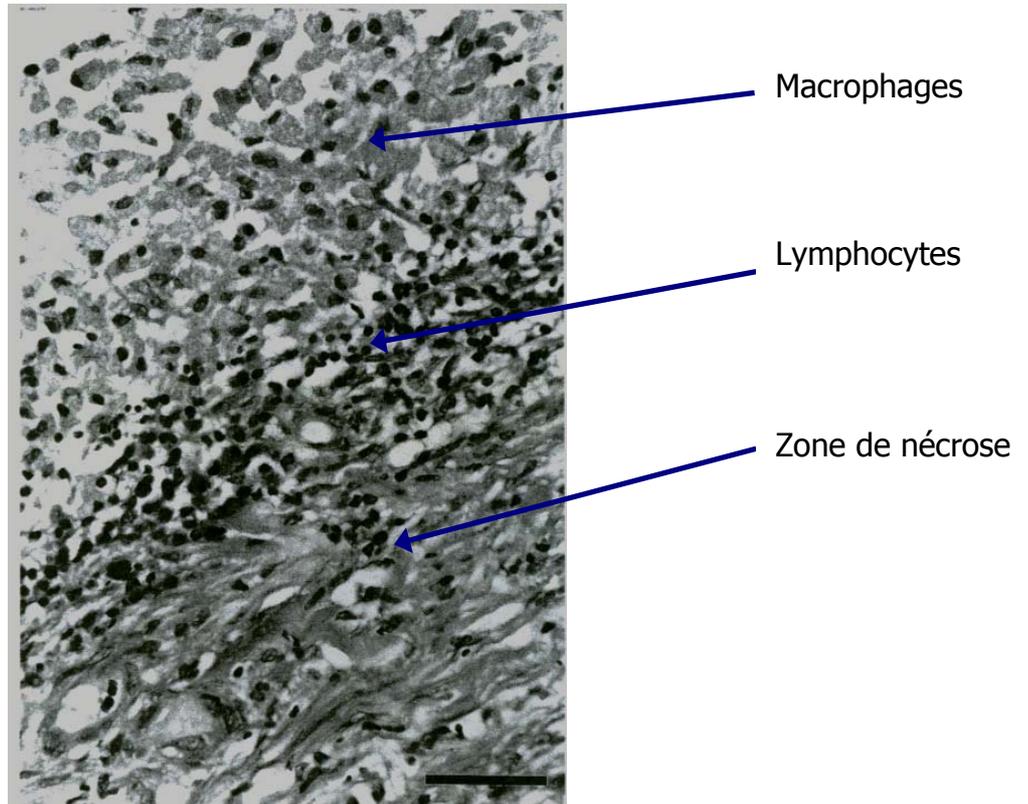
Beaucoup de FSSI sont entourés et/ou partiellement infiltrés par des lymphocytes et des macrophages (voir figure 3). Cet infiltrat inflammatoire a été comparé à celui identifié lors d'injections vaccinales sous-cutanées de vaccins inactivés, tels que ceux contre la leucose et la rage (38).

**Figure 3 : Aspect microscopique d'une section d'un FS à un site de vaccination.**

Des macrophages avec un matériel étranger fin et granuleux sont dans la partie haute de l'image. Une population de lymphocytes est présente sous les macrophages. Une portion nécrotique est visualisée sur la partie basse de l'image.

Barre : 50 µm

D'après (39)



De façon plus précise, on distingue :

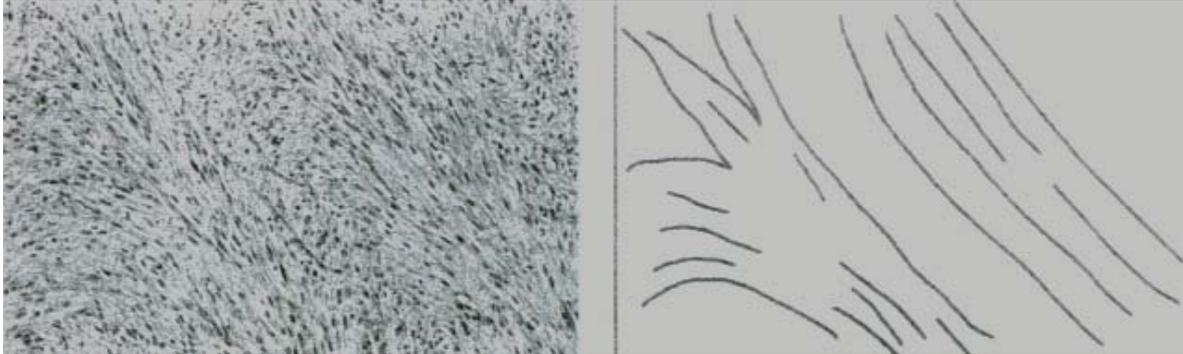
*b-1/ Les fibrosarcomes sensu stricto*

Les fibrosarcomes sensu stricto représentent environ la moitié des tumeurs du CFF. Il s'agit de tumeurs à forte densité cellulaire, composées de cellules fusiformes au noyau allongé agencées en faisceaux au sein d'un stroma collagène discret (voir figure 4). Le pléomorphisme cellulaire est marqué et les atypies cellulaires fréquentes. Les mitoses sont nombreuses. La présence de foyers hémorragiques ou nécrotiques n'est pas rare. (19)

**Figure 4 : Aspect microscopique d'un FS *ssf* (x 400).**

On repère aisément la forte densité de cellules fusiformes et l'agencement en faisceaux des cellules tumorales, représentés schématiquement à droite de la figure.

D'après (19)



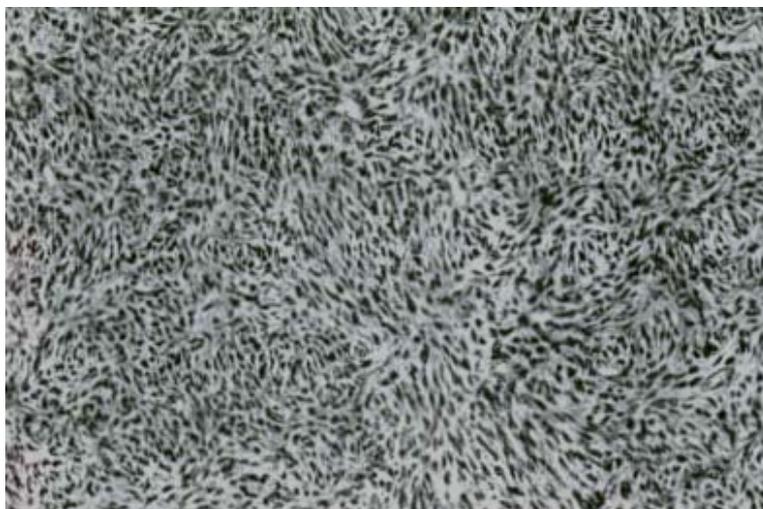
*b-2/ Les fibrohistiocytes malins (FHM)*

Les fibrohistiocytes malins représentent la deuxième catégorie majoritaire des tumeurs du CFF. Les FHM sont des tumeurs très polymorphes, non seulement entre elles, mais également au sein d'une même tumeur. Les FHM sont caractérisés par un agencement désordonné des faisceaux de cellules tumorales. Des cellules d'aspect histiocytaire sont parfois présentes. Des cellules tumorales de phénotype myofibroblastique peuvent également être observées. Le stroma collagène est relativement abondant (voir figure 5) (19).

**Figure 5 : Aspect microscopique (x200) d'un FHM classique.**

Cette figure illustre le pléomorphisme cellulaire composé de faisceaux enchevêtrés et tourbillonnants associés à des amas de cellules à morphologie histiocytaire.

D'après (19)



On observe parfois, au sein des FHM, des foyers de métaplasie osseuse ou cartilagineuse. Lorsque la tumeur infiltre les muscles peauciers, on peut observer des cellules musculaires dissociées.

Des subdivisions peuvent également être faites au sein de ces FHM, en fonction de la présence de cellules géantes plurinucléées (FHM à cellules géantes) ou de la présence d'un stroma myxoïde important (voir figure 6) (19).

**Figure 6 : Aspect microscopique (x200) de la variété à cellules géantes d'un FHM.**

Au sein d'une tumeur d'aspect similaire à un FHM classique, on constate la présence de volumineuses cellules plurinucléées caractéristiques de cette variété de FHM schématisées sur la figure de droite.

D'après (19)



Les formes nodulaires de FHM à croissance expansive ont parfois été appelées fasciites nodulaires (19).

Toutes ces distinctions au sein de la famille des fibrohistiocytomes malins reflètent le polymorphisme très important de cette famille, mais ces subdivisions n'ont pour l'instant aucune répercussion clinique, ni thérapeutique (19).

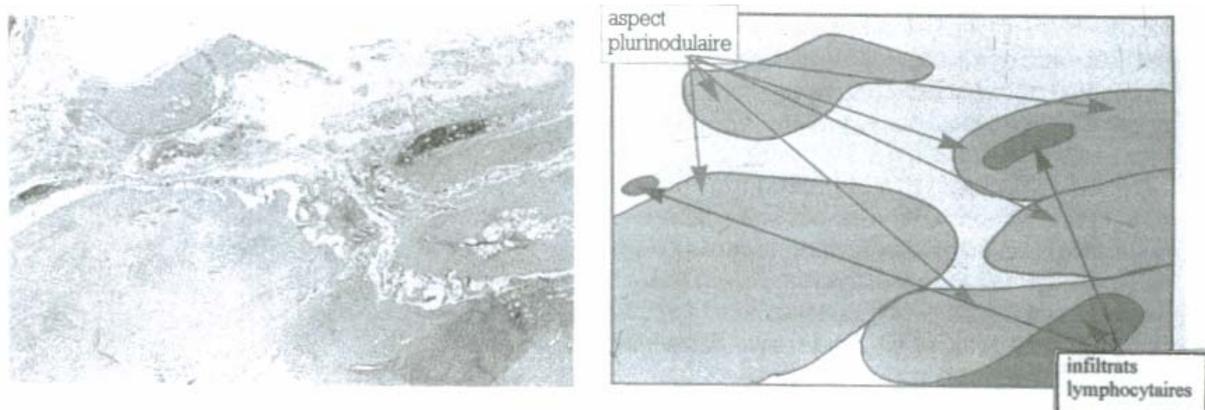
*b-3/ Les fibromatoses*

Les fibromatoses sont caractérisées par une prolifération fibroblastique bien différenciée associée à un stroma collagène dense. Contrairement aux FS *ss†*, les cellules fusiformes présentent peu d'atypies cytonucléaires. Les mitoses sont rares. Ce tissu tumoral peut évoquer une fibrose cicatricielle (voir figure 7). On distingue parfois les fibromatoses infiltrantes de celles nodulaires à croissance expansive (19).

**Figure 7 : Aspect microscopique à faible grossissement (x20) d'une fibromatose.**

On repère l'aspect plurinodulaire d'une tumeur composée de nodules cellulaires et fortement collagénisés. On note également la présence de plusieurs infiltrats lymphocytaires. L'ensemble est schématisé sur la droite de la figure.

D'après (19)



L'examen anatomopathologique minutieux du tissu conjonctif et des fascias situés à proximité de la fibromatose met souvent en évidence de nombreux foyers tumoraux infra-cliniques. Ils peuvent parfois être assez loin de la tumeur macroscopiquement visible. Cette constatation explique les récurrences post-chirurgicales très fréquemment observées avec ce type tumoral, malgré l'aspect histologique peu agressif des fibromatoses (19).

*b-4/ Les autres types tumoraux*

Comme évoqué au paragraphe 2/a/, de nombreuses autres tumeurs mésenchymateuses peuvent être observées au sein du tissu sous-cutané du chat : sarcomes indifférenciés, ostéosarcomes, chondrosarcomes, hémangiosarcomes, rhabdomyosarcomes, neurofibrosarcomes, etc... Ces tumeurs présentent généralement un comportement biologique beaucoup plus proche de celui des tumeurs du CFF que de leurs homonymes en position eutopique (19, 82).

c/ Critères histologiques permettant de différencier un fibrosarcome présent aux sites habituels d'injection d'un fibrosarcome présent aux autres sites

Ces critères reposent sur une étude réalisée entre 1988 et 1994, par DODDY *et al.* (17), sur 170 FS dont plus de 60 % sont qualifiés de FSSI du fait de leur localisation (ce sont les sites habituels qui ont été choisis).

Le but de cette étude a été de donner des arguments histologiques permettant de distinguer FSSI et FSNSI.

Les critères les plus solides sont : la localisation préférentielle des FSSI dans le tissu conjonctif sous-cutané, alors que les FSNSI sont plutôt localisés au derme ; la présence d'une infiltration des FSSI par des cellules inflammatoires ; une plus grande variabilité dans la densité de la matrice extracellulaire, même si cela est rare, seuls les FSSI peuvent avoir dans leur matrice des infiltrations ostéoïdes, chondroïdes ou myxomateuses (17).

Des arguments plus indirects sont les critères d'agressivité locale des FSSI : présence de nécrose, activité mitotique augmentée et pléomorphisme cellulaire plus marqué. Ces caractéristiques sont beaucoup moins présentes dans les FSNSI (17). La nécrose serait à rapprocher de l'index mitotique élevé et de la densité vasculaire insuffisante, entraînant, dans ce cas de figure, la mort des cellules du centre de la tumeur (13).

#### d/ Agressivité locale et grading histologique

Le grading, associé aux FS et détaillé ci-dessous, a été proposé par COUTO *et al.* (13). Il est calqué sur celui utilisé en médecine humaine. Pour les sarcomes humains, c'est l'indicateur le plus fiable en terme de pronostic (métastases à distance et taux de survie). A l'heure actuelle, en médecine vétérinaire, l'intérêt pronostique de ce grading n'a pas encore été démontré. Il sert donc, pour l'instant, uniquement de classement (13).

Ce score repose sur différents paramètres (13) :

- la différenciation générale :

- 1 => les cellules tumorales sont très proches d'un type différencié donné ;
- 2 => la tumeur a juste un phénotype histologique ;
- 3 => la tumeur est peu différenciée.

- l'index mitotique :

- 1 => 1 à 9 figures de mitose par 10 champs au grossissement 400 ;
- 2 => 10 à 19 figures de mitose par 10 champs au grossissement 400 ;
- 3 => plus de 20 figures de mitose par 10 champs au grossissement 400.

- la présence de nécrose :

- 1 => pas de nécrose ;
- 2 => la nécrose représente moins de 50% de l'ensemble de la tumeur ;
- 3 => la nécrose représente plus de 50% de l'ensemble de la tumeur (voir figure 8).

Le grade est obtenu en additionnant chacun des paramètres :

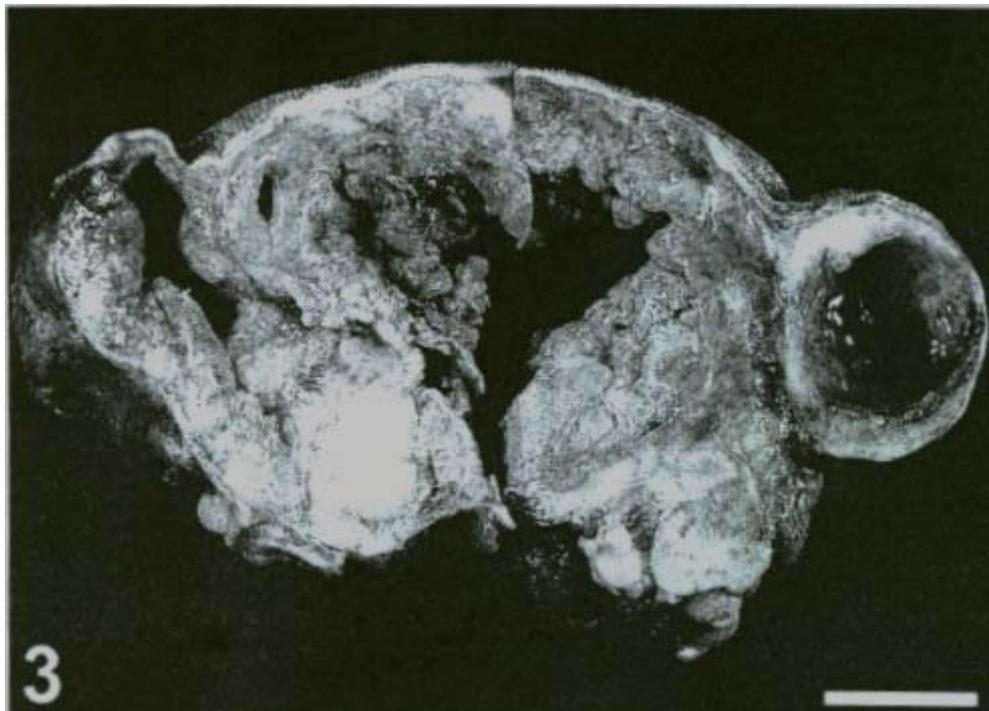
- grade I si la somme est de 3 ou 4 ;
- grade II si la somme est de 5 ou 6 ;
- grade III si la somme est de 7, 8 ou 9.

**Figure 8 : Fibrosarcome à un site d'injection, avec une large zone de nécrose en son centre.**

D'autres cavités mieux délimitées et de taille variable sont visibles sur cette coupe. C'est l'aspect caractéristique d'un FSSI agressif.

Barre : 2 cm.

D'après (13)



Ce grading a été appliqué à 60 FSSI (46 premiers et 14 récidives). Pour les premiers, la répartition est la suivante : 25 % de grade I, 48 % de grade II et 27 % de grade III. Pour les récidives, la répartition est à peu près identique : 25 % grade I, 50 % grade II et 25 % grade III (13).

Dans cette étude, plusieurs paramètres histologiques (présence, taille et nature de la réaction inflammatoire, vascularisation de la tumeur, présence ou absence de cellules plurinucléées géantes, etc...) ont été comparés au grading des FSSI. Seule une corrélation positive entre l'agressivité de la tumeur et la présence de cellules géantes plurinucléées a été mise en évidence. Les cellules géantes plurinucléées sont souvent associées à un grade élevé : 75 % dans les grades III, 62 % dans les grades II mais 0 % dans les grades I. Il est aussi intéressant de noter qu'il n'y a pas d'association entre le grade de la première tumeur et la récidive (13).

e/ Marquage immunohistochimique

Les études sur les caractéristiques immunohistochimiques des FSSI sont peu nombreuses.

Une étude, réalisée par HENDRICK et BROOKS (38), sur 5 FSSI, donne les résultats suivants : 4 des 5 tumeurs sont positives à la vimentine (qui est un filament intermédiaire des cellules mésenchymateuses), 1 sur 5 et 2 sur 5 sont respectivement positives, à la desmine et à l'actine musculaire.

Ce marquage invite à envisager que les FSSI aient pour origine les myofibroblastes. Ils sont considérés par certains comme une étape de transition par laquelle passent les fibroblastes et des cellules mésenchymateuses primitives lors des phénomènes de cicatrisation (33, 63). Les myofibroblastes expriment l'actine musculaire approximativement 6 jours après un traumatisme, mais cette expression est perdue 30 jours plus tard. Ainsi, les variations dans l'expression de l'actine musculaire dans les FSSI pourraient dépendre du moment auquel les myofibroblastes sont transformés pendant la réponse locale à l'injection (38).

### **3/ Caractères épidémiologiques des tumeurs du complexe fibrosarcome félin**

Dans les sous-parties a/ et b/ de ce chapitre, le terme de fibrosarcome (FS) regroupe des données concernant l'ensemble des différentes classes de FS (multicentrique, unique à un site courant de vaccination et unique à un autre site). Cependant, les FSSI étant actuellement largement majoritaires, ces chiffres permettent d'avoir une idée globale de leur fréquence et de leur incidence annuelle.

#### a/ Prévalence globale

Selon des études, essentiellement américaines, les FS représenteraient entre 2 à 12 % des tumeurs du chat avec une moyenne de 4,5 % (9, 25, 32, 44).

Une étude américaine de THEILEN et MADEWELL (85), réalisée en 1992, place les fibrosarcomes (4,2 % de la totalité des tumeurs du chat) derrière les lymphosarcomes (38,3 %), les leucémies (20,1 %), les épithéliomas spinocellulaires (9,8 %) et les adénocarcinomes mammaires (9,3 %). En France, une étude réalisée, la même année, sur les tumeurs analysées dans le laboratoire Mialot-Lagadic, indique que les FS sont les plus fréquents (39 %), devant les adénocarcinomes mammaires (33 %). La différence entre les deux études peut s'expliquer par des différences de taille d'échantillon et de population (20).

Cependant ces études ne sont pas récentes et il semble que les FSSI deviennent de plus en plus fréquents et qu'ils tiennent une place non négligeable parmi les tumeurs du chat (selon les centres de cancérologie des écoles de Lyon et de Maisons-Alfort) (19). Désormais, il semble que les tumeurs du CFF constituent le premier type tumoral en représentant entre 12 et 41 % des tumeurs cutanées chez le chat (16).

#### b/ Incidence annuelle

Les FS représentent en moyenne 4,5 % de l'ensemble des tumeurs du chat et leur incidence annuelle moyenne est de 10 à 20 pour 100 000 chats (avec des écarts, suivant les études, allant de 6,3 à 36 cas pour 100 000 chats) (6, 9, 11, 14, 25, 30, 31, 32, 39, 44, 71, 79, 80).

### c/ Facteurs de variation

Pour évaluer les facteurs de variation, c'est une étude de KASS *et al.* (44), réalisée en 1993 et servant, par ces données épidémiologiques, de base à nombre de publications, qui sera principalement utilisée. Cette étude porte sur 345 FS diagnostiqués entre janvier 1991 et mai 1992. Les FS situés aux sites d'injection habituellement utilisés ont été comparés à ceux présents aux autres sites. Dans l'hypothèse d'une implication de l'injection vaccinale, des critères relatifs aux souches vaccinales ont été étudiés.

#### *c-1/ Race*

Aucune prédisposition raciale n'a été identifiée (44).

#### *c-2/ Sexe*

Le rapport mâle/femelle entre chacun des groupes étant identique, aucune prédisposition sexuelle n'est rapportée. De plus, on peut aussi noter que la stérilisation n'influe pas sur la fréquence des FSSI (9, 44).

#### *c-3/ Age*

Pour les FSSI, une distribution bimodale est mise en évidence avec un premier pic autour de 6-7 ans puis un autre autour de 10-11 ans. Pour les FSNSI, un seul pic est noté et il est présent plus tard, vers l'âge de 11 ans (41, 44).

Les FSSI touchent des individus dont l'âge moyen est de 8,1 +/- 2,9 ans (contre 10,5 +/- 4,1 ans pour les FSNSI) (41).

#### *c-4 / Souches vaccinales*

L'étude de KASS *et al.* (44) étudie l'influence de la présence ou de l'absence de chacune des souches vaccinales sur l'apparition de FSSI. Seule la présence ou l'absence de la valence de la leucose influe de façon significative sur la prévalence des FSSI (10 points de moins sur l'incidence si la souche contre le FeLV est absente). Ainsi, la vaccination la plus associée au FSSI est celle contre le FeLV avec un odds ratio (OR) allant de 2,78 à 5,49. Les variations s'expliquent par le nombre de souches impliquées dans les injections vaccinales (de 1 à 3 souches). La vaccination contre la rage est aussi impliquée avec un OR allant de 1,20 à 1,99 (on retrouve aussi cette augmentation liée au nombre de souches). Ainsi, suite à cette étude, on peut dire qu'un FSSI se développe pour 10 000 vaccinations associant la rage et le FeLV (40). Pour les autres souches, les OR ne sont pas spécifiques (44).

Dans une étude menée sur 25 cas de FS situés aux sites habituels de vaccination, entre 1982 et 1993, les souches impliquées sont le typhus et le coryza, les vaccins utilisés étant des vaccins inactivés adjuvés (55).

On retrouve des résultats identiques pour la leucose dans une étude de 239 cas réalisée entre 1991 et 1992. Par contre, cette étude ne montre pas d'implication de la rage (41).

En plus de ces études, une quatrième, réalisée entre février 1990 et octobre 1992 sur des FS apparus sur des chats Hawaïens non vaccinés contre la rage (du fait de l'absence de cas sur cette île et de la quarantaine mise en place) a permis de souligner le fait que tous les chats ayant des FS aux sites habituels de vaccination avaient été vaccinés contre le FeLV dans les 2 ans précédant l'apparition des tumeurs (88).

Ainsi, ces études démontrent que toutes les souches semblent pouvoir être impliquées (ou au moins associées au FS). Dans ces 4 études, tous les vaccins mis en cause sont inactivés adjuvés. Ainsi, il semble que les vaccins adjuvés puissent constituer un facteur de risque important. Cependant les résultats sont différents entre chaque étude, par exemple, la vaccination contre la rage n'est pas impliquée dans l'étude de HENDRICK *et al.* (41). Cela sous-entend que de nombreux paramètres entrent en jeu. L'adjuvant ne peut être donc probablement pas être le seul mis en cause (12).

#### *c-5/ Nombre de souches injectées*

KASS *et al.* (44) ont démontré l'importance du nombre de souches injectées au même site. Ainsi, si on associe le nombre de souches injectées au même endroit à la probabilité d'apparition d'un FSSI, on obtient :

- pour 1 seule souche, un OR de 1,49 ;
- pour 2 souches, un OR de 2,27 ;
- pour plus de 3 souches, un OR de 2,75 (44).

A l'opposé HENDRICK *et al.* (41) n'ont, eux, pas trouvé d'association entre FSSI / FSNSI et le nombre de souches injectées simultanément au même endroit.

La question d'un lien entre vaccination multiple et FS reste donc controversée ; cette difficulté à identifier de manière claire un mécanisme causal est permanente à la lecture des travaux épidémiologiques concernant les FSSI. Elle plaide pour l'implication de nombreux et divers mécanismes dans l'apparition de ces tumeurs.

**CONCLUSION :**

Les FSSI sont des tumeurs du tissu sous-cutané, situées aux sites couramment utilisés pour les injections vaccinales (la partie proximale des membres, la portion dorsale du cou, les région interscapulaire et lombaire dorsale). Elles apparaissent plutôt sur des jeunes adultes et sont agressives localement avec un taux de récurrence important. Leur aspect macroscopique est assez univoque mais leur nature histologique est variée. Les injections vaccinales semblent constituer un facteur de risque important, en particulier celles de vaccins inactivés adjuvés.

Après avoir présenté les FSSI, nous allons, dans la deuxième partie, nous intéresser plus avant à l'hypothèse reliant ces tumeurs aux injections vaccinales et aux arguments avancés pour la soutenir.



## II/ Historique et arguments en faveur de l'implication de l'injection vaccinale

Les premières publications soulevant le problème d'une implication de l'injection vaccinale datent de 1991 (36). Dans cette partie, nous allons détailler les arguments épidémiologiques, histologiques et cliniques en faveur de l'implication de l'injection vaccinale, développés dans la bibliographie.

### **1/ Arguments épidémiologiques en faveur de l'implication de l'injection vaccinale**

#### a/ Augmentation de l'incidence des fibrosarcomes et des fibrosarcomes aux sites d'injection conjointement à la mise en place de la vaccination antirabique obligatoire

La première publication reliant une inflammation locale à une injection vaccinale date de 1991 (36). L'année suivante, une augmentation anormale du nombre de cas de fibrosarcomes est reportée : de 3,6 % à 5,8 % du nombre total des biopsies analysées au laboratoire d'anatomopathologie de l'école vétérinaire de Pennsylvanie (39). La modification de la localisation est inquiétante, puisque c'est essentiellement aux sites habituels de vaccination que le changement de fréquence est le plus important (c'est-à-dire les parties dorsales du cou, des épaules et des lombes, les flancs, la partie dorsolatérale du thorax et les membres postérieurs) (39). Ainsi les fibrosarcomes apparaissent rapidement au lieu d'une injection vaccinale ou dans une région, où a été précédemment réalisée l'exérèse d'une réaction secondaire à une injection (37).

Ces constatations sont appuyées par l'étude, réalisée, en 1993 par KASS *et al.* (44), qui a servi de base à notre présentation épidémiologique des FSSI. Cette étude relie l'apparition des fibrosarcomes aux vaccinations utilisant des vaccins inactivés (FeLV et rage).

Entre 1987 et 1991, la part des FS présents aux sites d'injection augmente d'environ 5 % par an, avec une augmentation majeure entre 1987 et 1988 (voir tableau 1) (39, 41).

**Tableau 1 : Evolution des pourcentages des FS diagnostiqués à des sites d'injection et à d'autres sites (39, 41)**

<b>Année</b>	<b>1987</b>	<b>1988</b>	<b>1989</b>	<b>1990</b>	<b>1991</b>
<b>FS aux sites d'injections (%)</b>	54	68	62	67	75
<b>FS aux autres sites (%)</b>	46	32	38	33	25

Les sites d'injections sont ceux cités précédemment. Autres sites : tête, membres antérieurs, doigts.

Une autre étude réalisée par DODDY et GLICKMAN (17) entre juillet 1988 et juin 1994, sur 170 cas, décrit une tendance identique : 30 % de FSSI et 70 % de FSNSI en 1989, contre 80 % de FSSI en 1994 (voir tableau 2).

**Tableau 2 : Rapport FS / nombre total de biopsies et ratio FSSI et FSNSI entre 1989 et 1994 (17, 29)**

Année	1989	1990	1991	1992	1993	1994
Biopsies félines reçues	1855	1244	1314	1215	1184	1129
FS / total (%)	1.13	1.69	2.97	1.65	3.04	2.92
Ratio FSSI/FSNSI	0.54	1.00	1.47	1.86	2.6	4.33

Suite à l'épizootie de rage de 1987 en Pennsylvanie, la vaccination antirabique annuelle est devenue obligatoire. Peu avant cette épizootie (en 1985), un nouveau vaccin antirabique inactivé dont l'adjuvant est à base d'aluminium a remplacé le vaccin vivant atténué utilisé auparavant. Ce vaccin a été adopté par de nombreux vétérinaires, car le premier s'injectait par voie intra-musculaire, alors que le dernier par voie sous-cutané. La même année, un nouveau vaccin contre le FeLV, lui aussi inactivé adjuvé à base d'aluminium, a été introduit (59).

L'augmentation du nombre de tumeurs dans les zones habituelles d'injection est consécutive à la mise en place de la vaccination antirabique obligatoire et est la traduction du passage de l'injection intramusculaire à sous-cutanée (37).

Depuis 1994, les publications sur l'évolution de la fréquence des FSSI ont diminué et seule une publication par MACY (59), en 1999, s'intéresse à cette donnée épidémiologique. La fréquence semble stable depuis la moitié des années 90. L'utilisation massive, depuis 1985, des vaccins adjuvés contenant de l'aluminium pourrait expliquer que la prévalence se stabilise, puisque les chats vaccinés depuis cette année-là arrivent en fin de vie.

#### b/ Diminution de l'âge des animaux touchés.

Les FS touchent, depuis le début des années 1990, des individus plus jeunes. Comme nous l'avons cité précédemment, les animaux touchés par les FS sont passés d'individus d'âge moyen autour de 10-11 ans à des individus atteints dès l'âge de 6-7 ans, avec toujours un pic autour de 10-11 ans (19).

Cette donnée épidémiologique confirme l'émergence d'une nouvelle forme clinique (19).

## **2/ Arguments histologiques en faveur de l'implication de l'injection vaccinale**

### a/ Comparaison des caractéristiques histologiques des réactions sous-cutanées post-vaccinales, des fibrosarcomes aux sites d'injection et de ceux aux autres sites.

Les lésions post-injections sont des masses sous-cutanées bien délimitées et envahissant les parties profondes du derme. Le centre de ces réactions inflammatoires est nécrotique et entouré d'une zone composée principalement de macrophages, qui peuvent être accompagnés de quantités variables de lymphocytes, de plasmocytes et de polynucléaires éosinophiles. Les lymphocytes sont souvent nombreux et peuvent former des follicules lymphoïdes. Quand les polynucléaires éosinophiles sont présents, ils se répartissent sur les couches les plus profondes des cellules inflammatoires, près du centre nécrotique (36).

Comme cela a été présenté dans la première partie, les FSSI sont des tumeurs bien circonscrites et entourées d'une réaction inflammatoire composée essentiellement de lymphocytes et de macrophages (pour 51 % des tumeurs reçues par l'université de Pennsylvanie en 1991 (39)). Elles sont donc semblables aux infiltrations granulomateuses et lymphoïdes mises en évidence dans les réactions aux sites d'injection (37) et aussi bien différentes de l'aspect classique des FSNSI (4).

De plus, des lésions histologiques pouvant correspondre à des transitions entre des granulomes inflammatoires chroniques et des lésions néoplasiques ont été identifiées, en 1994, par HENDRICK *et al.* (40).

### b/ Découverte d'aluminium dans les foyers inflammatoires péri-tumoraux

Sur 21 % des tumeurs reçues par l'université de Pennsylvanie en 1991, un matériel étranger cristallin, granuleux et gris-marron a été mis en évidence dans le cytoplasme des macrophages du foyer inflammatoire (voir figure 9) (39).

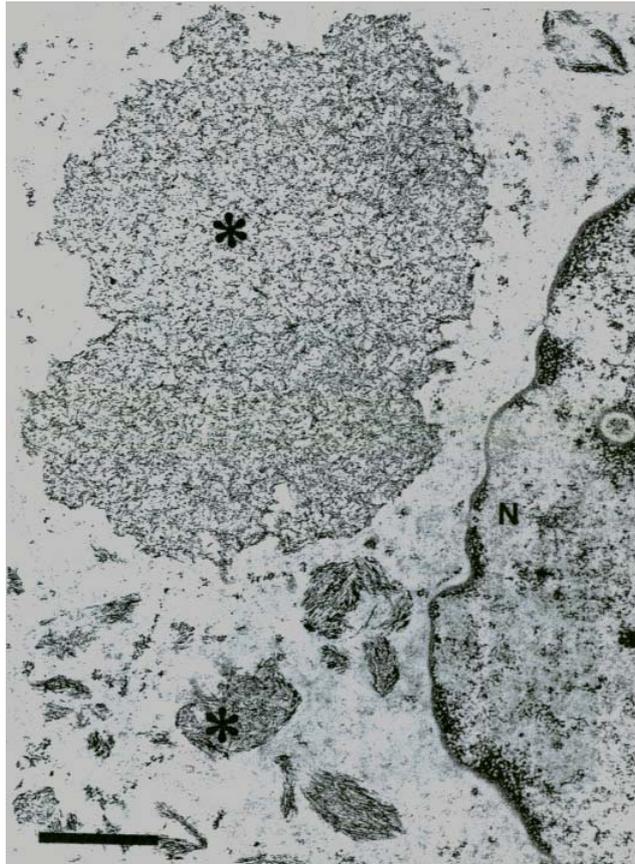
**Figure 9 : Aspect en microscopie électronique d'un macrophage situé en périphérie d'un FS situé à un site d'injection.**

Le cytoplasme contient des agrégats d'un matériel granuleux et dense composé d'aluminium et d'oxygène (marqué d'un \*)

N : noyau

Barre : 1  $\mu\text{m}$

D'après (39)



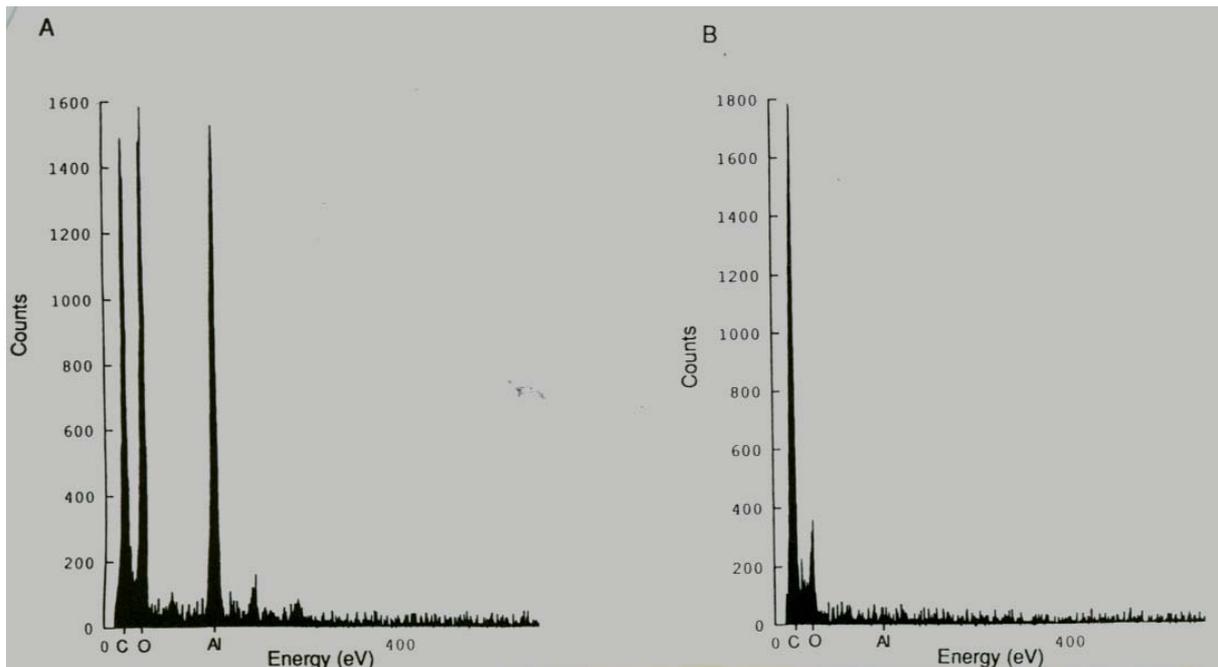
L'analyse aux rayons X de ce matériel a permis de découvrir qu'il contenait de l'aluminium, avec une concentration élevée en oxygène (voir figure 10). Du matériel identique a été identifié dans les macrophages présents autour des réactions dues aux injections vaccinales (39).

**Figure 10 : Représentation des spectres aux rayons X du dépôt granuleux (A) trouvé dans le cytoplasme des macrophages et du cytoplasme adjacent (B).**

Noter la présence de très larges pics d'aluminium et d'oxygène dans le spectre du dépôt et l'absence d'aluminium dans la région adjacente. Le petit pic d'oxygène est dû à la présence d'oxygène dans les environs du matériel et / ou aux protéines cytoplasmiques.

Counts : quantité d'énergie reçue.

D'après (39)



L'hydroxyde d'aluminium est l'un des adjuvants vaccinaux les plus utilisés (39, 78). Ces observations peuvent donc amener à deux hypothèses : soit l'aluminium est à l'origine des FSSI ; soit l'aluminium est juste le marqueur de la persistance d'adjuvant ou de matériel pro-inflammatoire au site d'injection. Comme l'apparition de fibrosarcomes a également été reliée à l'injection de vaccin adjuvés ne contenant pas d'aluminium ou non adjuvés, la deuxième hypothèse semble être plus probable (24, 36, 37, 38, 39, 40, 57, 61, 78).

### **3/ Arguments cliniques en faveur de l'implication de l'injection vaccinale**

#### **a/ Augmentation du nombre de réactions locales consécutives aux injections vaccinales**

Deux publications de 1991 décrivent respectivement 10 et 48 cas de panniculite focale granulomateuse et nécrosante consécutive à des injections

antirabiques (36, 37). Cette augmentation est reliée à la mise en place d'une vaccination obligatoire contre la rage depuis 1987 (34, 36, 37).

Ainsi, les nouveaux vaccins et leur utilisation plus intensive auraient pu mettre en lumière un effet secondaire jusqu'alors anecdotique : une réaction inflammatoire locale plus importante. Cette dernière pourrait être le premier événement d'une cascade aboutissant à l'apparition de FSSI (34).

#### b/ Prévalence des fibrosarcomes aux sites d'injection dans les pays n'utilisant pas ou peu les vaccinations contre la leucose et / ou la rage

Dans les pays, où pour une raison ou pour une autre, les vaccins contre la leucose et la rage sont peu utilisés ou différents (Australie, Angleterre, Japon et Hollande), les publications rapportent des taux de prévalence de FS inférieurs à ceux admis ou ne font, pour l'instant, pas part de l'apparition de fibrosarcomes aux sites d'injection (57, 61). Ces arguments invitent, par comparaison aux observations nord-américaines, à relier ces vaccinations au FS.

#### c/ Variation de l'intervalle injection vaccinale - apparition de la tumeur pour les fibrosarcomes aux sites d'injection et ceux aux autres sites

KASS *et al.* (44) ont étudié l'intervalle entre la vaccination contre le FeLV et l'apparition des tumeurs. Pour les FSSI, l'écart entre la dernière vaccination et l'apparition de la tumeur est de 340 jours en moyenne (entre 3 mois et 3 ans), alors qu'il est de 1506 en moyenne pour les FSNSI. Cette observation constitue un argument fort en faveur d'un lien entre l'injection vaccinale et les FSSI.

La troisième partie de cet exposé va s'intéresser aux mécanismes pouvant être à l'origine des FSSI.

### **III/ Différentes hypothèses concernant un lien physiopathogénique entre injection vaccinale et fibrosarcomes aux sites d'injection**

Depuis l'augmentation de la fréquence des FSSI associée à la vaccination antirabique obligatoire en Pennsylvanie, le lien de cause à effet entre les injections vaccinales et ces tumeurs est fortement suspecté. Cependant, de manière fine, les mécanismes précis restent largement incompris. Plus précisément, l'implication d'un seul processus ou d'un faisceau d'interventions reste largement discutée. En premier lieu, l'inflammation est plus particulièrement évoquée comme pouvant expliquer l'apparition de FSSI suite aux injections vaccinales. En deuxième lieu, une cause virale ou des prédispositions individuelles représentent aussi des pistes à explorer.

#### **1/ Rôle de l'inflammation dans l'émergence de tumeurs mésoenchymateuses**

Une des hypothèses majeures quant à la pathogénie des FSSI est l'association entre la persistance d'une inflammation locale (associée soit à la présence de l'adjuvant, soit au traumatisme de l'injection,...) et les processus de cicatrisation locaux (34, 57). Cette hypothèse est illustrée par différentes constatations, qui vont être rappelées ici avant de s'intéresser aux FSSI et à leur rapport avec l'inflammation.

##### **a/ Exemple des modèles animaux**

Quelques modèles animaux peuvent illustrer l'importance de l'inflammation dans la cancérogenèse (53, 57, 70).

Ainsi, par exemple, les poulets infectés par le virus du sarcome de Rous (V-src) développent des tumeurs aux sites de traumatismes dans les 10 à 15 jours suivant le traumatisme (18). Inversement, en supprimant l'inflammation post-traumatique chez des poulets porteurs du V-src, on supprime l'apparition de tumeurs (64).

V-jun est l'oncogène identifié comme étant à l'origine du pouvoir pathogène du virus sarcomateux aviaire. Il induit l'apparition de fibrosarcomes chez les poulets. Des souris transgéniques, exprimant v-jun, développent vers l'âge de 2 à 3 mois des tumeurs aux endroits où des traumatismes ont été réalisés (80).

Chez le chat, un exemple analogue existe de manière spontanée : le développement de FS dans des zones de traumatisme chez les chats porteurs du FeSV constitue, en effet, un exemple de tumorigenèse post-inflammatoire (61).

Ces exemples illustrent bien le fait que des traumatismes répétés, à l'origine d'inflammation locale, associés à des modifications génétiques, peuvent provoquer l'apparition de tumeurs. Cela met aussi en évidence que, même si l'inflammation participe activement à l'apparition de FSSI, une origine multifactorielle doit évidemment être considérée (57). Ces exemples suggèrent également le fait que

prévenir l'apparition des FSSI peut passer par une réduction de l'inflammation post-vaccinale (61).

Enfin, ces exemples montrent la variabilité dans le temps entre le traumatisme initial et l'apparition du processus tumoral. Un parallèle peut être établi entre cette variabilité et les écarts, rapportés dans les différentes publications, entre l'injection vaccinale et l'apparition d'un FSSI (61).

#### b/ Exemple des sarcomes oculaires post-traumatiques

Plusieurs publications ont décrit, chez le chat, des fibrosarcomes oculaires se développant à la suite de traumatismes suivis d'inflammation chronique. Ces tumeurs se développent parfois plusieurs années après le traumatisme. Les études donnent un intervalle de 5 mois à 12 ans suivant les études, mais peu de cas sont répertoriés (2, 21). Ces tumeurs mésoenchymateuses, constituées essentiellement de cellules fusiformes arrangées en faisceaux entourées d'une matrice de collagène, sont histologiquement comparables aux FSSI. Ainsi une pathogénie commune d'inflammation et de cicatrisation anormale à l'origine de leur développement peut être suspectée (57).

#### c/ Fibrosarcomes associés à des injections de substances autres que les vaccins

Les exemples sont peu nombreux, mais certains auteurs impliquent les injections retard dans l'apparition des FSSI (antibiotiques, corticoïdes) (19). Ainsi un article, dans une étude de 25 biopsies, reporte l'exemple d'un chat ayant reçu sur la cuisse une injection de corticoïdes retard et développé un FS au même endroit (55). Un autre exemple décrit le cas d'un chat, au passé vaccinal inconnu, ayant reçu une injection de Lufénuron<sup>ND</sup> en sous-cutané. Un mois après injection, un granulome inflammatoire est apparu et 5 mois plus tard (donc 6 mois post-injection), un fibrosarcome de 7 cm de diamètre était présent (27).

Enfin, un dernier exemple décrit le cas d'un FS s'étant développé sur une suture profonde non-résorbable, 7 ans après la chirurgie (8).

#### d/ Cas des fibrosarcomes aux sites d'injection vaccinales

L'acte vaccinal constitue une agression complexe à l'issue de laquelle s'additionnent les effets des facteurs mécaniques (dilacération tissulaire, hémorragies,...), physico-chimiques (adjuvants) et biologiques (antigènes viraux). A cela, peuvent s'ajouter les rôles possibles des agents d'inactivation virale, des contaminants viraux et des facteurs de cultures cellulaires (EGF, sérum bovin foetal...). Quel que soit le type de vaccin, l'inflammation locale créée par les différents composants du vaccin semble jouer un rôle déterminant dans le développement des FSSI (15).

### *d-1/ Les raisons de l'inflammation créée par l'injection vaccinale*

L'inflammation locale recherchée suite à un dépôt très concentré d'antigène ou à la présence résiduelle d'adjuvants, s'explique par différents facteurs (44). Tout d'abord, les adjuvants sont choisis, en partie, pour leurs qualités pro-inflammatoires (57). Puis, les vaccins habituels contre la rage et la leucose sont, dans la majorité des cas, inactivés et donc adjuvés. De plus, le vaccin antirabique est prévu pour assurer une immunité de trois ans (12). Les quantités d'adjuvant et d'antigène déposées sont donc importantes (40).

### *d-2/ La cascade d'événements provoquant l'apparition des fibrosarcomes aux sites d'injection*

Une des hypothèses, reliant l'inflammation locale aux FSSI, implique la persistance de réactions inflammatoires locales liées à un adjuvant, un antigène ou aux 2. Ces réactions prédisposeraient le chat à une réponse erronée du système de réparation du tissu sous-cutané (des altérations génétiques se produisant sans être décelées (40)), conduisant éventuellement à l'apparition d'une tumeur dans certains cas (34, 38, 56, 76, 78, 79). Un des arguments permettant d'étayer cette hypothèse est la découverte de certains cas « mixtes », comprenant des foyers microscopiques de fibrosarcome dans des granulomes inflammatoires (39).

### *d-3/ Les acteurs cellulaires de l'inflammation*

Les fibroblastes et les myofibroblastes sont les cellules qui semblent le plus incrimées (40, 41). Les FSSI représentent un spectre de sarcomes qui peuvent provenir des fibroblastes, des myofibroblastes et d'autres cellules mésenchymateuses indifférenciées qui prolifèrent dans des zones d'inflammation chronique et/ou de cicatrisation (38).

Plusieurs études (38, 63) ont essayé de prouver l'implication des myofibroblastes, en utilisant les capacités de contractilités des cellules tumorales, ainsi que la présence d'actine musculaire  $\alpha$ -smooth cytoplasmique ( $\alpha$ -SMA : éléments du cytosquelette) et la présence de plaques sousmembranaires de filaments du cytosquelette.

Une étude (38), réalisée sur 60 cas, par marquage immunohistochimique, a montré que 60% des tumeurs sont positives au  $\alpha$ -SMA. Une autre étude (63), réalisée entre 1996 et 1999, sur 20 cas de FSSI a, elle, révélé par microscopie électronique la présence de myofibroblastes. Cela suggère une large implication des myofibroblastes. Les cellules marquées étaient majoritairement des cellules tumorales. Elles constituaient une population de cellules différenciées adjacente aux zones majeures d'inflammation. Elles étaient présentes soit dans la tumeur, soit en périphérie, pour former une capsule. Les cellules en périphérie semblaient être plutôt réactives que néoplasiques. Les myofibroblastes ont probablement un rôle mixte dans la carcinogenèse des FSSI (38, 63).

**CONCLUSION** : par ses caractéristiques, l'acte vaccinal provoque une inflammation locale importante, qui pourrait participer à l'apparition des FSSI. Les myofibroblastes semblent être les acteurs cellulaires probables de ce mécanisme.

## 2/ L'hypothèse virale

Même si les FSSI sont similaires dans leur apparence aux fibrosarcomes d'origine virale, les avancées dans la découverte des mécanismes à l'origine des FSSI semblent aller directement à l'encontre d'une implication virale directe (57). Leurs dissemblances épidémiologiques, nombreuses, appuient aussi cette opposition. Par exemple, les FSNSI sont plutôt multicentriques et présents chez les chats âgés, alors que les FSSI sont généralement uniques et touchent des animaux plus jeunes (39).

Des arguments expérimentaux forts en défaveur d'une implication virale ont été obtenus dans le cadre de l'étude faite par ELLIS *et al.* (23) sur 130 FSSI, où ont été recherchés, par immunohistochimie et par PCR, le FeLV et le FeSV. En prenant pour témoin un FSNSI, la recherche ciblait l'expression d'une protéine d'enveloppe du FeLV, la gp 70, et celle d'une séquence LTR du même virus. Le témoin s'est révélé positif pour ces deux marqueurs mais la recherche effectuée sur les 130 FSSI était négative. Alors que le FeLV et le FeSV sont obligatoirement associés au sein d'un fibrosarcome viro-induit, aucun rétrovirus n'était exprimé dans la tumeur au moment de l'excision (22).

Cette étude a été un précurseur pour de nombreuses autres, où différents virus ou constituants ont été recherchés. C'est le cas pour :

- ❖ le FIV (virus de l'immunodéficience féline),
- ❖ les ARN de FeLV endogène,
- ❖ l'ADN et des éléments antigéniques de polyomavirus, pouvant contaminer les vaccins,
- ❖ l'ADN du spumavirus félin (le FeFV ou feline foamyvirus),
- ❖ l'ADN et des facteurs antigéniques de papillomavirus, pouvant être présent à la surface de la peau et se retrouver en SC lors du passage de l'aiguille.

Toutes ces études ont été réalisées avec 50 FSSI et 50 FSNSI. Aucun virus ou ARN endogène n'a été détecté dans les FSSI ou dans les FSNSI (48, 49, 50, 51, 52).

**CONCLUSION** : il semble donc peu probable qu'une infection virale puisse expliquer l'apparition de FSSI.

## 3/ Les prédispositions individuelles

En préambule au questionnement d'une prédisposition individuelle, il est important de noter qu'il existe avant tout une prédisposition d'espèce, puisque comme le disent MACY *et al.* (62) : « Ces réactions ne sont pas uniquement présentes sur le chat, mais le chat est unique dans sa réponse et dans l'activation des oncogènes » (62).

L'inflammation chronique est bien sûr le mécanisme principal mais on ne peut ignorer qu'une prédisposition individuelle existe. Une étude menée par MACY (59) en 1999 a démontré que, dans quasiment 100% des cas, l'administration d'un vaccin inactivé contre le FeLV ou contre la rage provoquait la formation d'un granulome inflammatoire. Cependant il a été démontré que, dans seulement environ 1 cas sur 10 000, un fibrosarcome apparaissait au site de ce granulome.

La notion de prédisposition individuelle est aussi illustrée par un constat simple : l'incidence des FSSI reste très faible comparée au nombre sans cesse croissant de sujets vaccinés. Ainsi, pour les individus prédisposés, il pourrait exister une déviation et une exacerbation de la réaction inflammatoire dans sa phase réparatrice et cicatricielle. Les mécanismes de sensibilité individuelle restent à démontrer mais la tendance actuelle est de faire appel à une cascade d'événements (45).

**CONCLUSION** : une prédisposition individuelle joue certainement un rôle dans le développement des FSSI. Les mécanismes génétique et moléculaire pouvant expliquer l'apparition des FSSI et la plus grande susceptibilité de certains individus vont être développés dans la partie suivante (15).

#### **4/ Mécanismes génétique et moléculaire suspectés dans l'apparition des fibrosarcomes aux sites d'injection**

##### a/ Mécanismes génétiques

Différentes altérations chromosomiques ont été mis en évidence par MAYR *et al.* (65) dans quatre FS. Cependant, dans un contexte de développement tumoral, il est habituel d'observer des modifications anarchiques du patrimoine génétique des cellules. Il est donc difficile de statuer sur le rôle de ces modifications : soit à l'origine de l'altération de l'expression de gènes impliqués dans le développement des tumeurs, soit conséquentes au développement des tumeurs. Dans cette partie, sont donc présentées les modifications géniques spécifiquement envisagées comme susceptibles d'impliquer soit une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, soit une activation de proto-oncogène (4).

##### *a-1/ Présentation des gènes mis en cause*

Chez l'homme, le gène suppresseur de tumeurs p53 et le proto-oncogène c-myc jouent un rôle important dans l'étiopathogénie de nombreux sarcomes des tissus mous.

Les chats atteints de FSSI présentent une perte d'hétérozygotie au niveau du locus p53 (76).

La protéine codée par le gène p53 normal intervient dans la mort programmée des cellules ou apoptose. Elle régule ainsi l'induction de l'apoptose des cellules avec un ADN irrémédiablement muté et prévient donc la persistance de l'ADN lésé (69).

Ainsi, une absence ou une inhibition de cette mort cellulaire programmée pourrait contribuer à une croissance sans contrôle et à la survie de cellules anormales (67).

Quant à c-myc, l'activation de cet oncogène provoque, dans de nombreuses espèces, une « mise en veille » des gènes suppresseurs de tumeurs et sa mutation limite le contrôle de la prolifération cellulaire par l'apoptose (56). Cependant la relation entre c-myc et les FSSI est suspectée mais encore peu explorée, nous allons donc nous intéresser essentiellement à p53.

#### *a-2 / Modifications touchant le gène p53.*

Plusieurs publications décrivent des altérations du gène p53. Une étude de MAYR *et al.* (66) décrit les mutations touchant ce gène. Ce sont essentiellement des mutations non sens avec, tout de même, la présence conjointe, dans les tumeurs, d'un gène normal. D'après STARR (83), il a été établi une banque de données importante sur des FSSI, le sang des animaux atteints et des marges apparemment saines des lésions. Plusieurs sites de polymorphisme génomique du gène p53 ont été identifiés, et en particulier dans les zones apparemment saines entourant les sarcomes retirés. La signification de ce polymorphisme est encore inconnue, mais il pourrait être le signe de mutations dans les marges des FSSI. Cela pourrait expliquer, en partie, le fort taux de récurrence local.

Cependant tous les FSSI ne sont pas porteurs de mutations du gène p53 (69).

Une étude a été réalisée sur 40 FS afin de déceler, par immunohistochimie, d'éventuelles mutations de p 53 (69).

Normalement la protéine de l'allèle sauvage de p53 n'est pas détectable par marquage immunohistochimique car sa durée est de vie de 30 à 40 min (69). Les mutations non-sens peuvent induire des changements de conformation qui stabilisent la protéine. Elle s'accumule et devient ainsi détectable (69). Dans cette étude, 42 % des tumeurs sont totalement positives au marquage, 20 % le sont de façon incomplète et 38 % ne le sont pas. Cela suggère une possible implication de p53 dans la carcinogenèse d'un peu moins de la moitié des tumeurs. Pour les résultats partiels, des artéfacts et des erreurs, comme la détection de l'allèle sauvage, peuvent en être à l'origine. Pour les cas à résultats négatifs, une autre cause doit être recherchée (69).

En 2000, cette étude a été suivie par une autre cherchant à typer les mutations de p53 sur 8 FSSI positifs et 13 FSSI négatifs au marquage immunohistochimique. Des mutations non-sens ont été détectés dans 5 des 8 FSSI positifs (62 %) ; aucune n'a pu être décelée sur les marges et sur les négatifs (68).

Dans une étude sur 30 FS, 5 mutations sur le gène p53 ont été détectées. Ces mutations étaient des mutations non-sens et des mutations décalant le cadre de

lecture. Ces résultats rejoignent ceux de l'étude précédente où des mutations ne sont détectées que pour une partie des FS (66).

Ainsi les mutations de p53 ne prédisposeraient pas à l'ensemble des FSSI, mais pourraient participer à la carcinogenèse de certains d'entre eux (68).

### *a-3/ Altérations génétiques et récidentes*

Récemment il a été émis l'hypothèse que les récidentes pourraient avoir une origine génétique (68). Les sites de développement de ces tumeurs rassembleraient des cellules possédant des altérations génétiques distinctes. Chacune de ces cellules pourraient subir, de façon différée, une expansion clonale. Le tissu les hébergeant serait donc prédisposé à l'apparition de tumeurs primitives multiples ou de lésions précancéreuses. Dès lors, le risque de développer un cancer au niveau de la région affectée demeure élevé pendant plusieurs années (68).

### b/ Mécanismes impliquant les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance seraient les éléments modifiés par les altérations génétiques et seraient donc impliqués dans la carcinogenèse des FSSI (76, 79).

### *b-1/ Détection des facteurs de croissance*

De nombreux oncogènes associés à l'apparition de cancers codent pour des facteurs de croissance ou leurs récepteurs (par exemple, v-sis code pour le platelet derived growth factor ou PDGF) ou provoquent leur surexpression.

Une étude a tenté d'identifier et de localiser au sein des FSSI, grâce à l'immunohistochimie, divers facteurs de croissance et leurs récepteurs (35).

Les FSSI avaient une réponse moyenne à importante pour le PDGF, alors que la réponse des FSNSI était négative à faible. De plus, les lymphocytes des FSSI étaient positifs à PDGF, alors que ceux des FSNSI, des noeuds lymphatiques normaux ou des plaques de Peyer étaient négatifs. Il a aussi été démontré que les macrophages des FSSI étaient positifs aux marquages immunohistochimiques pour PDGF et que les cellules tumorales qui étaient les plus proches des lymphocytes étaient celles qui avaient la réponse aux PDGF la plus marquée.

Ces découvertes permettent d'émettre l'hypothèse que les lymphocytes des FSSI synthétisent du PDGF pour recruter les macrophages et pour provoquer une prolifération fibroblastique (35).

D'autres données élargissent le nombre de facteurs potentiellement impliqués dans le développement des FSSI. Des immunodétectations positives, pour l'epidermal growth factor (EGF), le fibroblast growth factor (FGF), le PDGF, le transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et c-jun, ont en effet été identifiées préférentiellement dans les FSSI. Cependant, d'autres études sont en cours pour essayer de démontrer si ces

surexpressions peuvent être attribuables à des altérations structurales génétiques ou à une amplification génétique (35).

### *b-2/ Relation facteurs de croissance et myofibroblastes*

Les facteurs de croissance sont essentiels pour la régulation des phénomènes cellulaires impliquant la formation d'un tissu de granulation et la cicatrisation des traumatismes. L'ajout de certains facteurs de croissance à des cultures de fibroblastes change les caractéristiques physiques de ces cellules, qui se transforment en cellules tumorales. Ainsi beaucoup de tumeurs en médecine humaine ont été associées à des stimulations autocrines : ces tumeurs ont des récepteurs pour les facteurs de croissance, qu'elles-mêmes produisent anormalement de façon autonome (35).

Beaucoup d'oncogènes provoquent des cancers par la surexpression de facteurs de croissance et de leurs récepteurs. Dans le mécanisme normal de la cicatrisation suite à un traumatisme, le PDGF est relargué par la destruction des plaquettes et stimule ainsi la division des fibroblastes. Les fibroblastes répondent au PDGF, mais généralement ne le synthétisent pas. Or PDGF et ses récepteurs sont synthétisés de façon anormale dans les FSSI. Quand PDGF est présent en quantité anormale, les fibroblastes peuvent se transformer en cellules tumorales et aboutir ainsi à des tumeurs (67).

### *b-3/ Autres gènes potentiellement impliqués*

Il a été émis l'hypothèse que des facteurs de croissance, à l'origine des modifications d'expression du génome, puissent être impliqués dans l'apparition des FS.

L'expression de c-jun a ainsi été étudiée. Ce gène est un proto-oncogène, codant pour le facteur de transcription AP-1. *In vitro* il joue un rôle dans la prolifération cellulaire et dans l'oncogénèse. L'homologue de c-jun, v-jun, a été impliqué dans l'oncogénèse de modèles aviaires et murins de sarcomes post-traumatiques (comme développé dans le III/ 1/ a/). Lors de marquage immunohistochimique, les FSSI sont très fortement positifs pour c-jun, alors que les FSNSI sont généralement négatifs. Ainsi une stimulation plus marquée des facteurs de croissance par les lymphocytes et par des mécanismes paracrines pourrait conduire à l'induction et à la surexpression de c-jun dans ces tumeurs (35).

**CONCLUSION** : des altérations génétiques à l'origine de modifications dans l'expression de certains facteurs de croissance pourraient être le point de départ du développement des FSSI. Elles pourraient sensibiliser des individus à l'inflammation locale provoquée par une injection vaccinale.

Si l'inflammation est donc considérée comme un antécédent indispensable à de multiples événements aboutissant à long terme à des FSSI, il semble important d'essayer de réduire l'inflammation post-vaccinale. Cela peut être réalisé en influant sur les différents composants d'un vaccin (83).



#### **IV/ Les adjuvants : présentation, effets secondaires et rôle dans l'oncogénèse des tumeurs du complexe fibrosarcome félin**

Le rôle prépondérant de l'inflammation dans la pathogénie des FSSI a été souligné dans la partie précédente. Pour les vaccins, les éléments les plus susceptibles d'être à l'origine de phénomènes inflammatoires sont les adjuvants. La première définition du terme « adjuvant » a été donnée par RAMON (74) en 1925 : c'est une substance, qui, si elle est utilisée en combinaison avec un antigène, produit un niveau d'immunité supérieure à celui produit par l'antigène seul.

Dans cette partie, vont être présentés tout d'abord les vaccins, puis les adjuvants qui leur sont associés, et enfin les effets secondaires de ces derniers.

##### **1/ Présentation des différents types de vaccins**

Beaucoup des vaccins utilisés actuellement sont appelés « vaccins de première génération ». Ces préparations ne sont pas hautement purifiées, mais sont particulièrement aptes à produire une réponse immunitaire efficace sans effets secondaires majeurs (58).

La recherche a permis la mise au point de vaccins de deuxième génération. Ils contiennent, pour la plupart, une ou plusieurs protéines de surfaces isolées. Cependant, la réponse immunitaire induite par une seule protéine soluble est souvent significativement différente de celle provoquée par un vaccin vivant atténué ou tué contenant l'organisme pathogène en entier. Cette faible immunogénicité a été compensée par l'utilisation des adjuvants, qui, bien qu'efficaces, sont la source de nombreux effets secondaires (fièvre, arthrite, uvéite et tumeurs) (58).

##### **a/ Vaccins atténués et vaccins inactivés**

Traditionnellement, on distingue 2 types de vaccin de première génération : les vaccins vivants modifiés ou vaccins atténués et les vaccins tués ou appelés aussi inactivés.

##### ***a-1/ Les vaccins atténués***

Les vaccins atténués envahissent les cellules hôtes, qui produisent des antigènes endogènes. Présentés associés au complexe majeur d'histocompatibilité, ces antigènes sont reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques. Une réponse à médiation cellulaire importante est ainsi initiée. Les vaccins atténués peuvent donc aisément surpasser les interférences avec les anticorps maternels. De plus, ils provoquent moins de réactions d'hypersensibilité. Ils permettent le développement plus précoce d'une immunité qui sera plus durable que celle induite par les vaccins inactivés. Cela permet bien entendu d'éviter l'ajout d'adjuvant (75).

### *a-2/ Les vaccins inactivés*

Tous les virus ne peuvent pas être atténués. C'est le cas des rétrovirus où une virulence résiduelle pourrait être catastrophique. Les vaccins inactivés peuvent donc représenter une alternative. Ils ne sont cependant pas dénués d'effets secondaires. Tout d'abord, ils doivent être administrés plusieurs fois avant de réaliser une stimulation suffisante à la mise en place d'une immunité efficace. Puis, ils sont souvent moins à même d'induire une réponse à médiation cellulaire satisfaisante. Ils ont aussi plus de problème à surpasser les interactions avec les anticorps maternels. Enfin, comme ils ne se répliquent pas dans l'hôte, une quantité importante d'antigène est souvent nécessaire (75).

### b/ Les nouveaux types de vaccins, dits de deuxième génération

Différentes pistes sont explorées pour éviter d'ajouter une quantité importante d'adjuvant :

- des vaccins sous-unités, contenant juste une protéine virale. Cependant, étant incapables de se répliquer dans l'hôte, ils ne stimulent pas la réponse immunitaire à médiation humorale. Leur pouvoir immunogénique est donc limité (75).

- des vaccins avec les gènes de virulence délétés. Ce sont des vaccins vivants atténués plus sûrs que ceux habituellement utilisés. Cependant ces vaccins imposent un génome de grande taille et les gènes portant la capacité de se dupliquer doivent être éloignés des gènes de virulence (75).

- des vaccins utilisant des acides nucléiques. Le principe est de produire un plasmide dans lequel sont insérés les gènes codant pour les antigènes viraux (75).

- des vaccins recombinants utilisant des vecteurs viraux. Ils sont obtenus en introduisant un ou plusieurs gènes de l'organisme pathogène dans un organisme avirulent. Les gènes choisis ne codent pas pour les protéines à l'origine du pouvoir pathogène des virus. Les vecteurs de choix sont les poxvirus. Tout d'abord, ils ont un génome de grande taille, qui possède une douzaine de sites où peuvent être implantés des séquences. Ils sont stables. Leur pouvoir immunogénique est élevé. Leur production est facile et peu onéreuse. De plus leur spectre d'hôte est large et ils peuvent être administrés par de nombreuses voies. C'est ce type de vaccin qui est utilisé dans notre étude, c'est pourquoi sa présentation va être détaillée dans la partie suivante (75).

### **2/ Présentation d'un exemple de vaccin recombinant : le vaccin utilisé dans notre étude : l'Eurifel<sup>ND</sup> FeLV.**

Le vaccin Eurifel<sup>ND</sup> un vaccin à vecteur viral vivant non répliatif, utilisant un canarypoxvirus (figure 11) (73).

### a/ Le vecteur canarypoxvirus

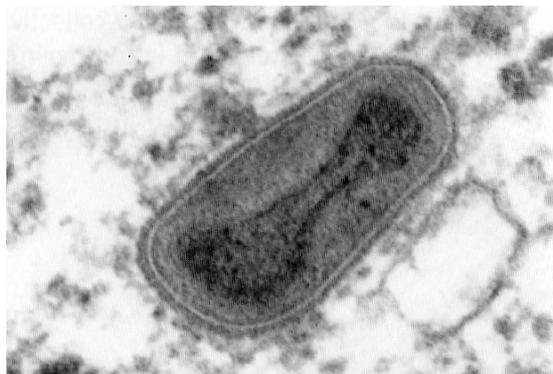
Comme tout vaccin ayant pour objectif de protéger contre un rétrovirus, il est impossible d'utiliser un vaccin vivant atténué classique pour la leucose. En effet, on ne peut courir le risque de recombinaisons entre le génome du vaccin et les séquences FeLV-like endogènes. Pour éviter l'ajout d'adjuvant dans un vaccin inactivé, l'utilisation d'un vecteur viral vivant tel que le canarypoxvirus apparaît séduisante (73).

Le vecteur canarypoxvirus est un vecteur vaccinal viral de choix chez les mammifères pour plusieurs raisons :

- son spectre d'hôte est étroit et essentiellement limité au canari,
- il ne se multiplie pas dans les cellules de mammifères, ce qui en fait un vecteur non répliquatif chez ces derniers,
- son site de réplication est intracytoplasmique,
- il n'est pas pathogène pour les mammifères et notamment pour l'homme (73).

### **Figure 11 : Canarypoxvirus.**

Le canarypoxvirus est un gros virus enveloppé, dont l'ADN est suffisamment important pour accueillir l'insertion de plusieurs gènes d'intérêt, comme les gènes env et gag/pro du FeLV. Son site de réplication est intracytoplasmique.  
D'après (73)



### b/ Le canarypox-FeLV

Le FeLV est représenté par 3 sous-types A, B et C. Ces 3 biotypes se distinguent par leur tropisme cellulaire in vitro, par leur pathogénicité et par des différences de glycoprotéine d'enveloppe (73).

Pour qu'un vaccin soit efficace contre le FeLV, les antigènes du FeLV de type A sont suffisants, car :

- le sous-type A est présent dans 100% des isolats,
- dans les conditions naturelles, il assure la transmission de chat à chat ainsi que l'induction de la virémie et l'infection latente,
- il est antigénétiquement stable,
- les sous-types B et C sont dérivés du type A respectivement soit par recombinaison entre le FeLV A et les séquences FeLV endogènes de l'hôte, soit par mutation ponctuelle dans le gène codant pour la glycoprotéine d'enveloppe. Dans les conditions naturelles, les sous-types B et C ne peuvent infecter un chat que s'ils sont associés au sous-type A (73).

Ainsi, le canarypox-FeLV n'exprime que les immunogènes protecteurs majeurs du FeLV, c'est-à-dire :

- la glycoprotéine gp70 codée par le gène env du FeLV-A. La gp 70 est la cible des anticorps neutralisants et des lymphocytes T cytotoxiques (LTc),
- et les protéines de capsid codées par le gène gag du FeLV-A, qui sont également une cible des LTc (73).

Le canarypox-FeLV contient également le gène de la protéase qui est responsable de la maturation de la polyprotéine codée par gag (73).

Le canarypox-FeLV ne contient, par contre, aucun des gènes du FeLV impliqués dans sa réplication ou dans son intégration dans le génome cellulaire. (Terminal repeats, integrase, reverse transcriptase) (73).

### c/ Le mode de fonctionnement du canarypox-FeLV

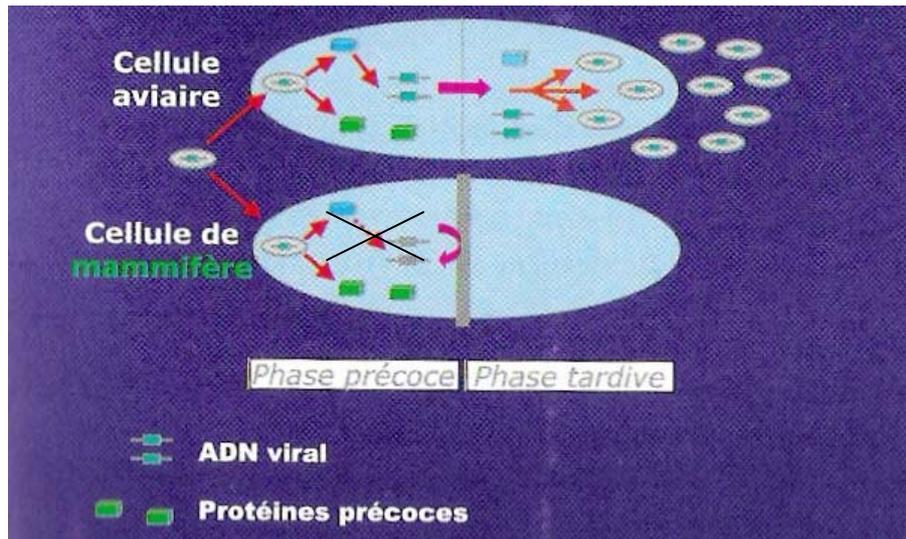
Bien que le vecteur canarypox ne se multiplie pas dans les cellules de mammifères, le canarypox-FeLV est capable de stimuler une réaction immunitaire contre le FeLV (73).

Dans les cellules de mammifères, le cycle de réplication du canarypoxvirus est abortif (voir figure 12). L'arrêt du cycle intervient après la phase précoce et juste avant la réplication de l'ADN viral. Ce cycle abortif permet donc l'expression des protéines précoces, dont les protéines env et gag du FeLV (73).

**Figure 12 : Schéma du cycle du canarypoxvirus dans une cellule permissive (cellule aviaire) et dans une cellule non permissive (cellule de mammifère).**

Dans les cellules de mammifères, le cycle de réplication est interrompu après la synthèse de protéines précoces et avant la réplication de l'ADN viral. Dans une cellule de chat, aucune particule virale nouvelle n'est formée et le canarypoxvirus-FeLV disparaît après avoir exprimé les protéines précoces dont les immunogènes env et gag du FeLV-A.

D'après (73)



Ces immunogènes, exprimés de manière naturelle dans le cytoplasme de la cellule contenant le canarypox-FeLV, sont propices à la stimulation d'une réaction immunitaire complète (73).

### 3/ Présentation des adjuvants

Les adjuvants permettent aux vaccins qui seraient inefficaces seuls d'immuniser correctement un patient. Les adjuvants permettent aussi, parfois, de diminuer les quantités d'antigènes (58).

#### a/ Mécanisme d'action

Les adjuvants sont utilisés pour compenser le faible potentiel immunogène des vaccins tués. Pour cela, leur capacité à provoquer un afflux de cellules immunitaires les distingue (75).

Les mécanismes par lesquels les adjuvants stimulent le système immunitaire sont encore imparfaitement connus mais ils reposent sur les points suivants. Tout d'abord, ils maintiennent un dépôt d'antigènes au site d'injection. Puis, ils favorisent l'accumulation de cellules immunoréactives au site d'injection et dans les nœuds

lymphatiques de drainage. Ensuite, ils modifient l'activité des cellules responsables de la formation, de la stimulation et du maintien de la réponse immunitaire. Enfin, ils modifient la façon dont est présenté l'antigène au système immunitaire (75).

#### *a-1/ L'effet dépôt*

Tout d'abord, les adjuvants permettent le maintien d'un dépôt d'antigènes au site d'injection car beaucoup ne sont pas solubles.

C'est le cas, par exemple, des émulsions eau-huile. La persistance de l'antigène au site d'injection permet de faciliter le maintien du titre sérique en anticorps (3, 87). Par contre, le mécanisme par lequel l'effet dépôt maintient la réponse en anticorps est un peu plus flou. Il a été proposé, que les granulomes qui se développent au site d'injection, contiendraient de nombreuses cellules productrices d'anticorps responsables de la réponse immunitaire augmentée (46, 47). La très nette diminution de la production d'anticorps, suite au retrait chirurgical du site d'injection vaccinale 30 min après l'inoculation, appuie cette hypothèse (28).

Cependant, la quantité d'antigène relarguée dépend de l'adjuvant et est très variable. Par exemple, les émulsions eau-huile stimulent, de façon maximale, la réponse immunitaire uniquement sur une courte période après la vaccination, même si 30% des antigènes sont encore stockés au sein du granulome 21 jours après l'injection (54). Les autres adjuvants, tels que les saponines, retiennent aussi longtemps les antigènes au site d'injection mais sont capables d'induire une immunité plus durable (54). Les effets stimulants d'un dépôt persistant d'adjuvant et d'antigène pourraient donc être attribuables à un deuxième mécanisme. Les nœuds lymphatiques drainant la région de l'injection pourraient jouer un rôle (84).

#### *a-2/ Stimulation de lymphocytes spécifiques*

Une des caractéristiques des adjuvants est, qu'après leur injection, une augmentation de la cellularité et un élargissement de la région paracorticale des nœuds lymphatiques drainant le site se produisent (86). Ce mécanisme ne correspond pas à une accumulation banale de lymphocytes mais plutôt à un afflux dans le lymphocentre de lymphocytes spécifiques de l'antigène. Ils sont prélevés parmi le pool de lymphocytes circulants et réorientés vers un nœud lymphatique stimulé par les antigènes. Ainsi, les adjuvants assurent une exposition optimale de cellules spécifiquement réceptives à un antigène approprié. Ceci se réalise dans un microenvironnement qui possède le répertoire de cellules nécessaire pour faciliter la réponse immunitaire (86).

#### *a-3/ Utilisation de toute la réponse immunitaire*

Les antigènes, injectés seuls, ne stimulent une réponse immunitaire qu'à médiation humorale. Cependant, si le même antigène est administré avec un adjuvant, il y a une induction d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire (10).

Pour qu'une stimulation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire se mette en place, les antigènes doivent être incorporés dans des cellules présentatrices de l'antigène. Puis ils doivent être intégrés et réexprimés à la surface de ces cellules avec le complexe majeur d'histocompatibilité de type II. Ils peuvent alors interagir avec les antigènes des cellules T, à l'origine de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les adjuvants agissent en augmentant l'intégration des antigènes par les cellules présentatrices d'antigène ou, dans certains cas, présentent directement l'antigène aux cellules T (10).

#### b/ Classification des adjuvants

Les huiles minérales et les sels d'aluminium sont les adjuvants habituellement utilisés dans les préparations vétérinaires. Les saponines, les dipeptides de muramyle, les assemblages de copolymères et les cytokines (comme l'interleukine 2) sont en développement, car ils facilitent le travail du complexe majeur d'histocompatibilité (75).

Les adjuvants les plus utilisés pour les vaccins inactivés sont les sels d'aluminium (les hydroxydes et les phosphates) (60). Cependant il est très difficile d'avoir la composition exacte des adjuvants car les laboratoires gardent leur composition secrète. Entre 1989-1990, environ 20% des adjuvants contenaient de l'aluminium, soit sous forme de phosphate, soit sous forme d'hydroxyde (39).

##### *b-1/ les sels métalliques*

Les sels métalliques sont les adjuvants majoritairement utilisés en médecine vétérinaire et les seuls utilisés en médecine humaine (58). Pour leur préparation, il est maintenant habituel d'utiliser des gels préfabriqués d'hydroxyde ou de phosphate d'aluminium. Ces gels sont utilisés dans de nombreux vaccins vétérinaires contre la rage et la leucose (58).

Le mécanisme exact de ces adjuvants n'est pas connu, mais c'est l'effet dépôt qui joue en grande partie (58). Les adjuvants à base d'aluminium provoquent une augmentation de la réponse humorale face à un antigène. Une absorption retardée de l'antigène précipité dans le vaccin a d'abord été évoquée pour expliquer ce phénomène. Cependant, on sait que l'antigène persiste au site d'injection pendant plus de 3 semaines, alors que le taux d'anticorps, contre la souche injectée, a déjà commencé à décroître. De plus, retirer le granulome vaccinal 2 semaines après l'injection n'affecte pas le taux d'anticorps. Les adjuvants métalliques stimulent des lymphocytes spécifiques et provoquent une accumulation des macrophages. De plus, ils activent le complément, ce qui augmente l'activité de phagocytose de ces macrophages. Les effets de ces adjuvants sont attribués à leur capacité à former des complexes avec les antigènes, qui ainsi sont plus facilement utilisés par les macrophages (58).

Les antigènes, dont la réponse immunitaire est la plus stimulée par les sels d'aluminium, sont les virus et les protéines solubles. En effet, les bactéries entières

n'ont pas besoin d'être agrégées par de l'aluminium pour être reconnues et phagocytées par des macrophages. La part de l'immunité produite par des sels d'aluminium dans un vaccin contre des bactéries serait donc négligeable (58).

Les adjuvants à base de sels d'aluminium sont malheureusement très souvent à l'origine de granulomes inflammatoires. Ils ont d'ailleurs été les premiers à avoir été incriminés dans la formation des FSSI (58).

#### *b-2/ les adjuvants à base d'huile*

Le premier adjuvant à base d'huile est celui de Freund. Il contient de l'huile minérale, de l'eau et des dérivés du mannitol, qui réalisent l'émulsion. Jusqu'à récemment les adjuvants contenaient des huiles minérales hautement purifiées et des émulsifiants. Cependant, la possibilité, que ces huiles minérales puissent contenir des hydrocarbures aromatiques carcinogènes, a poussé les fabricants de vaccins à choisir des huiles naturelles de source animale ou végétale. Le mécanisme de ces adjuvants est identique à celui des sels d'aluminium. Cependant, ils ont tendance à induire une réponse immunitaire plus marquée, mais sont associés à plus d'effets secondaires locaux (réaction locale immédiate et formation de granulomes) (58).

#### *b-3/ les adjuvants à base de substances d'origine végétale*

Les adjuvants les plus utilisés parmi ceux contenant des extraits de plantes sont les saponines. Par exemple, le Quil A est utilisé dans de nombreux vaccins. Comme les autres adjuvants, les saponines stimulent les réactions immunitaires à médiation humorale et cellulaire. Ils sont plus efficaces pour stimuler une réponse immunitaire avec des dérivés membranaires ou avec des particules d'antigènes. Le Quil A n'a pas besoin d'être physiquement attaché à l'antigène, mais permet la production de complexes d'immunostimulation (en incorporant le Quil A dans les structures protéiques) (58).

#### *b-4/ les adjuvants à base d'extraits de bactéries*

C'est dans cette catégorie que l'on trouve l'adjuvant complet de Freund composé d'eau, d'huile et d'extraits de *Mycobacterium tuberculosis*. Une protéine, le dipeptide de muramyle, est l'élément le plus important dans le développement du vaccin.

Ils stimulent la réponse immunitaire et la production d'anticorps par l'activation des cellules B et par une stimulation directe des macrophages. Cependant, les nombreuses caractéristiques toxiques du dipeptide de muramyle ont poussé à l'utilisation d'un dérivé plus purifié du dipeptide de muramyle (dipeptide de muramyle - Threonyl), utilisé dans des vaccins expérimentaux contre la leucose féline (58).

#### **4/ Effets secondaires et relations avec les fibrosarcomes aux sites d'injection**

Les adjuvants ont été associés à de nombreux effets secondaires. La formation de granulomes est courante avec les sels d'aluminium, comme avec les émulsions eau-huile ou le Quil A. Des adjuvants combinés, comme l'adjuvant complet de Freund, peuvent aussi provoquer des uvéites ou des arthrites auto-immunes. A plus long terme, on peut suspecter les adjuvants d'être à l'origine du développement de FSSI (58).

##### a/ Effets secondaires des vaccins vivants atténués

En supposant que l'inflammation postvaccinale soit nécessaire au développement tumoral, les vaccins qui produiraient le moins de réaction locale seraient moins enclins à provoquer l'apparition d'une tumeur. Ceci est corroboré par une étude (60) où il a été démontré que les vaccins vivants atténués, qui ne produisent pas de réaction locale persistante, n'étaient pas à l'origine d'une augmentation significative de l'apparition de tumeurs associés aux vaccins (60).

##### b/ Comparaison entre vaccins inactivés adjuvés

MACY (59) a testé six vaccins félines inactivés : trois antirabiques et trois contre le FeLV (tous étant administrés par voie sous-cutanée).

Le but de cette étude était d'objectiver des réactions locales 21 jours après ces injections. 36 chats ont été vaccinés (59).

Cette étude a démontré que, pour la rage, des réactions locales étaient présentes dans 80% à 100% des cas suivant la marque du vaccin. La taille de la réaction était identique quelle que soit la marque du vaccin (qu'ils contiennent de l'aluminium ou non). Par contre, la taille des réactions locales consécutives aux injections contre la rage était en moyenne deux fois plus importante que la réaction locale la plus marquée pour le FeLV. Cela est surprenant pour l'épidémiologie habituelle des FSSI, mais peut s'expliquer par des compositions différentes d'adjuvants, avec des propriétés pro-inflammatoires plus ou moins marquées (59).

Des trois vaccins FeLV testés, le vaccin, dont l'adjuvant contenait de l'aluminium, provoquait les réactions locales les plus marquées. Le vaccin, dont l'adjuvant ne contenait pas d'aluminium, n'a provoqué une réaction locale mesurable que dans 1 cas sur 6. Par contre le vaccin ne contenant pas d'adjuvant n'a pas provoqué de réactions locales mesurables (même histologiquement) 21 jours après l'injection (59).

A la suite de cette étude, MACY (59) ont testé deux vaccins antirabiques, un dont l'immunité dure 1 an et un dont l'immunité dure 3 ans, mais tous les deux non-adjuvés. Quasiment aucune inflammation n'a été mise en évidence 21 jours post-injection (59).

Une autre étude a été réalisée en 1997 par SCHULTZE *et al.* (81). Le principe était d'injecter trois souches de vaccins (rage, leucose et coryza/typhus) chez des chats sains et d'observer les réactions locales et les résultats de ponctions réalisées toutes les semaines pendant 1 mois. Pour tous les vaccins contre la rage, une réaction locale systématique apparaissait entre 6 et 13 jours après l'injection. Une augmentation locale de la cellularité (essentiellement des lymphocytes) était associée. Par contre, pour les autres souches, une seule réaction locale pour le coryza/typhus a été mise en évidence. Une diminution constante de la cellularité après la première semaine avec disparition des lymphocytes au bout de 4 semaines a été constatée. Cela témoigne de l'activité différente de chaque adjuvant et de celle plus marquée du vaccin antirabique par rapport aux autres vaccins (81).

**CONCLUSION :** parmi les différents types de vaccin, les adjuvants sont couramment utilisés dans les vaccins inactivés. Ils participent activement à l'inflammation post-vaccinale. Les vaccins les plus récents s'affranchissent donc de ce composant afin de diminuer au maximum les effets secondaires de l'acte vaccinal.

# Conclusion

Les tumeurs du CFF sont des tumeurs macroscopiquement et cliniquement identiques mais histologiquement différentes. Ce sont des tumeurs du tissu sous-cutané, agressives localement et se développant pour une partie d'entre elles aux sites habituellement utilisés pour les injections (les FSSI).

Des données épidémiologiques, histologiques et cliniques relient les FSSI aux injections vaccinales. L'inflammation, ainsi que des prédispositions individuelles, semblent être les principaux mécanismes participant au développement de ces tumeurs.

Lors de l'injection vaccinale, les adjuvants (essentiellement les sels d'aluminium) sont particulièrement impliqués dans les conséquences inflammatoires locales. Ainsi, ces derniers pourraient être impliqués dans l'apparition des FSSI.

C'est pourquoi, notre partie expérimentale va s'intéresser aux adjuvants et à leur rôle dans la réponse inflammatoire locale.



**Partie expérimentale :  
étude de la dynamique de la  
réaction inflammatoire induite  
chez le chat par l'administration  
sous-cutanée de vaccins adjuvé  
et non adjuvé.**



# Introduction

La relation qui pouvait exister, sur un animal prédisposé, entre les FSSI et les injections vaccinales a été présentée dans la partie bibliographique. La présence ou l'absence d'un adjuvant influent sur l'incidence des FSSI.

La partie expérimentale va s'intéresser à la dynamique de la réaction inflammatoire induite, chez le chat, par des injections sous-cutanées de vaccins adjuvé et non adjuvé. Le but de cette étude est d'essayer d'identifier les principales modifications locales déclenchées par l'injection de substances pro-inflammatoires. La comparaison des modifications histologiques aux données rapportées dans la bibliographie pourrait, en effet, nous permettre de choisir un type de vaccin pour diminuer l'incidence des panniculites et, peut-être, celle des FSSI.



## **I/ Matériels et méthodes**

Au cours de cette étude, j'ai été impliqué dans l'anesthésie et le suivi des animaux, la réalisation des injections et des biopsies. Le Dr JP Magnol (service d'anatomopathologie de l'ENVL) a réalisé l'analyse histologique des prélèvements, la rédaction des comptes-rendus et de la conclusion de l'étude.

### **1/ Les animaux utilisés**

Pour cette étude, 20 chats européens, sans distinction de sexe, âgés de 7 à 10 mois et non vaccinés ont été utilisés. Ces chats ont été mis à disposition par le laboratoire Merial, qui en a assuré le suivi.

Dix chats ont reçu en 3 points différents une injection sous cutanée du même vaccin non adjuvé. Dix autres chats ont reçu, eux aussi, en 3 points différents une injection sous cutanée de vaccins adjuvés.

### **2/ Les vaccins injectés**

Les vaccins utilisés sont des vaccins contre la leucose. Le vaccin 1 contient aussi des souches contre le coryza et le typhus. Cependant, comme nous l'avons montré dans la partie bibliographique, cela n'a pas d'incidence sur l'inflammation locale et donc sur les interprétations de nos résultats.

Ainsi, le vaccin 1 est un vaccin adjuvé Merial, alors que le vaccin 2 est celui non adjuvé (l'Eurifel<sup>ND</sup> FeLV), lui aussi développé par le laboratoire Merial.

L'adjuvant du vaccin 1 est un adjuvant huileux, alors que le vaccin 2 est un vaccin recombinant.

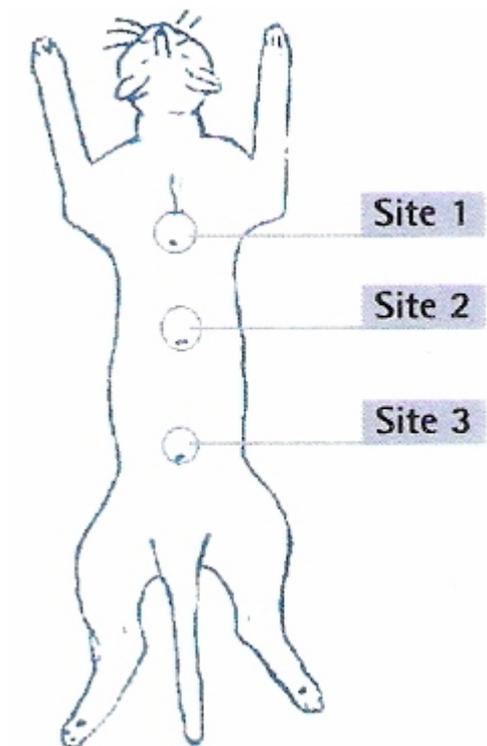
### **3/ Les sites d'injection**

Tous les chats sont anesthésiés par un protocole Diazépam (Valium<sup>ND</sup>) à 0,04 mg/kg et Imalgène (Kétamine<sup>ND</sup>) à 10 mg/kg, injectés en IM. Ils sont ensuite tondu sur une largeur de 7 cm, de la région du cou jusqu'à la base de la queue.

Trois sites d'injection sont identifiés par marquage indélébile : un cercle indélébile de 2 cm de diamètre avec un point caudal (site d'injection).

L'injection du vaccin s'effectue au niveau du point en direction proximale. (voir figures 13 et 14)

**Figure 13 :** Représentation schématique des 3 sites d'injection.  
Le point indique le site d'injection.



**Figure 14 : Animal anesthésié, rasé et préparé pour les injections.**



#### **4/ Les techniques de biopsie**

Chronologie des biopsies :

- au site 1, 2 jours après l'injection vaccinale (J2) ;
- au site 2, 7 jours après injection vaccinale (J7) ;
- et au site 3, 21 jours après l'injection vaccinale (J21).

Leur réalisation pratique se déroule comme suit (voir figures 15 et 16):

- Anesthésie des animaux.
- Préparation chirurgicale.
- Biopsie à l'aide d'un biopsy-punch (0,8 cm).
- Les prélèvements sont identifiés et fixés dans une solution formolée à 10%.
- Les lésions cutanées de biopsie sont suturées à l'aide de points cutanés.

- Tous les éléments des injections et des prélèvements sont identifiés sur un cahier.
- Les prélèvements fixés dans le formol sont transmis à l'anatomopathologiste pour lecture (cette dernière a été réalisée en aveugle)

**Figure 15 : Réalisation de la biopsie.**

Après une préparation chirurgicale, la biopsie est réalisée au centre du cercle, à l'aide d'un biopsy-punch.



**Figure 16 : Visualisation de la biopsie.**  
La présence de tissu adipeux est recherchée dans toutes les biopsies.





## II/ Résultats

### **1/ Vaccin 1**

Les 10 sujets ayant reçu le vaccin 1 (adjuvé) sont répertoriés par les numéros : 9693, 9696, 9698, 9702, 9716, 9726, 9728, 9729, 9768 et 9777.

#### a/ Lésions à J2 et J7

Les stades J2 et J7 sont difficilement dissociables, les seules différences étant la taille des lésions.

Pour l'essentiel, les lésions intéressent le tissu conjonctivo-adipeux sous-cutané. On observe, surtout pour 9693 à J7 (figure 17), des lésions massives de cyto-stéatonecrose, non systématiquement retrouvées dans les autres cas à J2 et J7. De même, rare sont les lésions franches et répétitives de calcification, d'hémorragies (excepté pour 9728 à J2) et d'altérations des parois vasculaires. Pour la majorité des chats, les lobules d'adipocytes ont pratiquement disparu, les graisses ayant été probablement phagocytés par des petits macrophages vacuolaires (9693 - 9702 - 9716 - 9726 - 9728 - 9729 - 9768 - 9777 ; figure 19). Les septa conjonctifs, où les fibres de collagène sont plus ou moins fragmentées, persistent (9729). Une lymphangite est observée pour 9777 à J7 (figure 18).

En périphérie, au sein du tissu adipeux normal, la réaction cellulaire s'organise. Les vaisseaux sont congestionnés, des cellules inflammatoires polymorphes les ceinturent, formant alors des manchons périvasculaires d'épaisseur variable. Parmi ces cellules s'observent des petits lymphocytes matures (9696 - 9698 - 9702 - 9729) témoignant de la réponse immunitaire initiale et des grandes cellules à noyau fortement nucléolé, au cytoplasme abondant, étiré, basophile, hétérogène et d'aspect floconneux (figure 20). Il peut s'agir de macrophages, de cellules d'origine sanguine, de cellules endothéliales mobilisées ou de péricytes. A J21, ces cellules migreront et contribueront à la réaction d'enkystement. C'est le cas, en particulier, pour les sujets 9696, 9698 et 9702.

#### *RESUME :*

Les lésions initiales sont limitées à une **lyse du tissu adipeux** au sein du tissu sous cutané. Des lésions de **cyto-stéatonecrose** et de **lymphangite** sont parfois retrouvées. Il faut noter l'absence de nécrose et/ou d'hémorragies franches et répétitives.

Le début de la réponse cellulaire est observé : il se manifeste par une infiltration du centre de la lésion par des macrophages vacuolaires (lipophages) de petite taille. En périphérie, autour des vaisseaux du tissu adipeux demeuré intact, apparaissent, sous forme de manchons périvasculaires, des petits lymphocytes d'aspect mature (ces derniers constituant la réponse initiale à la composante

immunogène du vaccin) et des grandes cellules basophiles peu différenciées destinées à migrer au stade suivant.

### b/ Lésions à J21

A J21, le foyer inflammatoire est situé plus ou moins profondément sous le muscle peaucier. Il offre une architecture assez stéréotypée sous la forme d'une cavité centrale entourée d'une coque (figure 26) et, à distance, d'infiltrats cellulaires, amplification des phénomènes initiés au cours des stades à J2 et J7 (en particulier 9696).

La cavité centrale contient quelques faisceaux de fibres de collagène. Au sein de ces fibres s'observent des cellules fusiformes de phénotype fibroblastique. Le long de ces fibres sont appliquées les grandes cellules basophiles décrites précédemment et dont l'identité est inconnue (en particulier, 9698 et 9728).

La coque réactionnelle d'enkystement contient de l'intérieur vers l'extérieur (figure 25) :

- en bordure de la cavité centrale, des cellules basophiles peu différenciées, de grande taille et de phénotype mésenchymateux, apparues autour des vaisseaux périphériques en J2 et J7 (9696).
- en périphérie, des cellules histiocytofibroblastiques, mêlées à quelques polynucléaires, lymphocytes et cellules étirées, fibroblastiques, plutôt en position excentrée.

Occasionnellement s'interposent, entre la face profonde du peaucier et la coque réactionnelle, des granulomes lipophagiques histiocyto-giganticellulaires centrés par un espace optiquement vide (9716 – 9729 – 9768).

Une réaction cellulaire se manifeste à distance, dans le tissu adipeux normal périlésionnel où se collectent de petits lymphocytes, sans blastes ni plasmocytes, des cellules basophiles, du type de celles apparues à J2 et J7 (figure 24).

### *RESUME :*

A J21, on note une réponse tissulaire aux lésions destructrices : la **zone cavitaire centrale**, encombrée de fibres de collagène résiduelles « endothélialisées », est circonscrite par une **coque réactionnelle**, très structurée, avec de **grandes cellules basophiles mésenchymateuses** peu différenciées bordant la cavité, puis des **cellules histiocytofibroblastiques**.

Des granulomes lipophagiques histiocyto-giganticellulaires peuvent s'interposer entre le peaucier et les couches les plus externes de la coque.

La réponse cellulaire aux constituants immunogènes du vaccin est aussi présente et se développe à la face profonde du muscle peaucier, sous forme d'infiltrats interstitiels et périvasculaires dans le tissu adipeux périphérique.

## 2/ Vaccin 2

Les animaux ayant reçu le vaccin 2 (non adjuvé) sont identifiés par les numéros : 9695, 9697, 9701, 9725, 9730, 9731, 9736, 9737, 9766 et 9800.

### a/ Lésions à J2 et J7

Comme pour le vaccin 1, les stades J2 et J7 sont difficilement dissociables, les seules variations étant, elles aussi, d'ordre quantitatif.

Les lésions intéressent essentiellement le tissu conjonctif et adipeux sous-cutané qui est fragmenté, dissocié, à de rares exceptions près. Cette perte de cohésion qui a rendu difficile, voire impossible, la réalisation de prélèvements complets résulte probablement de l'imbrication de plusieurs lésions élémentaires : hémorragies disséquantes (post-traumatiques si des tiges pilaires sont au centre de la lésion - 9737 à J7 - ou encore associées à des thromboses vasculaires sans calcification des parois - 9701 à J7 -), lyse du tissu adipeux sans cytotéatonecrose franche, et enfin fragmentation des fibres de collagène (figure 21). Ces lésions sont quasi constantes.

L'infiltrat cellulaire inflammatoire est toujours discret et les macrophages vacuolaires (lipophages) sont rares. Quelques lymphocytes d'aspect mature apparaissent fréquemment autour des vaisseaux congestionnés au sein de lobules adipeux épargnés (figure 23). Cette réaction cellulaire aux composants immunogènes peut se révéler massive (9725 à J7). Des dépôts basophiles sont observés à J7 chez trois chats (9701, 9736 et 9800 à J7, figure 22), ils correspondent à des traces du liquide injecté.

### *RESUME :*

Les lésions initiales du tissu conjonctivo-vasculaire sont variées mais souvent difficiles à observer : hémorragies, **lyse du tissu adipeux sans cytotéatonecrose**, fragmentation des fibres de collagène, dépôts anhistes basophiles ... La perte de cohésion tissulaire qui en résulte peut expliquer, en partie, la difficulté à obtenir des prélèvements complets.

La réponse cellulaire initiale est très discrète : polynucléaires, rares macrophages (lipophages) de petite taille, assez rares lymphocytes périvasculaires.

A ces périodes, il n'a pas été possible de mettre clairement en évidence les grandes cellules basophiles mésenchymateuses qui pourtant s'observeront au stade suivant dans les lésions plus évoluées.

## b/ Lésions à J21

A J21, la non-cohésion tissulaire évoquée ci-dessus et, par voie de conséquence, le caractère incomplet de la plupart des prélèvements limite la possibilité d'interprétation à deux sujets (9701 et 9766).

Dans les cas où elle a pu être observée, la lésion inflammatoire d'enkystement offre l'architecture classique observée dans les autres séries (9701). Le centre cavitaire, contient des lambeaux de collagène « endothélialisés ». La coque montre, de l'intérieur vers l'extérieur, des cellules mésenchymateuses bordantes basophiles de grande taille, des cellules histiocytofibroblastiques et, en périphérie, des fibroblastes/fibrocytes.

La réaction immunitaire aux constituants immunogènes du vaccin se manifeste par la constitution de follicules lymphoïdes, au sein et à distance de la coque (peaucier, tissu adipeux). Pour 9766, la lésion se réduit à une coque lymphoïde autour de collagène nécrosé plus ou moins endothélialisé.

### *RESUME :*

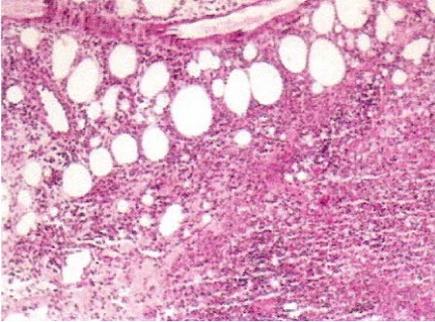
Dans les deux cas analysés, les lésions présentent une architecture comparable à celle décrite à J21, pour les animaux ayant reçu le vaccin 1 mais :

- les **lésions** sont **de petite taille** (figure 27). Elles peuvent donc échapper à un plan de section légèrement parasagittal.
- Les cellules « bordantes » basophiles, sont difficiles à mettre en évidence à J2 et à J7. On les trouve à J21 (9701 - 9766).
- La **réaction périphérique** est parfois **strictement lymphoïde**, sans réaction macrophagique ou histiofibroblastique nette (9766, figure 28).

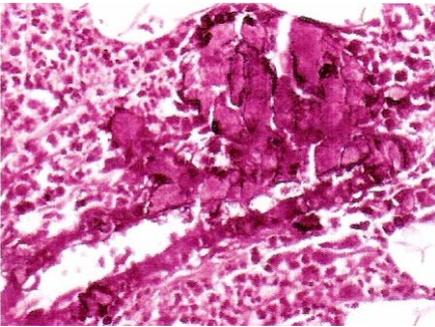
## Résultats anatomo-pathologiques : lésions initiales.

### Vaccin adjuvé

**Figure 17 :** Cytostéatonécrose.



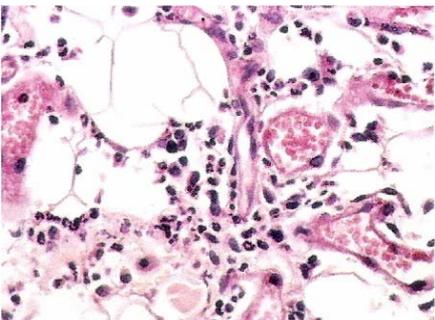
**Figure 18 :** Lymphangite et dilacération tissulaire.



**Figure 19 :** Infiltration de la zone lésée par des lipophages.

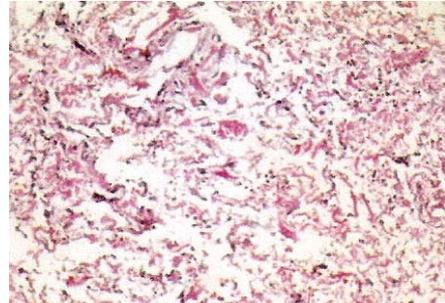


**Figure 20 :** Mobilisation de grandes cellules basophiles indifférenciées à partir des espaces péricapillaires interadipocytaires.

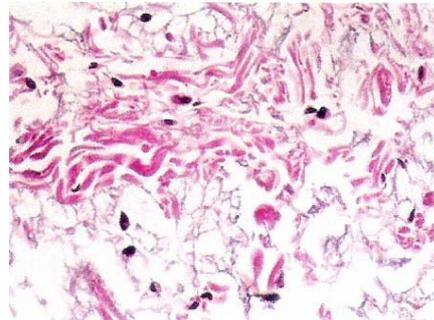


### Vaccin non adjuvé

**Figure 21 :** Lyse du tissu adipeux sans cytochondrolyse et fragmentation des fibres de collagène.

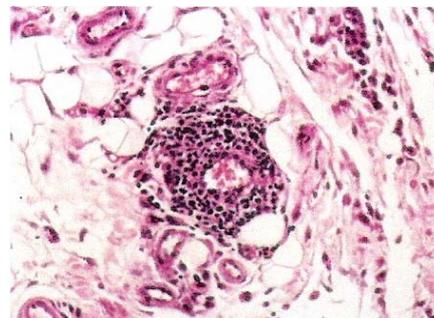


**Figure 22 :** Dépôts fibrillaires basophiles.



**Figure 23 :** Infiltration lymphoïde parfois précoce et périvasculaire témoignant de la réaction aux composants immunogènes du vaccin.

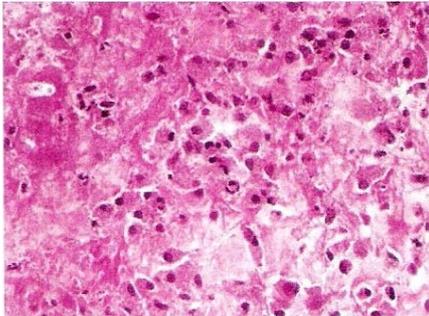
NB : les grandes cellules basophiles indifférenciées semblent recrutées tardivement.



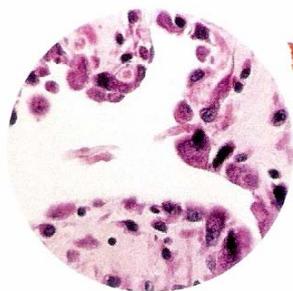
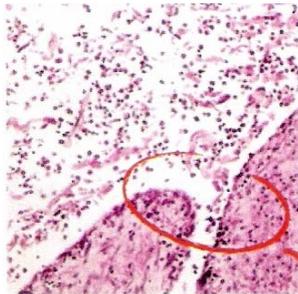
## Résultats anatomo-pathologiques : réaction tissulaire d'enkystement à 21 jours.

### Vaccin adjuvé

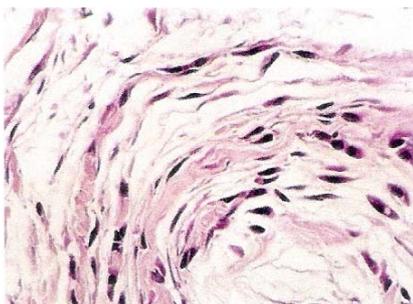
**Figure 24 :** Macrophages ponctués basophiles.



**Figure 25 :** Coque réactionnelle comprenant de l'intérieur vers l'extérieur : des grandes cellules basophiles mésenchymateuses non différenciées « bordantes », des cellules histiofibroblastiques, des lymphocytes et fibrocytes.



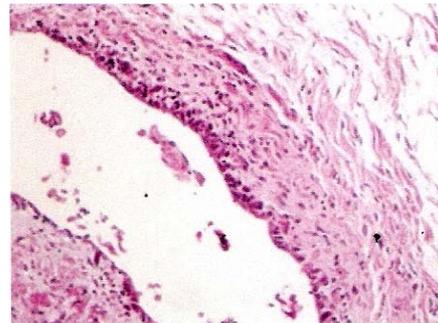
**Figure 26 :** Coque réactionnelle histiocytofibroblastique.



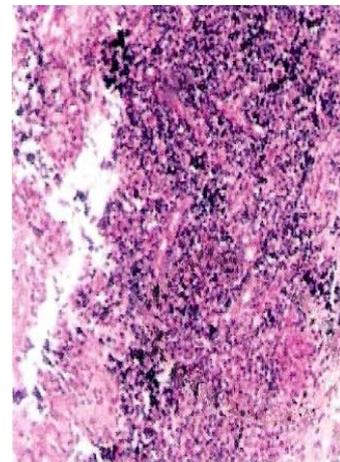
### Vaccin non adjuvé

**Figure 27 :** Absence de granulomes lipophagiques.

Coque réactionnelle qualitativement décrite pour le vaccin adjuvé mais généralement de taille plus réduite dans le cas du vaccin non adjuvé.



**Figure 28 :** Coque parfois strictement lymphoïde sans réaction macrophagique et histiofibroblastique nettes.



### **III/ Discussion**

#### **1/ Objectifs de l'étude**

En 1995, MACY (59) s'est déjà intéressé aux modifications locales engendrées par l'administration de différents vaccins. Cependant, seules la présence et la taille des réactions ont été étudiées. Notre étude complète ces travaux en détaillant les changements histologiques locaux, provoqués par l'injection de vaccin adjuvé et non adjuvé.

#### **2/ Précision des données**

##### **a/ Suivi chronologique des changements locaux**

Un des intérêts de cette étude réside dans la réalisation des 3 biopsies. Grâce à un protocole d'injection précis et des animaux au gabarit identique, nous pouvons interpréter les résultats en comparant les biopsies les unes par rapport aux autres. Cette organisation nous permet de suivre de façon exhaustive et chronologique les réactions du système immunitaire. L'originalité de notre étude réside donc dans le fait que ces renseignements sont impossibles à récolter par une étude de terrain.

##### **b/ Limite technique**

Les prélèvements de la série du vaccin 2 sont parfois incomplets. Cela est la principale limite technique de notre étude et incite à rester prudent dans nos interprétations. Cependant la petite taille des lésions explique ce problème et appuie toutefois nos conclusions.

#### **3/ Intérêts des résultats de l'étude**

##### **a/ Présence de lésions identiques entre les deux vaccins**

Les lésions précoces (à J2 et J7) peuvent résulter du traumatisme infligé par l'aiguille (hémorragies parfois centrées sur des tiges pilaires), de la dilacération mécanique des tissus par le liquide injecté, et enfin, de l'action phlogogène du vaccin (excipient, nature des substances immunogènes...).

Pour les vaccins adjuvés, comme pour ceux non adjuvés, les lésions tardives (à J21) constituées par la coque réactionnelle, témoignent de la réaction inflammatoire tissulaire en réponse à l'acte vaccinal.

##### **b/ Interprétation des différences identifiées**

Tout d'abord, les granulomes lipophagiques histiocyto-giganticellulaires découverts dans les lésions initiales du vaccin adjuvé, sont probablement en rapport avec l'utilisation d'un excipient huileux.

Dans le cas des vaccins non adjuvés, la lésion inflammatoire est inconstante (2 cas sur 10) et de faible étendue (millimétrique). Les vaccins adjuvés entraînent des lésions constantes, de taille centimétrique et la présence (au moins jusqu'à la troisième semaine) d'une prolifération fibroblastique périphérique marquée. Cela souligne que les vaccins peuvent susciter une activation et une prolifération fibroblastique marquées.

Notre étude démontre aussi que les vaccins adjuvés suscitent une cytotéatonécrose accroissant l'inflammation.

Le développement d'une tumeur du CFF suppose une activation et une prolifération anormale de cellules de la famille fibroblastique ou histiofibroblastique. Dans les lésions provoquées par le vaccin adjuvé que nous avons étudié, se produit manifestement, à la faveur de la constitution d'une coque réactionnelle, une prolifération fibroblastique anormale. Les cellules qui prolifèrent sont, de la lumière vers la périphérie, des cellules mésenchymateuses indifférenciées (« bordantes »), des cellules histiocytoblastiques et des cellules lymphoïdes matures.

Notre attention a été particulièrement attirée par la présence remarquable de cellules basophiles bordantes que nous n'avons encore clairement identifiées mais qui, manifestement peu différenciées, peuvent être à l'origine d'une prolifération de cellules fibroblastiques, myofibroblastiques et histiocytoïdes, signalées par MADEWELL *et al.* (63) comme faisant partie des cellules constitutives des FSSI. C'est probablement à partir de ces cellules basophiles que se développent chez 1 à 2 cas pour 10 000 animaux vaccinés (selon ESPLIN *et al.* (25)), une tumeur du CFF.

#### **4/ Perspectives vaccinales découlant des résultats de cette étude**

Compte tenu des caractéristiques des FSSI, certaines recommandations ont été énoncées en 1994, par l'*Association for feline practitioners*, afin de mieux connaître ces tumeurs et de protéger les animaux vaccinés (43, 83) :

- répertorier de façon précise où sont réalisées les injections et quelles souches sont injectées. La rage devrait être injectée dans le postérieur droit, la leucose dans le postérieur gauche et les vaccins vivants atténués sur l'épaule droite. Aucun vaccin ne devrait être injecté en région interscapulaire (83).

- d'administrer les vaccins selon les protocoles recommandés par les fabricants, c'est-à-dire essentiellement de respecter les durées d'immunité des vaccins (83).

- de vacciner par voie sous-cutanée au-dessus des muscles de la cuisse. Ceci a 2 avantages. Tout d'abord, si un fibrosarcome se développe sur un membre, l'amputation est une chirurgie d'emblée curative. Ensuite, la voie sous-cutanée est préférable à celle intramusculaire. L'incidence des fibrosarcomes n'est pas diminuée par une injection intramusculaire, mais une masse sous-cutanée étant plus facilement palpable, un diagnostic plus précoce est possible (83).

- même si cela semble être controversé, d'injecter une seule souche par site et donc éviter les combinaisons de vaccins (83).

- d'utiliser préférentiellement des vaccins non adjuvés et ne contenant pas de sels d'aluminium (83).

- de bien homogénéiser le vaccin avant son injection (83).

Nos résultats rejoignent en partie ces recommandations. Pour nous, la prévention des FSSI passent par :

- le contrôle et l'induction d'une réaction locale plus modérée (argument en faveur du vaccin non adjuvé).

- l'utilisation de régions d'injection pauvres en tissu adipeux (lombes ou face externe de la cuisse).



## Conclusion

Cette étude met en évidence, de façon comparative, les lésions chronologiquement consécutives à l'injection d'un vaccin adjuvé et d'un vaccin non adjuvé.

Pour le vaccin adjuvé, on observe d'abord une lyse du tissu adipeux, avec des lésions de cytotéatonecrose et de lymphangite. Une coque réactionnelle, composée de cellules histiocytofibroblastiques et de cellules mésenchymateuses basophiles, se met ensuite en place.

Pour le vaccin non adjuvé, les lésions sont plus discrètes. Une lyse plus modérée du tissu adipeux sans lymphangite est d'abord observée. Une concentration cellulaire réactionnelle, de beaucoup plus faible ampleur et parfois strictement lymphoïde, se met ensuite en place.

Les cellules basophiles mésenchymateuses indifférenciées observées pourraient être à l'origine de certaines cellules constitutives des FSSI (63). La prévention des tumeurs du CFF pourrait donc passer par une modération de la réaction inflammatoire post-vaccinale :

- en choisissant préférentiellement des vaccins non adjuvés,
- et en sélectionnant des régions d'injection vaccinale moins sensibles à la réaction inflammatoire, notamment pauvres en tissu adipeux.

L'étude que nous avons réalisée est préliminaire et appelle des études complémentaires qui pourraient permettre de mieux connaître l'évolution des tumeurs post-vaccinales à plus long terme en comparant des vaccins adjuvés et non-adjuvés dans des sites d'injection différents.



## Bibliographie

- (1) AL-SARRAF R. Update on feline vaccine-associated fibrosarcomas. *Vet. Med.*, 1998, **93**, 729-735.
- (2) BARRETT PM, MERIDETH RE, LOZANO AL, ARCON F. Central amaurosis induced by an intraocular, posttraumatic fibrosarcoma in a cat. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1995, **31**, 242-245.
- (3) BERGLUNG G. Preparation of anti-serum to an antigen of low-molecular weight. *Nature*, 1965, **206**, 523-524.
- (4) BERGMAN PJ. Etiology of feline vaccine-associated sarcomas: history and update. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1998, **213**, 1424-1425.
- (5) BORJESSON D. Cytology of sarcomas. *Vet. Cancer Soc. Newsl.*, 1999, **23**, 1-4.
- (6) BREVET F. *Epidémiologie et étiologie des fibrosarcomes et lésions apparentées du tissu conjonctif cutané et sous-cutané du chat : étude de l'influence des injections vaccinales*. Thèse Méd. Vét., Lyon, 1998, n°51.
- (7) BRISCOE C, LIPSCOMB T, MCKINNEY LA. Pulmonary metastasis of a feline postvaccinal fibrosarcoma. *Vet. Pathol.*, 1995, **32**, 564.
- (8) BURACCO P, MARTANO M, MORELLO E, RATTO A. Vaccine-associated-like fibrosarcoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat. *Vet. J.*, 2002, **163**, 105-107.
- (9) CARPENTER JL, AUDREWS LK, HOLZWORTH J. Tumors and tumor-like lesions. *In: Diseases of the cat. Medicine and surgery*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994, 406-596.
- (10) COON J, HUNTER RL. Selective induction of delayed hypersensitivity by a lipid conjugated protein which is localised in a thymus-dependent lymphoid tissue. *J. Immunol.*, 1973, **110**, 183-190.
- (11) COUTO GC, HAMMER AS. Tumors of the skin and the subcutis. *In: SHERDING RG, editors. The cat diseases and clinical management*, 2<sup>nd</sup> ed., New York: Churchill Livingstone, 1994, 756-757.
- (12) COUTO GC, MACY DW. Review of treatment options for vaccine-associated feline sarcomas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1998, **213**, 1426-1427.
- (13) COUTO SS, GRIFFEY SM, DUARTE PC, MADEWELL BR. Feline vaccine-associated fibrosarcoma : morphologic distinctions. *Vet. Pathol.*, 2002, **39**, 33-41.

- (14) COYNE MJ, NR REEVES, ROSEN DK. Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1997, **210**, 249-251.
- (15) DEVAUCHELLE P, MAGNOL JP. Fibrosarcomes félines, le tour de la question en dix points. *Prat. Vét. Anim. Comp.*, 2004, **6**, 3-6.
- (16) DEVAUCHELLE P, DELISLE F, DOLIGER S. Les fibrosarcomes dits « post-vaccinaux » chez le chat : mise au point. *Point Vét.*, 1997, **186**, 8-9.
- (17) DODDY FD, GLICKMAN LT, GLICKMAN NW, JANOVITZ EB. Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *J. Comp. Path.*, 1996, **114**, 165-174.
- (18) DOLBERG DS, HOLLINGSWORTH R, HERTLE M, BISSELL MJ. Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation. *Science*, 1985, **230**, 676 - 678.
- (19) DOLIGER S, DEVAUCHELLE P. Données actuelles sur les tumeurs du "complexe fibrosarcome félin ". *Point Vét.*, 1998, **29** (192), 27-35.
- (20) DOLIGER S, DELISLE F, DEVAUCHELLE P. Le complexe fibrosarcome du chat: actualités thérapeutiques. *Action Vét.*, 1992, **1233**, 17-22.
- (21) DUBIELZIG RR, EVERITT J, SHADDUCK JA, ALBERT DM. Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats. *Vet. Pathol.*, 1990, **27**, 62-65.
- (22) ELLIS JA, BARTSCH RC, MCGILL LD, MCGILL LG. Do feline oncornaviruses play a role in vaccine-associated fibrosarcomas in cats? *Feline Pract.*, 1996, **24**, 30.
- (23) ELLIS JA, JACKSON ML, BARTSCH RC, MCGILL LG, MARTIN KM, TRASK BR *et al.* Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1996, **209**, 767-771.
- (24) ESPLIN DG, Mc GILL LD. Postvaccination sarcomas. In AUGUST JR. *Consultations in Feline Internal Medicine*. 2nd ed., Philadelphia : WB Saunders, 1994, 587-591.
- (25) ESPLIN DG, MCGILL LD, MEINIGER AC, WILSON SR. Postvaccination sarcomas in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1993, **202**, 1245-1247.
- (26) ESPLIN DG, JAFFE MH, MCGILL MD. Metastasizing liposarcoma associated with a vaccination site in a cat. *Feline Pract.*, 1996, **24**, 20-23.
- (27) ESPLIN DG, BIGELOW M, MCGILL LD, WILSON SR. Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection in a cat. *Vet. Cancer Soc. Newsl.*, 1999, **23**, 8-9.

- (28) FREUND J, LIPTON MM. Experimental allergic encephalomyelitis after the excision of the injection site of antigen-adjuvant emulsion. *J. Immunol.*, 1955, **75**, 454-460.
- (29) GASKELL RM, GETTINBY G, GRAHAM SJ, SKILTON D. Veterinary products committee working group report on feline and canine vaccination. *Vet. Rec.*, 2002, **150**, 126-134.
- (30) GEMILL LT, COYNE MJ, ROMATOWSKI J. Letters to the editor : the issues of injection site sarcomas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1997, **210**, 889-890.
- (31) GOBARD GM, KASS PH. World wide web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2002, **220**, 1477-1482.
- (32) GOLDSMITH MH, SHOFER FS. *In : Skin tumors of the dog and cat.* Oxford : Pergamon press, 1992, 158-167.
- (33) HENDRICK MJ. Vaccine-induced sarcomas in the cat: overview and current research. *Feline Pract.*, 1996, **24**, 31-32.
- (34) HENDRICK MJ. Historical review and current knowledge of risk factors involved in feline vaccine-associated sarcomas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1998, **213**, 1422-1423.
- (35) HENDRICK MJ. Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1998, **213**, 1425-1426.
- (36) HENDRICK MJ, DUNAGAN CA. Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1991, **198**, 304-305.
- (37) HENDRICK MJ, GOLDSCHMIDT MH. Do injection site reactions induce fibrosarcoma in cats? *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1991, **199**, 968.
- (38) HENDRICK MJ, BROOKS JJ. Postvaccinal sarcomas in the cat : histology and immunohistochemistry. *Vet. Pathol.*, 1994, **31**, 126-129.
- (39) HENDRICK MJ, GOLDSCHMIDT MH, SHOFER FS, WANG YY, SOMLYO AP. Postvaccinal sarcomas in the cat : epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminium. *Cancer Res.*, 1992, **52**, 5391-5394.
- (40) HENDRICK MJ, KASS PH, MCGILL LD, TIZARD IR. Postvaccinal sarcomas in cats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1994, **86**, 341-343.

- (41) HENDRICK MJ, SHOFR FS, GOLDSCHMIDT MH, HAVILAND JC, SCHELLING SH, ENGLER SJ *et al.* Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1994, **205**, 1425-1429.
- (42) ILGART E. *Contribution à l'étude du complexe fibrosarcome chez le chat : apport de l'histologie et de l'analyse factorielle des correspondantes.* Thèse Méd. Vét., Lyon 1991, n°28.
- (43) KASS PH. Epidemiologic issues in the study of vaccine-associated sarcomas in cats. *Feline Pract.*, 1996, **24**, 33.
- (44) KASS PH, BARNES WG, SPANGLERWL, CHOMEL BB, CULBERTSON MR. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1993, **203**, 396-405.
- (45) KASS PH, SPANDLER WL, HENDRICK MJ, Mc GILL LD, ESPLIN DG, LESTER S *et al.* Multicenter case-control of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2003, **223**, 1283-1292.
- (46) KENNEDY JW, WATSON DL. Cellular basis for differences in humoral immune responses of sheep immunized with living or killed *Staphylococcus aureus* vaccines. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1982, **60**, 643-654.
- (47) KERLIN RL, WATSON DL, COLDITZ IG. Inflammatory and immunological responses in skin and peripheal lymph of sheep following intracutaneous injection of *Staphylococcus aureus*. *Inflammation*, 1987, **11**, 175-188.
- (48) KIDNEY BA, HAINES DM, ELLIS JA, BURNHAM ML, JACKSON ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for DNA of feline immunodeficiency virus. *Am. J. Vet. Res.*, 2000, **61**, 1037-1041.
- (49) KIDNEY BA, HAINES DM, ELLIS JA, BURNHAM ML, JACKSON ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for polyomavirus DNA and antigen. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, **62**, 828-832.
- (50) KIDNEY BA, HAINES DM, ELLIS JA, BURNHAM ML, JACKSON ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for papillomavirus DNA and antigen. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, **62**, 833-838.
- (51) KIDNEY BA, ELLIS JA, HAINES DM, JACKSON ML. Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA content in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, **62**, 1990-1994.
- (52) KIDNEY BA, HAINES DM, ELLIS JA, BURNHAM ML, JACKSON ML. Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for feline foamy virus DNA. *Am. J. Vet. Res.*, 2002, **63**, 60-63.

- (53) LACEY M, ALPERT S, HANAHAN D. Bovine papillomavirus genome elicits skin tumours in transgenic mice. *Nature*, 1986, **322**, 609 - 612.
- (54) LASCELLES AK, EAGLESON G, BEH KJ. Significance of Freund's adjuvant/antigen injection granuloma in the maintenance of serum antibody response. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1989, **22**, 15-27.
- (55) LESTER S, CLEMETT T, BURT A. Vaccine site-associated sarcomas in cats: clinical experience and a laboratory review (1982-1993). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1996, **32**, 91-95.
- (56) LEVEQUE NW. Symposium devoted to vaccine-associated feline sarcomas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1998, **213**, 785.
- (57) MACY DW. The potential role and mechanism of FeLV vaccine-induced neoplasms. *Sem. In. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)*, 1995, **10**, 234-237.
- (58) MACY DW. Vaccine adjuvants. *Sem. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)*, 1997, **12**, 206-211.
- (59) MACY DW. Current understanding of vaccination site-associated sarcomas in the cat. *J. Feline Med. Surg.*, 1999, **1**, 15-21.
- (60) MACY DW, BERGMAN PJ. Vaccine-associated sarcomas in cats. *Feline Pract.*, 1995, **23**, 24-27.
- (61) MACY DW, HENDRICK MJ. The potential role of inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats. *Vet. Clin. North Am. (Small Anim. Pract.)*, 1996, **26**, 103-109.
- (62) MACY DW, CARMICHAEL LE, SCHULTZ RD, SCOTT FW. Are we vaccinating too much? *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1995, **207**, 421-425.
- (63) MADEWELL BR, GRIFFEY SM, McENTEE MC, LEPPERT VJ, MUNN RJ. Feline vaccine-associated fibrosarcoma : an ultrastructural study of 20 tumors (1996-1999). *Vet. Pathol.*, 2001, **38**, 196-202.
- (64) MARTINS-GREEN M, BOUDREAU N, BISSEL MJ. Inflammation is responsible for the development of wound-induced tumors in chickens infected with Rous sarcoma virus. *Cancer Res.*, 1994, **54**, 4334-4345.
- (65) MAYR B, BOCKSTAHLER B, LOUPAL G, REIFINGER M, SCHLEGER W. Cytogenetic variation between four cases of feline fibrosarcoma. *Res. Vet. Sci.*, 1996, **61**, 268-270.
- (66) MAYR B, BLAUENSTEINER J, EDLINGER A, REIFINGER M, ALTON K, SCHAFFNER G *et al.* Presence of p53 mutations in feline neoplasms. *Res. Vet. Sci.* 2000, **68**, 63-69.

- (67) MORISSON WB, STARR RM. Vaccine-associated feline sarcomas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2001, **218**, 697-702.
- (68) NAMBIAR PR, HAINES MD, ELLIS JA, KIDNEY BA, JACKSON ML. Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am. J. Vet. Res.*, 2000, **61**, 1277-1280.
- (69) NAMBIAR PR, JACKSON ML, ELLIS JA, CHELACK BJ, KIDNEY BA, HAINES DM. Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline injection site-associated sarcomas. *Vet. Pathol.*, 2001, **38**, 236-238.
- (70) NERENBERG M, HINRICHS SH, REYNOLDS RK, KHOURY G, JAY G. The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice. *Science*, 1987, **237**, 1324 - 1329.
- (71) OGILVIE GK. Principles of oncology. In: MORGAN RV, editors. *Handbook in small animal practice*. 2<sup>nd</sup> ed., New-York : Churchill Livingstone, 1992, 799-811.
- (72) OGILVIE GK. Recent advances in the treatment of vaccine-associated sarcomas. *Vet. Clin. North Am. (Small Anim. Pract.)*, 2001, **31**, 525-533.
- (73) POULET H. Eurifel® FeLV, vaccin à vecteur viral vivant non répliatif. In : *Cahier du Vétomécum. Rétroviroses, nouvelles données, nouvelles technologies vaccinales*. Lyon : Editions Mérial, 2003, 47-51.
- (74) RAMON G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de sérum antidiptérique. *Bull. Soc. Centr. Méd. Vét.*, 1925, **101**, 227.
- (75) RICHARDS JR. Advances in feline health research: impact of recent developments in vaccinology on feline welfare. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1996, **208**, 505-510.
- (76) RICHARDS JR. Vaccine-associated feline sarcoma task force awards research grants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1998, **212**, 162-163.
- (77) RUDMANN DG, VAN ALTINE WG, DODDY F, SANDUSKY GE, BARKDULL T, JANOVITZ EB. Pulmonary and mediastinal metastases of a vaccination-site sarcoma in a cat. *Vet. Pathol.*, 1996, **33**, 466-469.
- (78) SAMAILLE JP. Fibrosarcomes du chat : une origine iatrogène. *Action Vét.*, 1992, **1224**, 10.
- (79) SAMAILLE JP. Fibrosarcomes félines vaccino-induits: la recherche s'organise aux Etats-Unis. *Action Vét.*, 1998, **1432**, 16-18.
- (80) SCHUH AC, KEATING SJ, MONTECLARO FS, VOGT PK, BREITMAN ML. Obligatory wounding requirement for tumorigenesis in v-jun transgenic mice. *Nature*, 1990, **346**, 756 - 760.

- (81) SCHULTZE AE, FRANK LA, HAHN KA. Repeated physical and cytologic characterizations of subcutaneous postvaccinal reactions in cats. *Am. J. Vet. Res.*, 1997, **58**, 719-724.
- (82) SPUGNINI EP, RUSLANDER D., BARTOLAZZI A. Extraskelatal osteosarcoma in a cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2001, **219**, 60-62.
- (83) STARR RM. Update : vaccine-associated feline sarcoma task force. *Vet. Cancer Soc. Newsl.*, 1999, **23**, 10-11.
- (84) TEW JG, PHIPPS RP, MENDEL TE. The maintenance and regulation of the humoral immune response : persisting antigen and the role of follicular antigen-binding dendritic cells as accesory cells. *Immunol. Rev.*, 1980, **53**, 175-201.
- (85) THEILEN GH, MADEWELL BR. Feline fibrosarcoma. *In : Veterinary cancer medicine*. 2<sup>nd</sup> ed., Philadelphia : Lea and Febiger, 1987, 382-391.
- (86) WAKSMAN BH. Adjuvants and immune regulation by lymphoid cells. *In : CHEDID L, MIESCHER PA, MUELLER-EBERHARD HJ, editors. Immunostimulation*. Berlin : Springer-Verlag, 1980, 5-33.
- (87) WARREN HS, VOGEL FR, CHEDID LA. Current status of immunological adjuvants. *Annu. Rev. Immunol.*, 1986, **4**, 369-388.
- (88) WEIGAND CM, BREWER WG. Vaccine-sites sarcomas in cats. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 1996, **18**, 869-875.

# Annexes

## Annexe 1 : Preuve d'achat attestant de l'origine des chats

IFFA CREDO  
DOMAINE DES GOUTTES  
LENTILLY.

**BON DE TRANSPORT**

DATE : 23/02/2002  
VEHICULE N° :  
NOM DU CHAUFFEUR :  
DESTINATION DE : IFFA CREDO LENTILLY  
A : ENVA - Maisons Affolons  
D1 Devaux Belle

ANIMAUX TRANSPORTES : 44 chats de  
4 à 15 mois  
15 emballages

VISA RESPONSABLE

**IFFA - CREDO**

Domaine des Gouttes

69558 LENTILLY

Tél. 04 74 01 91 30 - Fax 04 74 01 91 39

Annexe 2 : Descriptif des chats

**IFFA CREDO LENTILLY**

Domaine des Gouttes

Tél. : 04.74.01.91.30

Fax : 04.74.01.91.39

N° Commande MERIAL	NOR 157427
Date Expédition	23-févr-01
Intitulé Produit	Chats CIBA
Adresse Livraison	Maisons-Alfort
Section Livraison	ENVA - Dr Devauchelle

Nombre	Date de Naissance	Identificat° des Ax.	Sexe	N° de la mère	N° de la père
1	29/11/1999	9653	FM	6344	8045
2	-	9691	FM	8047	7400
3	01/03/2000	9693	ML	6289	-
4	-	9694	FM	-	-
5	-	9695	ML	8019	-
6	-	9696	FM	-	-
7	-	9697	FM	-	-
8	05/03/2000	9698	ML	7666	6372
9	-	9700	FM	-	-
10	13/03/2000	9701	ML	8339	7400
11	-	9702	FM	-	-
12	28/03/2000	9705	FM	8044	8045
13	-	9711	FM	8018	-
14	03/04/2000	9716	ML	8089	7400
15	10/04/2000	9719	FM	7679	8045
16	-	9720	FM	-	-
17	17/04/2000	9722	FM	8056	7400
18	-	9723	FM	-	-
19	-	9725	ML	8023	8045
20	-	9726	ML	-	-
21	-	9727	FM	-	-
22	-	9728	FM	-	-

Annexe 3 : Suite du descriptif

## IFFA CREDO LENTILLY

Domaine des Gouttes

Tél. : 04.74.01.91.30

Fax : 04.74.01.91.39

N° Commande Merial	NOR 157427
Date Expédition	23-févr-01
Intitulé Produit	Chats CIBA
Adresse Livraison	Maisons-Alfort
Section Livraison	ENVA - Dr Devauchelle

Nombre	Date de Naissance	Identifiant des Ax	Sexe	N° de la mère	N° de la père
23	25/04/2000	9729	ML	8346	7400
24	-	9730	FM	-	-
25	-	9731	ML	8330	8045
26	-	9734	FM	-	-
27	-	9735	FM	-	-
28	26/04/2000	9736	FM	8332	-
29	-	9737	FM	-	-
30	02/06/2000	9762	ML	7433	7400
31	-	9763	FM	-	-
32	-	9764	FM	-	-
33	05/06/2000	9766	FM	8057	-
34	13/06/2000	9768	FM	6345	6372
35	30/06/2000	9776	FM	6192	8045
36	-	9777	ML	-	-
37	03/08/2000	9798	FM	8089	7400
38	14/08/2000	9799	ML	7663	6372
39	-	9800	ML	7670	7400
40	-	9801	FM	-	-
41	18/09/2000	9813	ML	8046	-
42	-	9814	FM	-	-
43	31/10/2000	9845	FM	8093	-
44	-	9848	FM	8057	-

A Monsieur le Professeur de la faculté de Créteil qui nous fait l'honneur de présider ce jury de thèse.  
Hommage respectueux.

A Monsieur le Professeur François Crespeau, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et le temps passé à l'améliorer.

Au Docteur Dan Rosenberg pour ses précieux conseils. Merci pour l'aide apportée dans les moments importants de mes dernières années études.

Au Docteur Patrick Devauchelle, pour m'avoir proposé cette thèse et guidé dans sa réalisation.

Au Docteur Magnol, pour la lecture des lames. Cette thèse n'aurait pas pu voir le jour sans son travail.

Aux vétérinaires qui ont croisé ma route et qui m'ont guidé dans la réalisation de mon projet professionnel, notamment le Professeur Pierre Moissonnier, un guide hors pair autant sur terre que sur mer et le Docteur Jean-Christos Troger, pour sa disponibilité et pour m'avoir transmis la passion de la chirurgie.

A Elisabeth Grison, pour avoir corrigé ma bibliographie.

A mes parents, pour avoir toujours été derrière moi et m'avoir permis de m'épanouir aussi bien personnellement que professionnellement. Ces quelques lignes ne représentent que peu de choses par rapport à ce que vous avez fait pour moi. Courage, l'indépendance devrait arriver un jour.

A Stéphane et Doudou, pour s'être soutenus les uns les autres dans nos études respectives et un lien de plus en plus fort au fil du temps.

A ma famille. Notamment, Jean-Michel et Odile pour m'avoir accueilli pendant ma deuxième année de prépa ; et mes grands-pères, qui, de là-haut, je le sais, m'ont aidé et sont fiers de moi.

A Charly, Iti, Réglisse et Roméo, parce que c'est toujours dur d'être un premier patient.

A Matthieu, mon Tepo, mon binôme, parce qu'il est simplement la deuxième raison qui m'a fait regretter de partir.

A Vanessa, pour ses qualités, sa franchise, ma meilleure amie.

A Biquette, pour deux ans de colocation, un chat épileptique et beaucoup de complicité.

A Violaine, pour sa gentillesse et ses questions souvent sans réponse.

A Eymeric, troisième membre de la « funky groovy car », un vrai pote.

A Anne, pour sa joie de vivre et son sourire.

A Greg, pour avoir apporté un peu de testostérone dans des années d'étude parfois trop féminines.

A Timothy, pour deux ans de footing, des années d'amitié et le seul, non véto, à avoir sa place ici.

A Stef, « last but not least », parce que cette année loin de toi ne me donne que plus envie de vivre celles à venir à tes côtés. Si je ne te le dis pas assez souvent, tu pourras au moins le lire ici : je t'aime...

**LE COMPLEXE FIBROSARCOME FELIN : POTENTIEL  
D'IMPLICATION DES INJECTIONS VACCINALES ADJUVÉES, NON  
ADJUVÉES.  
ETUDE PRELIMINAIRE DE DEUX VACCINS.**

NOM et Prénom : PERROT Thomas

RESUME :

Les tumeurs du complexe fibrosarcome félin sont des tumeurs sous-cutanées du chat se développant, pour une partie d'entre elles, aux sites habituellement utilisés pour les injections.

Après une présentation de ces tumeurs, ce travail de thèse expose les arguments épidémiologiques, histologiques et cliniques en faveur d'un lien entre les injections vaccinales et les fibrosarcomes aux sites d'injection. Les principaux mécanismes participant à leur développement, notamment l'inflammation et les prédispositions individuelles, sont ensuite présentés. Le dernier chapitre de la partie bibliographique s'intéresse aux adjuvants et à leur rapport avec les fibrosarcomes aux sites d'injection.

La partie expérimentale compare l'évolution chronologique des lésions présentes après injection d'un vaccin adjuvé et d'un vaccin non adjuvé. Les observations effectuées permettent d'objectiver les conséquences locales de la présence d'un adjuvant et de formuler des recommandations afin de maîtriser le risque d'apparition d'un fibrosarcome.

Mots-clés : CHAT, FIBROSARCOME, COMPLEXE FIBROSARCOME FÉLIN, VACCIN, VACCIN RECOMBINÉ, ADJUVANT.

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Pr. François Crespeau

Assesseur : Dr. Dan Rosenberg

Invité : Dr. Patrick Devauchelle

Adresse de l'auteur :

M. Thomas PERROT

8 Rue Rémi Belleau

78590 Noisy-le-Roi

# **FELINE FIBROSARCOMA COMPLEX: POSSIBLE INVOLVEMENT OF ADJUVANTED OR NON ADJUVANTED VACCINAL INJECTION. PRELIMINARY STUDY OF TWO VACCINES.**

SURNAME : PERROT

Given name : Thomas

## Summary :

Feline fibrosarcoma complex are subcutaneous and aggressive tumors of the cat, that usually develop at injection sites.

After a presentation of these tumors, this doctoral thesis exposes epidemiologic, histological and clinical arguments in favour of a link between vaccinal injections and vaccine-site fibrosarcomas. The main mechanisms leading to their development, especially inflammation and individual predispositions are presented. The last chapter of the bibliographic part will present the adjuvants and their implication with the injection-site fibrosarcomas.

The experimental part will compare the chronological evolution of the lesions developing at the injection site with adjuvanted and non-adjuvanted vaccines. We will then be able to acknowledge objectively the local consequences of the adjuvant and therefore state recommendations that will allow the prevention of fibrosarcomas.

Key words : CAT, FIBROSARCOMA, FELINE COMPLEX FIBROSARCOMA, VACCINE, COMBINE VACCINE, ADJUVANT.

## Jury :

President: Pr.

Director: Pr. François Crespeau

Assessor: Dr. Dan Rosenberg

Guest: Dr. Patrick Devauchelle

## Author's address :

Mr Thomas PERROT

8 Rue Rémi Belleau

78590 Noisy-le-Roi